

Extraktion und Charakterisierung zellwandgebundener Polysaccharide aus Pilzen

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)



Bergische Universität Wuppertal

Fachbereich C - Mathematik und Naturwissenschaften

Organische Chemie/ Kommunikation und Management

chemischer Prozesse in der Industrie

vorgelegt von

Jörg Nitschke

Wuppertal

Oktober 2011

Die Dissertation kann wie folgt zitiert werden:

urn: nbn: de: hbz: 468-20111214-151027-7

[<http://nbn-resolving.org/urn/resolving.pl?urn=urn%3Anbn%3Ade%3Ahbz%3A468-20111214-151027-7>]

Danksagung

Mein besonderer Dank geht an Herrn Professor Dr. Hans-Josef Altenbach für die interessante Themenstellung, die Möglichkeit zur Promotion und seine stets freundliche und fachliche Unterstützung, welche zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Dank gebührt auch Frau Akad. Dir. Dr. Helga Mölleken für ihre stets kompetente, nette und hervorragende Betreuung der praktischen Arbeit, für die Übernahme des Zweitgutachtens und für ihre fachlichen Ratschläge, ohne die diese Arbeit, in dieser Form, nicht hätte durchgeführt werden können.

Bedanken möchte ich mich ebenfalls bei Herrn Prof. Dr. Hans-Willi Kling für die freundliche Aufnahme in seinen Arbeitskreis, und für die fachlichen Diskussionen, die ich stets geschätzt habe.

Des Weiteren möchte ich mich bei Herrn Dr. Tim Malolepszy für die freundschaftlichen Gespräche und die produktive und kollegiale Zusammenarbeit bedanken.

Ich möchte auch meinen weiteren Kollegen danken, allen voran Frau Franziska Spradau, Frau Michaela Jonas, Herrn Hendrik Modick und Herrn Tobias Geim sowie den anderen Mitarbeitern der Fachgruppe Kommunikation und Management chemischer Prozesse in der Industrie.

Mein Dank geht ebenfalls an die Mitarbeiter der Fachgruppe der Organischen Chemie der Bergischen Universität Wuppertal für ihre Unterstützung. Besonders danken möchte ich hier Herrn Dr. Karsten Lange für die Hilfe bei den Photographien der Pilzmycelien.

Ebenfalls möchte ich mich bei der Fachgruppe Lebensmittelchemie der Bergischen Universität Wuppertal für das Ermöglichen der fluorimetrischen Messungen bedanken.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit entstandene Veröffentlichungen:

Nitschke, J., Altenbach, H.J., Malolepszy, T., Mölleken, H. A new method for the quantification of chitin and chitosan in edible mushrooms. *Carbohydrate Research* **346**, 1307-1310 (2011).

Nitschke, J., Modick, H., Busch, E., von Rekowski, R.W., Altenbach, H.J., Mölleken, H. A new colorimetric method to quantify β -1,3-1,6-glucans in comparison with total β -1,3-glucans in edible mushrooms. *Food Chemistry* **127**, 791-796 (2011).

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	9
2. Theorie	14
2.1 Zellwandgebundene Polysaccharide Echter Pilze	14
2.2 Theoretische Grundlagen der enzymatischen Extraktion	21
2.3 Theoretische Grundlagen der Strukturanalytik von β -Glucanen aus Pilzen	23
2.4 Quantitative Analytik der Zellwandpolysaccharide von Basidiomyceten und Ascomyceten.....	29
2.4.1 Theoretische Grundlage der quantitativen Bestimmung der Gesamt- β -Glucane mit Anilinblau.....	30
2.4.2 Theoretische Grundlage der quantitativen Bestimmung triplehelicaler β -Glucane mit Kongorot.....	31
2.4.3 Theoretische Grundlage der quantitativen Bestimmung von Chitin.....	33
3. Material und Methoden	36
3.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien.....	36
3.1.1 Mono- und Polysaccharidstandards	36
3.1.2 Enzyme und Substrate.....	36
3.1.3 Farbstoffe	36
3.1.4 Stationäre Phasen für die chromatographischen Bestimmungen.....	37
3.1.5 Lösungsmittel und Verbrauchsmaterialien für die Kernresonanzspektroskopie	37
3.1.6 Sonstige Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	37
3.2 Angewendete Methoden	38
3.2.1 Mycelienanzucht, -aufarbeitung und -kinetik	38
3.2.1.1 Kultivierung der Mycelien auf festen Nährböden	38
3.2.1.2 Kultivierung der Mycelien in Flüssigkultur.....	39
3.2.1.3 Aufarbeitung der Zellmaterialien für weitere Untersuchungen	39
3.2.1.4 Bestimmungen der Wachstumskinetiken.....	40

3.2.3 Kinetische Bestimmungen pilzeigener Enzyme	40
3.2.3.1 Aufschluss und Bestimmung der Exo- und Endochitinaseaktivität.....	40
3.2.3.2 Aufarbeitung und Bestimmung der Glucanaseaktivität.....	41
3.2.4 Quantitative Bestimmungsmethoden.....	42
3.2.4.1 Aufarbeitung und Bestimmung des Chitingehaltes	42
3.2.4.2 Methode zur quantitativen Bestimmung der Gesamt- β -Glucane mit Anilinblau	43
3.2.4.3 Methode zur quantitativen Bestimmung der triplehelicalen Glucane mit Kongorot.....	43
3.2.4.4 Methoden zur Validierung der neuartigen Bestimmungsmethoden.....	44
3.2.5 Sonstige Bestimmungsmethoden.....	44
3.2.5.1 Methode zur Bestimmung des N-Acetylglucosamins.....	44
3.2.5.2 Methode zur Bestimmung des Proteingehaltes.....	45
3.2.5.3 Methode zur Bestimmung des Kohlenhydratgehaltes	45
3.2.6 Literaturmethode zur Extraktion von β -Glucanen.....	45
3.2.7 Enzymatische Extraktionsmethode für β -Glucane.....	46
3.2.8 Strukturanalytische Methoden zur Charakterisierung der β -Glucane.....	48
3.2.8.1 Aufreinigung der isolierten Glucane.....	48
3.2.8.2 Kernresonanzspektroskopie	49
3.2.8.3 Bestimmung der Molekularmasse mittels Gelpermeationschromatographie	52
3.2.8.4 Bestimmung der Monosaccharidzusammensetzung.....	52
4. Ergebnisse.....	54
4.1 Vorbereitende Versuche.....	54
4.1.1 Bestimmung der Wachstumskinetik der Pilzmycelien auf verschiedenen Nährmedien.....	54
4.1.2 Bestimmung der Eigenenzymaktivitäten der Pilze.....	58
4.1.2.1 Bestimmung der Aktivitäten der Endo- und Exochitinasen	58
4.1.2.2 Bestimmung der Glucanaseaktivität	61

4.1.3 Entwicklung und Optimierung quantitativer Bestimmungsmethoden zur Polysaccharidanalytik	63
4.1.3.1 Methodenoptimierung zur Bestimmung des Gesamt- β -1,3-Glucangehaltes	63
4.1.3.2 Methodenentwicklung zur Bestimmung triplehelicaler β -Glucane mit Kongorot	65
4.1.4.1 Entwicklung eines quantitativen Spot Assays zur Bestimmung von Chitin	69
4.1.4.2 Bestimmung des Chitingehaltes von Echten Pilzen	72
4.2 Bestimmung der Ausbeuten an β -Glucanen bei Verwendung der Literaturmethode	75
4.3 Entwicklung der enzymatischen Extraktionsmethode für β -Glucane	82
4.4 Strukturanalytische Charakterisierung der extrahierten Glucane	93
4.4.1 Aufreinigung der Glucanextrakte	94
4.4.2 Kernresonanzspektroskopische Charakterisierung der Polysaccharidstrukturen	95
4.4.2.1 Charakterisierung der durch die Literaturmethode isolierten Glucane	96
4.4.1.2 Charakterisierung der enzymatisch extrahierten Glucane	106
4.4.3 Bestimmung der Molekularmasse	110
4.4.3.1 Bestimmung der Molekularmassen der durch die Literaturmethode extrahierten Glucane	110
4.4.3.1 Bestimmung der Molekularmasse der enzymatisch extrahierten Glucane	113
4.4.4 Bestimmung der Monosaccharidzusammensetzung	116
4.4.4.1 Bestimmung der Monosaccharidzusammensetzung der durch die Literaturmethode extrahierten Glucane	116
4.4.4.2 Bestimmung der Monosaccharidzusammensetzung der enzymatisch extrahierten Glucane	119
5. Schlussfolgerung	122
6. Ausblick	133
7. Zusammenfassung	135

8. Summary.....	137
9. Literatur.....	139
A. Anhang: Abkürzungsverzeichnis.....	I
B. Anhang: Formelverzeichnis	III
C. Anhang: Abbildungsverzeichnis.....	VII
D. Anhang: Tabellenverzeichnis.....	X
E. Anhang: schriftliche Versicherung.....	XII

1. Einleitung

Die Traditionelle Chinesische Medizin (TCM) nutzt Pulver und Extrakte von Pflanzen und im Besonderen von (Speise-)Pilzen für die Behandlung verschiedenster Erkrankungen (Wasser 2002). Somit dienen Pilze nicht nur als Nahrungsmittel, sondern auch als Therapeutikum gegen zahlreiche Erkrankungen. Ziel der modernen Forschung ist es nun, wirksame Inhaltsstoffe zu identifizieren. Hierzu gehört die Verbindungsklasse der β -Glucane, die bereits in den 1960er Jahren als potenter immunstimulierender und antikanzerogen wirkender Inhaltsstoff aus der Zellwand von Pilzen charakterisiert wurde (Chihara 1969, Wasser und Weis 1999, Wasser 2002, Sullivan et al. 2006, Wasser 2010).

In der vorliegenden Arbeit soll eine neuartige, enzymbasierte Extraktionmethode für wasserlösliche β -Glucane aus verschiedenen Zellmaterialien Echter Pilze der Abteilung Basidiomycetes und Ascomycetes entwickelt werden. Mit diesem Extraktionsverfahren sollen besonders β -Glucane aus dem vegetativen Mycelien ausgewählter Pilzzellkulturen isoliert werden. Bei herkömmlichen Verfahren werden β -Glucane meist aus Fruchtkörpern mit Hilfe von Säuren und Laugen extrahiert. Die in dieser Arbeit gewonnenen Glucane stellen somit nicht nur hinsichtlich des neuartigen Extraktionsweges, sondern auch wegen der Verwendung des Mycels, innovative Produkte dar.

Das Prinzip der Extraktionsmethode basiert auf der enzymatischen Hydrolyse der Zellwand durch Chitinasen und β -Glucanasen. Durch den Abbau des Chitins, einem Polysaccharid, welches in der Zellwand eng mit den β -Glucanen verknüpft ist, werden diese für weitere schonende Extraktionsschritte zugänglich. Zusätzlich soll eine Inkubation mit β -Glucanase unlösliche hochmolekulare β -Glucane partiell hydrolysieren. Dies macht aufgrund der daraus resultierenden besseren Löslichkeit der Glucane eine Extraktion mit schonenden Lösungen ebenfalls besser möglich. Das Prinzip wird ausführlich in Abschnitt 2.2 erläutert.

Durch dieses neuartige Verfahren unterscheidet sich diese Methode maßgeblich von herkömmlichen Extraktionsmethoden für β -Glucane, die auf dem Einsatz von Säuren, Laugen und anderen aggressiven Substanzen basieren (z.B. Yoshioka et al. 1985, Zhang et al. 1999 und 2007). Die Verwendung solcher Chemikalien führt mitunter zu einer partiellen Degradation der Primär- und Tertiärstrukturen

von β -Glucanen. Durch diese strukturelle Veränderung kann die Wirksamkeit der β -Glucane verloren gehen. Durchgeführte Studien scheinen diese Wirkminderungen zu bestätigen (Maeda et al. 1988, Zhang 2005, LaRosche und Michaud 2007). Die in dieser Arbeit entwickelte enzymatische Extraktionsmethode soll die Isolation von β -Glucanen aus Mycelien und wenigen ausgewählten Fruchtkörpern unter Erhalt ihrer Primär- und Tertiärstrukturen ermöglichen.

Das neuartige Extraktionsverfahren wird im Labormaßstab konzipiert und verifiziert. Die zu verwendenden Enzyme Chitinase und Glucanase sollen Glucane möglichst schonend aus der Zellwand freisetzen.

Um die Vorteile der enzymatischen Extraktion nachzuweisen, ist ein Vergleich mit einer herkömmlichen Extraktionsmethode zwingend notwendig. Deshalb wird in dieser Arbeit die neu entwickelte enzymatische Methode mit einer bekannten Literaturmethode nach Sietsma und Wessels (1977) sowohl strukturanalytisch als auch im Hinblick auf die erhaltenen Glucanusbeuten verglichen.

Das Augenmerk der aktuellen Forschung liegt zudem vor allem auf der Untersuchung der oft als Nahrungsmittel verwendeten Fruchtkörper. Das vegetative Pilzmycel wurde auf seine medizinischen wirksamen Inhaltsstoffe erst in wenigen Arbeiten untersucht, obwohl vergleichbare Inhaltsstoffe anzunehmen sind. Dabei ist das Mycel im Vergleich zu den Fruchtkörpern aufgrund seiner hohen Wachstumsrate eine günstige Quelle zur Gewinnung von Glucanen, was es besonders für eine Nutzung interessant macht. Die in dieser Arbeit entwickelte Methode soll wie bereits erwähnt die Mycelien verschiedener Pilze als Rohstoff zur Gewinnung von β -Glucanen nutzen und wird deshalb speziell hierfür konzipiert. Um die Anzucht des vegetativen Mycels zu optimieren, werden verschiedene Nährmedien getestet und jeweils die Wachstumseigenschaften der Mycelien charakterisiert. Somit kann das optimale Nährmedium für die Anzucht der Mycelien ermittelt werden. Durch diese Effizienzsteigerung steht für die spätere Extraktion mehr Zellmaterial in kürzerer Zeit zur Verfügung. Anders als bei der Kultivierung des Fruchtkörpers kann des Weiteren auf den mitunter schwierig zu realisierenden Fruktationsreiz verzichtet werden, was dieses Verfahren besonders attraktiv macht.

Wegen des engen Zusammenhangs zwischen Struktur und Wirkung werden die in dieser Arbeit isolierten β -Glucane strukturanalytisch mit entsprechenden Methoden charakterisiert. Die Identifizierung der Struktur der Glucane lässt erste

Rückschlüsse auf die mögliche Wirkung zu. So weisen β -Glucane aus Pilzen meist ein Grundgerüst aus β -1,3-glykosidisch verknüpften Glucoseeinheiten auf und können gegebenenfalls über verschiedene Bindungstypen mit weiteren Polysaccharidketten verknüpft sein (Steinbüchel et al. 2002, Zhang et al. 2007, Busch et al. 2007 a, b, Novak und Vervicka 2008). Andere Monosaccharide wie Mannose oder Galactose können in geringen Anteilen ebenfalls in der Polysaccharidkette eingebunden sein (z.B. Zhang et al. 2007, Yang et al. 2009, Ye et al. 2009). Die Molekularmassen der Glucane betragen bis zu $1 \cdot 10^6$ Da (Steinbüchel et al. 2002). Alle diese durch die gewählte Extraktion beeinflussbaren Faktoren spielen eine bedeutende Rolle in Hinsicht auf die potentielle Wirkung der Glucane. Allerdings ist hier der genaue Zusammenhang nicht vollständig geklärt (Wasser 2010).

Es besteht außerdem ein enger Zusammenhang zwischen der Tertiärstruktur des Glucans und seiner biologischen Wirkung. So konnte gezeigt werden, dass Glucane, die im neutralen pH-Bereich als Triplehelix vorliegen, besonders wirksam sind (Steinbüchel et al. 2002, Zhang et al. 2007, Busch et al. 2007 a, b, Novak und Vervicka 2008). Ihre antikanzerogene und immunstimulierende Wirkung macht besonders Glucane mit einem hohen Anteil an dieser Tertiärstruktur als Pharmazeutika, Nahrungsergänzungsmittel oder für die kosmetische Industrie interessant. Zurzeit verwendete Extraktionsmethoden führen allerdings zu einer Denaturierung dieser wichtigen Tertiärstruktur (Young und Jacobs 2000, Zhang et al. 2005 und Laroche und Michaud 2007). Aktuelle quantitative Analysemethoden können außerdem nicht zwischen den wichtigen Tertiärstrukturen unterscheiden. Da der Anteil an triplehelicalen Glucanen an der Gesamtausbeute ein wichtiges Qualitätsmerkmal einer Extraktionsmethode ist, wird für diese Arbeit eine quantitative Methode zur Bestimmung dieser Glucane entwickelt. Sie basiert auf der Reaktion zwischen dem Farbstoff Kongorot und der Triplehelix, welche zu einem bathochromen Shift des Absorptionsspektrums von Kongorot führt.

Neben dieser Methode wird eine quantitative fluorimetrische Methode zur Bestimmung der Gesamt- β -Glucane adaptiert (Ko und Lin 2004). Durch den Vergleich der Ergebnisse beider Methoden ist es somit möglich, den Anteil an triplehelicalen Glucanen am Gesamt- β -Glucangehalt zu bestimmen. Des Weiteren

ermöglichen diese Methoden eine exakte Quantifizierung der Ausbeuten sowohl der neuartigen Extraktionsmethode als auch der Literaturmethode.

Neben der Glucanbestimmung wird eine quantitative Bestimmung des Chitinhalt in den verwendeten Zellmaterialien durchgeführt. Hierzu wird ebenfalls eine neuartige Bestimmungsmethode entwickelt, da bekannte Methoden bei komplexen Probenmatrizes nur unzureichende Resultate erzielen. Die Ergebnisse der Chitinbestimmung sind für diese Arbeit besonders relevant, da mit ihnen das Verhältnis von Chitin zu eingesetzter Chitinase bei der Entwicklung der Extraktionsmethode genau bestimmt und notfalls variiert werden kann.

Darüber hinaus werden in dieser Arbeit die Eigenaktivitäten der Chitinasen und der β -Glucanase in den verschiedenen Zellmaterialien ermittelt. Diese Eigenaktivitäten können mitunter einen nicht vernachlässigbaren Einfluss auf die enzymatische Extraktion haben, weshalb diese im Vorfeld zu bestimmen sind. So kann zum Beispiel eine hohe Chitinaseaktivität der Zellmaterialien die Menge an extern zugesetzter Chitinase signifikant verringern.

Die hier vorliegende Arbeit umfasst somit folgende aufeinander aufbauende Arbeitspakete:

- Vorbereitende Versuche
 - Bestimmung der Wachstumsraten der Pilzzellkulturen auf verschiedenen Nährmedien
 - Entwicklung einer Methode zur Chitinbestimmung
 - Bestimmung der Chitingehalte in den untersuchten Pilzen
 - Quantifizierung der Eigenenzymaktivitäten (Chitinase und Glucanase)
 - Entwicklung und Optimierung quantitativer Analysemethoden zur Bestimmung der β -Glucane
- Entwicklung einer enzymatischen Extraktionsmethode
 - Bestimmung der effektiven β -Glucanausbeuten der entwickelten Extraktionsmethode
- Quantifizierung der β -Glucanausbeuten einer ausgewählten Literaturmethode
- Strukturanalytische Charakterisierung der erhaltenen Produkte beider Extraktionsmethoden

Die so erhaltenen Ergebnisse sollen genutzt werden, um die erarbeitete Extraktionsmethode zu verifizieren. Dies ermöglicht die Beurteilung der neuartigen Extraktionsmethode vergleichend zum bekannten Extraktionsprinzip unter quantitativ analytischen, strukturanalytischen und weiteren qualitativen Gesichtspunkten.

2. Theorie

2.1 Zellwandgebundene Polysaccharide Echter Pilze

Die Wirkung von β -Glucanen ist eng mit ihrer Struktur verknüpft. Die Struktur wird wiederum stark von der durchgeführten Extraktionsmethode beeinflusst. Im folgenden Abschnitt werden die Zusammenhänge zwischen Struktur, Wirkung und Extraktionsmethode erläutert und die Perspektiven der in dieser Arbeit entwickelten Extraktionsmethode aufgezeigt.

β -Glucane sind Monosaccharidketten mit einem β -1,3-glykosidisch verknüpften Zuckergrundgerüst und Molekulargewichten von bis zu $1 \cdot 10^6$ Da (Steibüchel et al. 2002). Glucane können mit weiteren Zuckerketten verknüpft sein. Die häufigste Seitenverknüpfung ist die β -1,6-glykosidische Bindung mit einer weiteren β -1,3-Kette (Abb. 1).

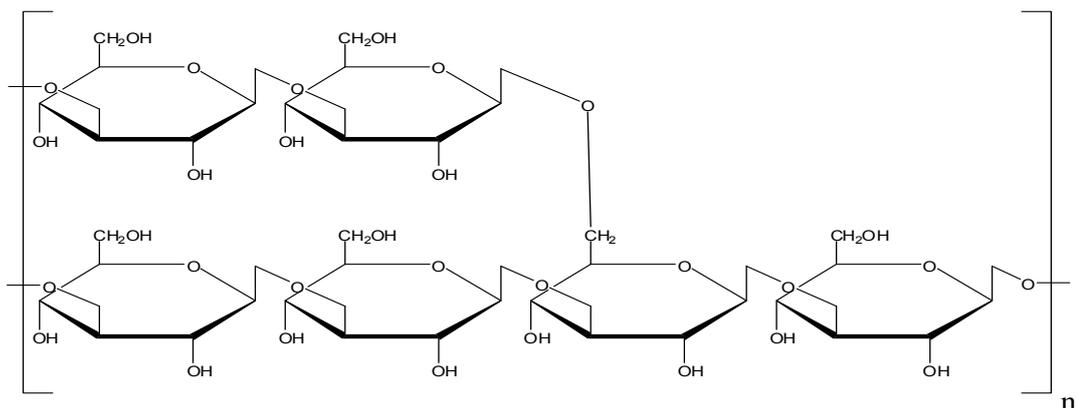


Abb. 1: Struktur eines β -1,3-1,6-Glucans.

Es sind allerdings auch weitere Verknüpfungstypen bekannt (Bohn und BeMiller 1995, Wasser 2002, Zhang et al. 2005). Hierbei unterscheiden sich Pilzglucane je nach Ursprung im Verzweigungsgrad. Das häufigste Monosaccharid dieser Polysaccharide ist die D-(+)-Glucose. Glucane, die nur aus Glucose bestehen, werden auch als Homoglycane bezeichnet. Allerdings sind auch andere Monosaccharide, wie Mannose, Galactose und weitere, in geringen Mengen als Bestandteil von Glucanen nachgewiesen worden (Caborero et al. 2008, Ye et al. 2009, Maity et al. 2011). Solche Glucane werden als Heteroglycane bezeichnet.

Die Struktur der Glucane wird wie erwähnt stark von der gewählten Extraktionsmethode beeinflusst. So entwickelte Chihara in den 1960er Jahren eine Extraktionsmethode für Polysaccharide aus *Lentinula edodes* (Berk.) (Chihara et al. 1969, Chihara et al. 1970). Bei diesem Extraktionsverfahren wird das Zellmaterial zunächst in Wasser gekocht und anschließend mittels einer Ethanol-fällung fraktioniert. Danach wird erneut mit Natriumhydroxid und mit siedendem Wasser extrahiert. So wurden mehrere Fraktionen gewonnen, aus denen das beschriebene Lentinan durch weitere Ethanol-fällungen isoliert werden konnte.

Sietsma und Wessels (1977) erarbeiteten eine weitere Extraktionsmethode, bei der das Zellmaterial mit Natriumhydroxid-, Kaliumhydroxidlösungen und Salzsäure behandelt wird. Diese Methode wird in dieser Arbeit als etablierte Vergleichsmethode verwendet, da in der Forschung bis heute ähnliche Extraktionsschritte zur Isolation von β -Glucanen verwendet werden. So handelt es sich meist um Variationen und Modifikationen dieses grundlegenden Extraktionsprinzips (z.B. Zhang et al. 2007). Heutzutage werden neben der Heißwasserextraktion und dem Einsatz verschiedener Säuren und Laugen weitere mitunter aggressive Substanzen wie z.B. Natriumborhydrid oder Dimethylsulfoxid verwendet (Yoshioka et al. 1985, Zhang et al. 1999). Diese drastischen Extraktionsbedingungen führen zu einer Degradation der Glucanstruktur, wie aktuelle Arbeiten bestätigen (Zhang et al. 2005, Laroche und Michaud 2007).

Da in der Pilzzellwand β -Glucane eng mit Proteinen und vor allem Chitin verknüpft sind (siehe Abb. 2), ist es das Ziel der meisten Extraktionsmethoden mit aggressiven Chemikalien, die kovalenten und nicht kovalenten Bindungen der Glucane mit anderen Zellwandkomponenten, aber auch die Quervernetzung untereinander, zu lösen und somit wasserlösliche Glucane freizusetzen.

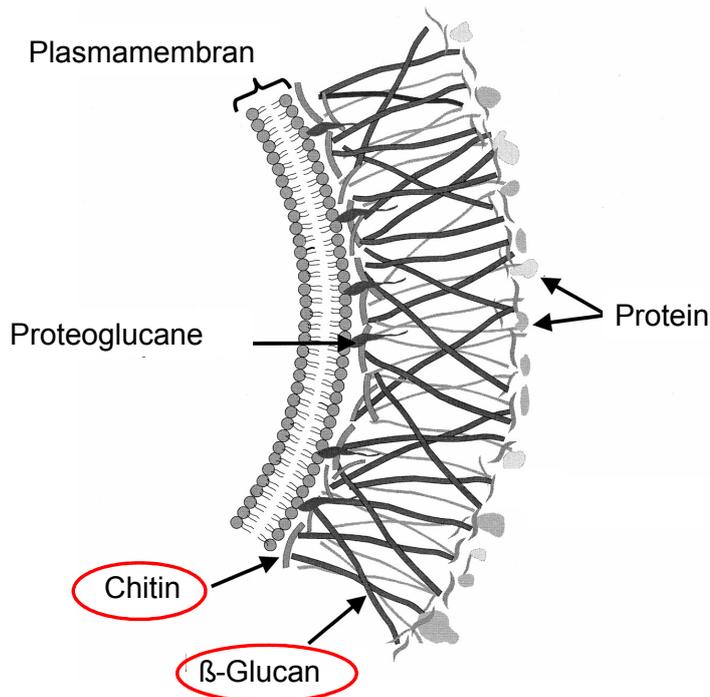


Abb. 2: Schematische Übersicht des Aufbaus der Pilzzellwand Echter Pilze.

Die enge Bindung von β -Glucanen mit Chitin verhindert weitestgehend deren schonende Extraktion. Hierbei sind die Glucane über Wasserstoffbrückenbindungen, aber auch kovalent mit der Chitinmatrix verbunden (Abb. 3) (Sietsma und Wessels 1979, 1981). Um dieses sogenannte „Cross-Linking“ aufzuheben, müssen bei herkömmlichen Extraktionsmethoden aggressive Chemikalien bei hohen Temperaturen eingesetzt werden. Die in dieser Arbeit entwickelte Extraktionsmethode löst hingegen diese Verknüpfung durch den enzymatischen Abbau des Chitins. β -Glucane können anschließend leichter unter milden alkalischen Bedingungen extrahiert werden.

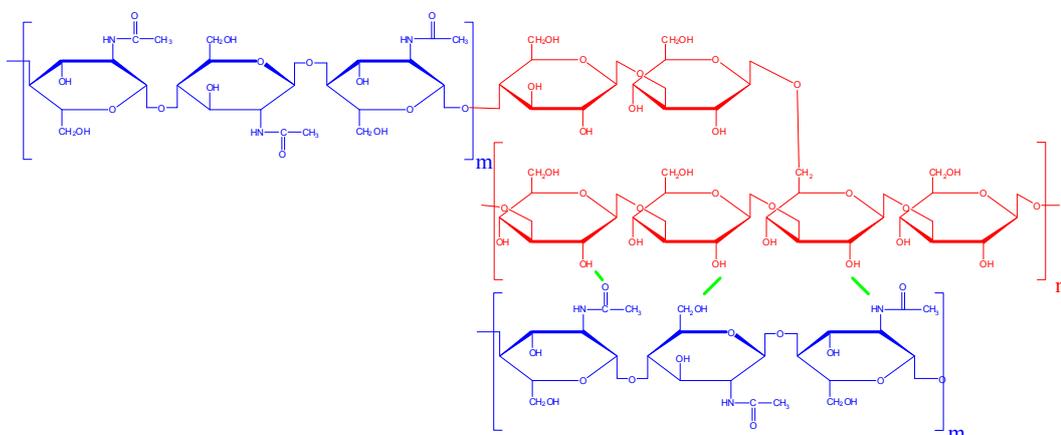


Abb. 3: Formelschema eines β -1,3-1,6-Glucans (rot), kovalent und über Wasserstoffbrückenbindungen (grün) verknüpft mit der Chitinmatrix (blau).

Eine aus der Extraktionsmethode resultierende Strukturzerstörung kann die Wirkung der β -Glucane negativ beeinträchtigen (Maeda et al. 1989, Zhang et al. 2005). Dabei sind sowohl die Primär- als auch die Tertiärstruktur betroffen. Des Weiteren ist nicht geklärt, inwieweit Proteine, die an den Glucanen gebunden sind, die Art und Effektivität der Wirkung beeinflussen (Wasser 2010). Durch aggressive Extraktionsbedingungen kann diese als Proteoglycane bezeichnete Substanzklasse weitestgehend durch Denaturierung und Degradation verloren gehen (siehe Abb. 4). Die Proteinseitenketten könnten allerdings durch den in dieser Arbeit entwickelten Isolationsprozess weitestgehend erhalten bleiben. Neben einer Degradation der Primärstruktur beeinflusst die Denaturierung der Tertiärstruktur negativ die Wirkung der β -Glucane.

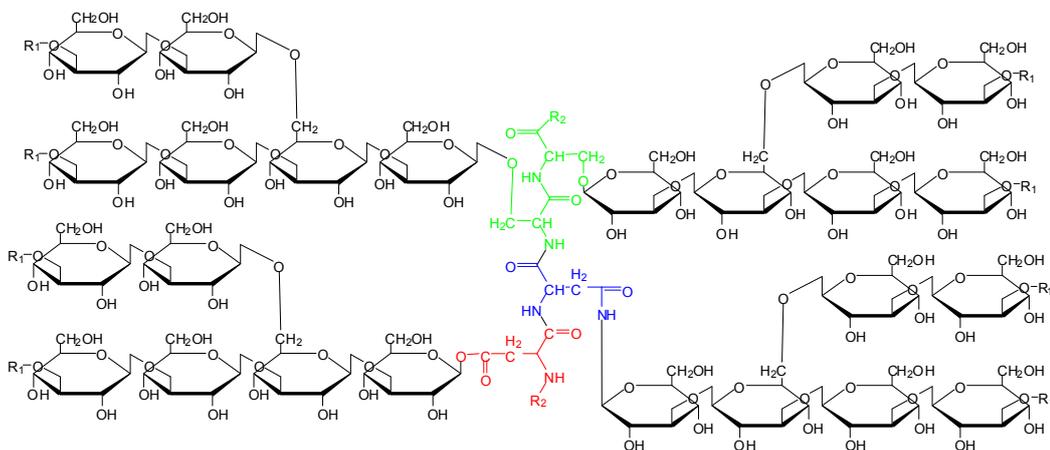


Abb. 4: Formelschema eines Proteoglycans verknüpft mit Asparaginsäure (rot), Asparagin (blau) und Serin (grün).

β -Glucane bilden drei unterschiedliche Tertiärstrukturen aus (Abb. 5). Die Ausbildung hängt jeweils von verschiedenen Faktoren wie der Anzahl an Seitenketten und der Kettenlänge ab, welche wiederum von der Extraktionsmethode beeinflusst werden (Bohn und BeMiller 1995). Die triplehelicale Tertiärstruktur ist eng mit der biologischen Wirkung der Glucane verknüpft (Novak und Vervicka 2008, Steinbüchel et al. 2002, Zhang et al. 2005 und 2007, Busch et al. 2007 a, b, Bohn und BeMiller 1995, Laroche und Michaud 2007, Zhang 2010). Der genaue Zusammenhang ist allerdings noch nicht geklärt (Wasser 2010). Die triplehelicale Tertiärstruktur wird durch alkalische Lösungen, wie sie auch bei herkömmlichen Extraktionsverfahren verwendet werden, denaturiert (Ogawa et al. 1972). Diese Denaturierung kann mitunter irreversible sein (Young und Jacobs 2000).

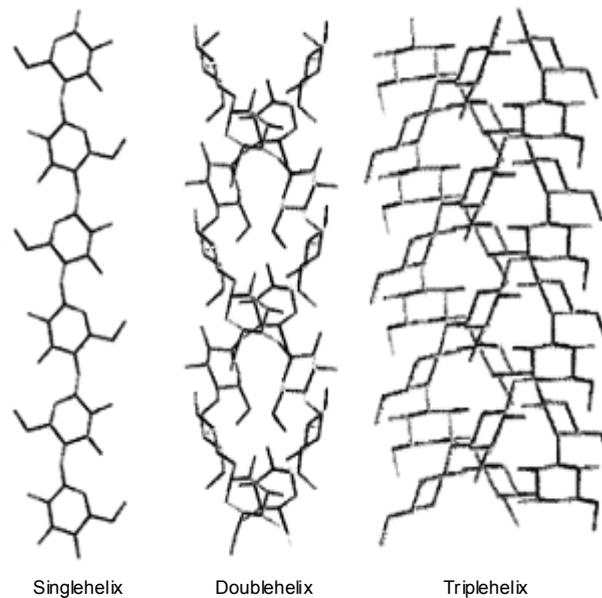


Abb. 5: Mögliche Tertiärstrukturen der β -Glucane (Bohn und BeMiller 1995).

Mit Hilfe der enzymatischen Extraktionsmethode sollen die β -Glucane daher weitestgehend schonend extrahiert werden. Negative denaturierende Effekte auf die Tertiärstruktur werden aufgrund des Extraktionsprinzips wahrscheinlich minimiert. Dies ist wichtig, da besonders β -Glucane, die als Triplehelix vorliegen, eine immunstimulierende Wirkung als „Biological Response Modifier“ besitzen. Dies hat unter anderem einen positiven Effekt auf die Bildung von T-Helferzellen und Makrophagen (Zhang et al. 2007). Der immunstimulierende Effekt dieser pilzlichen Glucane ist vermutlich auch für die antikanzerogene Wirkung verantwortlich (Abb. 6). Daher ist der Erhalt dieser Tertiärstruktur durch eine schonende Extraktionsmethode von großer Bedeutung.

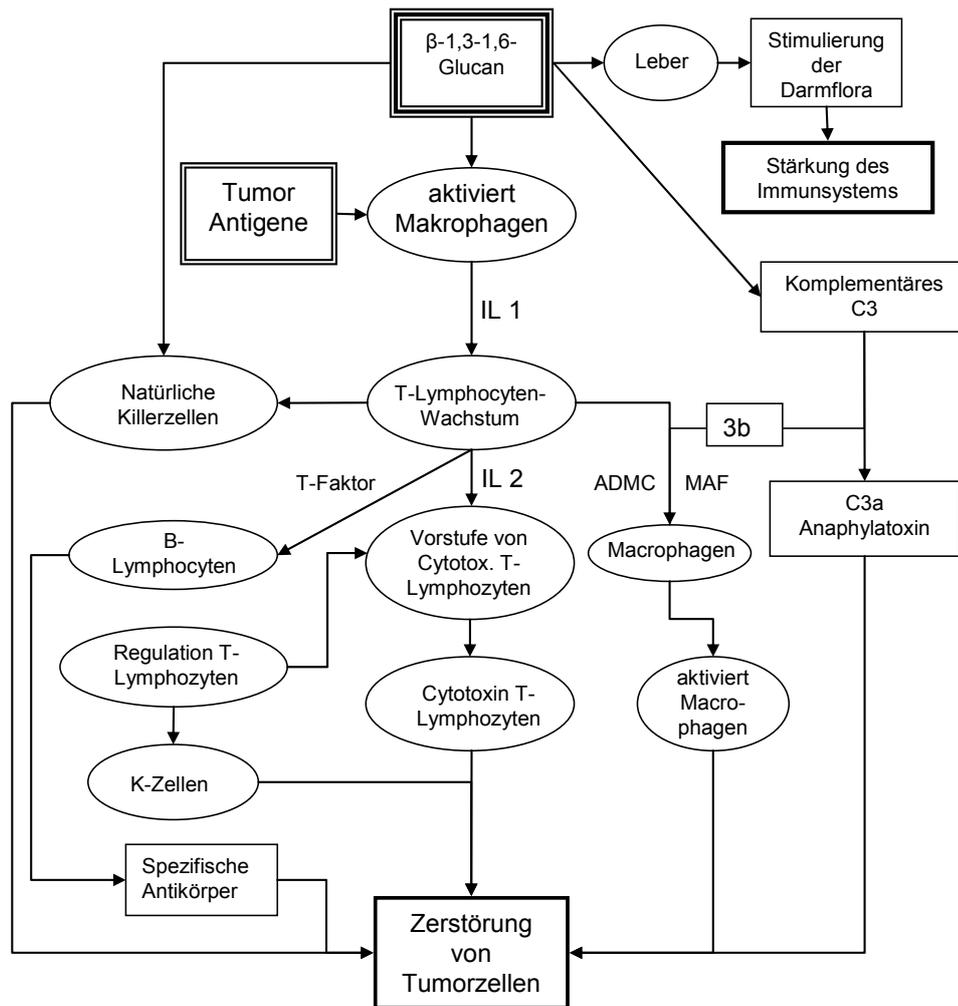


Abb. 6: Antikanzergene Wirkung von β -Glucanen nach Mizuno et al. (1999).

Die Art der Wirkung gegen spezifische Tumorarten hängt zudem stark von der Struktur der Glucane ab, welche wiederum von der gewählten Extraktionsmethode abhängig ist. Die Beeinflussung der Struktur durch die Art der Extraktion macht die Dringlichkeit der Entwicklung von schonenden Extraktionsverfahren deutlich (Bohn und BeMiller 1995, Novak und Vervicka 2006, Wasser 2010). Mit der in dieser Arbeit entwickelten Extraktionsmethode soll ein Ansatz auf enzymatischer Basis entwickelt werden. Das Prinzip des schonenden Abbaus der Zellwandkomponente Chitin, nachfolgenden schonende alkalische Extraktionsschritte sowie die Inkubation mit β -Glucanase sollen eine Extraktion unter einem nahezu vollständigen Erhalt der Glucanstruktur gewährleisten. Damit unterscheidet sich diese Methode von Literaturmethoden, bei denen dies nahezu vollständig außer Acht gelassen wird. Dadurch wird ein strukturanalytischer Vergleich dieser mit einer Literaturmethode unabdingbar und in dieser Arbeit durchgeführt.

Nicht nur bei den in der Literatur beschriebenen Labormethoden werden mehrheitlich alkalische Extraktionen durchgeführt, sondern auch bei der technischen Gewinnung von β -Glucanen. Gegenüber der auch angewendeten Heißwasserextraktion haben sie den Vorteil, dass sie höhere Ausbeuten erzielen (Liu et al. 2008). Aktuelle technische Extraktionen basieren auf eben diesem Einsatz von Laugen und Säuren (Cui und Chisti 2003, Patent WO/2002/085950). Allerdings sind auch Ausnahmen bekannt. So wird das Polysaccharid Schizophyllan von *Schizophyllum commune* (Fr.) von diesem unter bestimmten Kulturbedingungen in nutzbaren Mengen sekretiert (Rau 1999). In der Regel muss aber auf eine Extraktion aus der Zellwand zurückgegriffen werden. Bereits erhältliche Präparate wie das Lentinan werden auf diese nicht schonende Weise gewonnen (Zhang et al. 2007, Busch et al. 2007 a, b).

Durch die beschriebene immunstimulierende und antikanzerogene Wirkung fanden bereits einige β -Glucane ihren Weg in die medizinische Anwendung. So wird Lentinan als Adjuvant in der Krebstherapie eingesetzt. Aber auch andere Glucane wie das Polysaccharid-K (PSK) aus *Trametes versicolor* (Fr.) ist in asiatischen Ländern und in Australien, in Kombination mit anderen Substanzen, als Adjuvant erhältlich (Busch et al. 2007 a, b). Aufgrund ihrer positiven Eigenschaften sind β -Glucane als Pharmaka, aber auch als Nahrungsergänzungsmittel sowie als Functional Food von besonderem Interesse. Auch andere Anwendungen, zum Beispiel in der kosmetischen Industrie, sind denkbar. Allerdings sind nur wenige dieser Präparate erhältlich, da die Extraktion und Aufreinigung aktuell teuer und zeitaufwendig ist. Dies macht die Entwicklung von neuen strukturschonenden Extraktionsmethoden ebenfalls erforderlich (Smith et al. 2002, Wasser 2010). So wurde bereits eine neuartige Extraktionsmethode entwickelt, die Glucane mit einer „Nanoknife-Methode“ isoliert (Park et al. 2009). Bei dieser Methode werden verschiedene Nanopartikel der Extraktion zugegeben, was die Ausbeute an β -Glucanen steigert.

Weitere Publikationen beschreiben die Extraktion von Glucanen unter erhöhtem Druck oder eine Vorbereitung der Extraktion mit Mikrowellen (Lo et al. 2007, Ying und Fubao 2009). Eine weitere Alternative zu den konventionellen nicht schonenden Extraktionsmethoden soll in dieser Arbeit entwickelt werden. Die erhaltenen Glucane könnten sich maßgeblich von denen unterscheiden, die durch chemischen Aufschluss gewonnen werden. So gewonnene neuartige Glucan-

produkte haben somit eine enorme Perspektive für zukünftige Anwendungen. Besonders die Nutzung des Mycels ist neuartig. Über die Glucane aus dem Mycel ist wenig bekannt (siehe 2.3). Somit könnten die in dieser Arbeit gewonnenen Glucane eine weitere Besonderheit darstellen.

2.2 Theoretische Grundlagen der enzymatischen Extraktion

In diesem Abschnitt wird das Prinzip der enzymatischen Extraktion theoretisch erläutert und der theoretische Aspekt der Methode erklärt.

Das Prinzip der enzymatischen Methode ist neuartig und für Glucanextraktionen aus Echten Pilzen nicht bekannt. Es wurden zwar erste Arbeiten, die Enzyme zur Gewinnung von β -Glucanen aus echten Pilzen nutzen, von Wong und Cheung (2009) beschrieben. Das Prinzip des von Wong und Cheung entwickelten Verfahrens unterscheidet sich allerdings von der in dieser Arbeit beschriebenen enzymatischen Methode erheblich. Bei der Methode von Wong und Cheung wird das Zellmaterial von Pilzen, z.B. *Pleurotus tuber-regium* (Fr.), mittels ausgewählter Enzyme wie α -Amylasen und Proteasen behandelt und so ein β -glucanhaltiger Rückstand gewonnen, der als sclerotaler Ballaststoff bezeichnet wird. Die Anwendung dieser Ballaststoffe als Functional Food wurde ebenfalls diskutiert (Wong und Cheung 2005, Wong und Cheung 2009). Allerdings werden hier vor allem schwer wasserlösliche Glucane gewonnen. Die Aufnahme dieser Glucane in den menschlichen Organismus ist nur bedingt möglich (Wasser 2010). Das Prinzip des direkten enzymatischen Aufschlusses zur Extraktion von wasserlöslichen Glucanen ist bei Basidiomyceten und Ascomyceten nicht bekannt.

Die in dieser Arbeit entwickelte Methode soll somit erstmals wasserlösliche β -Glucane auf eine neuartige, schonende Art isolieren und so zu neuartigen Produkten führen. Die erhaltenen löslichen Glucanprodukte sollten für eine Anwendung besser geeignet sein.

Sämtliche Extrakte, auch die der zu vergleichenden Literaturmethode, werden neutralisiert. Somit werden nur die wasserlöslichen Glucane gewonnen, da diese besonders interessant für spätere Anwendungen sind. Diese sind für die Aufnahme in den menschlichen Organismus besonders geeignet (Wasser 2010).

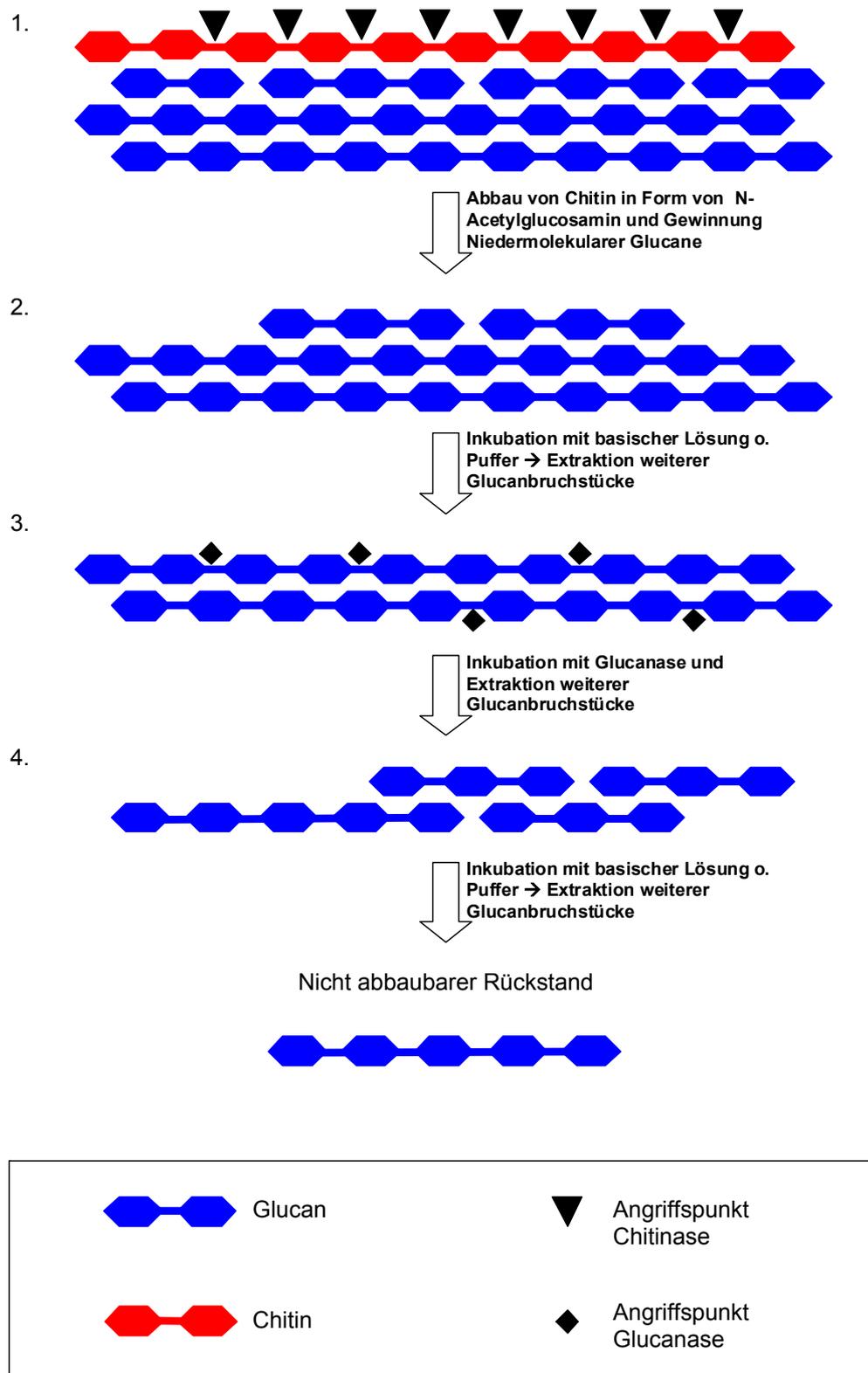


Abb. 7: Darstellung der enzymatischen Extraktion.

Abbildung 7 zeigt schematisch das theoretische Prinzip des enzymatischen Aufschlusses, anhand dessen später die Extraktionsmethode entwickelt werden soll. Der erste Schritt ist der Abbau der Chitinmatrix mit Hilfe von Chitinasen. In der zu entwickelnden Extraktionsmethode lassen sich diese Enzyme nutzen, um den Zellwandbestandteil Chitin abzubauen (Schritt 1). Dadurch wird das „Cross-Linking“ mit Glucanen aufgehoben und die Glucane können bereits mit schonenden Extraktionsschritten in Lösung gebracht werden (Schritt 2). Anschließend sollen mit Hilfe einer Endo- β -Glucanase die verbliebenen schwer- und unlöslichen Glucane zu kleineren, dann löslichen Bruchstücken abgebaut werden (Schritt 3). Dieser Schritt muss kontrolliert ablaufen, da eine zu intensive Inkubation mit Glucanase zu einem partiellen Verlust der wichtigen triple-helicalen Tertiärstruktur führen könnte (Zhang et al. 2005).

In einem vierten Schritt sollen dann alkalisch lösliche Glucane mit einem geeigneten Extraktionsschritt in Lösung gebracht werden. Diese Extraktionsmethode verzichtet somit auf den Einsatz von aggressiven Substanzen in Kombination mit einer thermischen Beanspruchung des Probenmaterials. Die so erhaltenen Glucane sollten daher unter weitestgehendem Erhalt ihrer Primär- und Tertiärstruktur isoliert werden können.

2.3 Theoretische Grundlagen der Strukturanalytik von β -Glucanen aus Pilzen

Mit der in dieser Arbeit entwickelten enzymatischen Extraktionsmethode sollen β -Glucane wie bereits erwähnt unter Erhalt ihrer Struktur isoliert werden. Um dies zu belegen, müssen die Strukturen der isolierten Glucane bestimmt und anschließend mit den Strukturen herkömmlich isolierter Glucane verglichen werden.

In diesem Abschnitt werden die dazu nötige Aufreinigung der Glucane und die strukturanalytischen Methoden theoretisch beschrieben. Die Aufreinigung sowie die Methoden der Kernresonanzspektroskopie (NMR), die Bestimmung der Monosaccharidzusammensetzung und die Methode der Gelpermeationschromatographie (GPC) werden für diese Arbeit modifiziert und anschließend adaptiert.

Für eine strukturanalytische Charakterisierung ist eine Aufreinigung zwingend notwendig, da Verunreinigungen die Methoden maßgeblich beeinflussen können.

β -Glucane müssen meist mit verschiedenen Methoden aufgereinigt werden, um alle Verunreinigungen zu entfernen. Meist handelt es sich um eine Kombination verschiedener Techniken wie die fraktionierte Ethanol- oder Essigsäurefällung, Gelpermeationschromatographie, Affinitätschromatographie, Ionenaustauschchromatographie und Dialyse (u.a. Zhang et al. 2007). Ziel dieser Methoden ist es, die Verunreinigungen ohne größere Produktverluste zu entfernen. Die durchgeführten Fällungen aber auch die Gelpermeationschromatographie und Dialyse dienen der Abtrennung niedermolekularer Verunreinigungen. Die in den Rohextrakten ebenfalls vorliegenden Proteine werden meist mit einer Kombination verschiedener Ionenaustauschermaterialien abgetrennt. Problematisch ist hier allerdings der partielle Verlust an Proteoglycanen. Es existieren zudem affinitätschromatographische Säulenmaterialien, die spezifisch an Polysacchariden, welche spezielle Monosaccharide oder Proteinreste besitzen, binden. Diese werden allerdings nur zur Isolierung definierter Glucanstrukturen genutzt (Wasser 2002, Zhang et al. 2007). Eine chromatographische Aufreinigung wird in Kombination mit einer speziellen Zentrifugenfiltrationstechnik in dieser Arbeit ebenfalls angewendet (siehe Abschnitt 3 ff.)

In der neueren Forschung wurden einige dieser Polysaccharide isoliert, wie beschrieben aufgereinigt und anschließend charakterisiert (z.B. Wasser 2002, Zhang et al. 2007, Busch et al. 2007 a, b). So wurden zum Beispiel Lentinan bzw. Schizophyllan aus *Lentinula edodes* und *Schizophyllum commune* als β -1,3-1,6-Glucane identifiziert. Tabelle 1 gibt eine Übersicht über ausgewählte Glucane aus verschiedenen Pilzen. Vergleiche mit bereits identifizierten und charakterisierten Glucanen mit den enzymatisch extrahierten Glucanen sind hierbei besonders interessant.

Tab. 1: Beispiele verschiedener Glucane aus Pilzextrakten.

Typ des Glucans (Name)	Organismus	Quelle
β -1,3-1,6-Glucan (Lentinan)	<i>Lentinula edodes</i>	Chihara et al. 1970
α -1,,3- β -1,6-Glucan	<i>Lentinula edodes</i>	Zhang et al. 1999
β -1,3-1,6-Glucan (Pleuran)	<i>Pleurotus ostreatus</i> (Jacq.)	Cabonero et al. 2006
β -1,3-1,6-Glucan	<i>Pleurotus eryngii</i> (Dc.)	Synytsya et al. 2008
β -1,3-1,6-Glucan	<i>Pleurotus pulmonarius</i> (Fr.)	Smiderle et al. 2008
α -1,4- β -1,3-Glucan	<i>Trametes versicolor</i>	Ng 1996
β -1,3-1,4-1,6-Glucan (PSK)	<i>Trametes versicolor</i>	Trnovec und Hrmová 1993
β -1,3-1,6-Glucan (Grifolan)	<i>Grifola frondosa</i> (Dicks.)	Inio et al. 1986
β -1,3-1,6-Glucan (Flamulin)	<i>Flammulina velutipes</i> (Curt.)	Smiderle et al. 2006
α -1,2- β -1,3-1,6-Glucan	<i>Pleurotus pulmonarius</i>	Pramanik et al. 2007

Die medizinische und biochemische Forschung beschränkt sich jedoch auf wenige aus der TCM bekannte Pilze wie *Lentinula edodes* oder *Pleurotus ostreatus*. In dieser Arbeit werden erstmals auch Arten wie *Morchella esculenta* (Fr.) oder *Hypsizygus tessulatus* (Bull.) untersucht, die wissenschaftlich nur wenig beschrieben sind (siehe 3.2.1.3). Des Weiteren sind nur wenige Glucane aus Mycelien charakterisiert worden. In der vorliegenden Arbeit werden diese vorrangig analysiert.

In der Literatur wurden für die Strukturaufklärung zahlreiche Methoden beschrieben. Bereits nachdem Chihara et al. (1969 und 1970) das Polysaccharid Lentinan isolierten und die antikanzerogene Wirkung dieser Substanz nachgewiesen hatten, wurden Arbeiten zur Strukturaufklärung durchgeführt. Von Sasaki und Takasuka (1975) sowie später von Saitô et al. (1977) wurden strukturanalytische Methoden entwickelt oder bestehende für die Glucanalytik adaptiert. Mit diesen Methoden konnten sie die Struktur des β -1,3-1,6-Glucans Lentinan aufklären. Bis zum heutigen Tag hat sich bis auf ein paar Ausnahmen die Auswahl der Methoden, die zur Strukturaufklärung genutzt werden, nicht geändert. Mit Hilfe neuerer apparativer Voraussetzungen und wissenschaftlicher

Erkenntnisse konnten die Analysemethoden allerdings stetig optimiert werden. Daher konnten bereits zahlreiche Glucane aus verschiedenen Pilzen identifiziert und charakterisiert werden (z.B.: Wasser 2002, Zhang et al. 2007, Busch et al. 2007 a, b).

Strukturanalytischen Erkenntnisse sind aufgrund der engen Beziehung zwischen der Struktur des Glucans und der Wirkung von besonderem Interesse (Bohn und BeMiller 1995, Zhang 2005, Zhang 2010). Für eine komplette Charakterisierung der Struktur muss die kovalente Struktur, die Monosaccharidzusammensetzung der Glucane, die Konfiguration der glykosidischen Bindungen, die auftretenden Verzweigungen, die Molekularmasse und die Konformation der Polysaccharide aufgeklärt werden.

Es werden hierfür verschiedene analytische Methoden wie z.B. ein kontrollierter Smith-Abbau oder eine Methylierungsanalyse durchgeführt (z.B. Sasaki und Takasuka 1975, Rout et al. 2005, Cabanero et al. 2006, Rhee et al. 2008).

Die Monosaccharidzusammensetzung wird meist gaschromatographisch bestimmt. Hierfür wird das Polysaccharid zunächst hydrolysiert. Die erhaltenen Monosaccharide werden dann in der Regel mit Natriumborhydrid zu ihren entsprechenden Alditolen reduziert und durch Acetylierung für die Gaschromatographie zugänglich gemacht (Blakeney et al. 1983). Neben dem Hauptmonosaccharid Glucose konnten zahlreiche Monosaccharide wie Mannose, Galactose, Xylose oder Fucose nachgewiesen werden (z.B. Ng 1998, Carbonero et al. 2006, Smiderle 2008). Aus den Untersuchungen geht hervor, dass es sich bei Pilzglucanen vorwiegend um Heteroglycane handelt (z.B. Ng 1998, Carbonero et al. 2006, Smiderle 2008). Diese gaschromatische Bestimmung wird auch in dieser Arbeit durchgeführt.

Zur Bestimmung von Molekularmassen wird meistens auch die in der vorliegenden Arbeit adaptierte Gelpermeationschromatographie verwendet. Hier werden die Glucane anhand ihrer Molekularmasse mit verschiedenen Säulenmaterialien chromatographisch getrennt. Mithilfe von Größenstandards kann anschließend das Molekulargewichtprofil eines Glucans bestimmt werden (Hara et al. 1982, Mizuno et al. 1990, Ma et al. 1991, Pramanik et al. 2007, Baker et al. 2008). Eine Detektion der Glucane erfolgt entweder durch einen MALLS-Detektor (multi angle laser light scattering) oder durch gezielte Fraktionierung und anschließender spezifischer Detektion der Glucane (Mizuno et al. 1990, Ma

et al. 1991, Leung et al. 1997, Pramanik et al. 2007). Die Beziehung zwischen Wirkung und Molekularmasse der Glucane ist viel diskutiert (Kulicke et al. 1996, Cleary et al. 1999, Zhang et al. 2005, Wasser 2010). So konnte gezeigt werden, dass Glucane mit höherer Molekularmasse eine gesteigerte Wirkung im Vergleich zu Glucanen mit geringerer Molekularmasse besitzen (Mantovani et al. 2007, Zhang et al. 2007, Wasser 2010). Allerdings zeigen Glucane mit geringerer Molekularmasse deutlich bessere Eigenschaften hinsichtlich ihrer Löslichkeit sowie ihrer Aufnahme in den menschlichen Organismus (Mantovani et al. 2007, Zhang et al. 2007, Wasser 2010). Dies macht deutlich, wie wichtig die Bestimmung der mittleren Molekularmasse der Glucane eines Pilzes ist.

Die Konformation der β -Glucane wird durch verschiedene Verfahren, wie zum Beispiel durch die Rasterkraftmikroskopie oder verschiedene Röntgenbeugungsanalysen bestimmt (Kiho et al. 1992, Chenghua et al. 2000, Rout et al. 2005, Chakraborty et al. 2006, Zhang et al. 2007).

Die wichtigste strukturanalytische Methode ist die Kernresonanzspektroskopie. Mit Hilfe verschiedener ein- und zweidimensionaler Experimente lassen sich Aussagen über die anzutreffenden glykosidischen Verknüpfungen und Verzweigungen treffen (z.B. Gonzaga et al. 2004, Rout et al. 2005, Cabanero et al. 2006, Pramanik et al. 2007, Gosh et al. 2008, Roy et al. 2009). Diese Informationen sind essentiell für die Identifizierung der Struktur. Aufgrund der Effektivität der NMR-Spektroskopie bei der Strukturaufklärung von Glucanen wird diese auch in dieser Arbeit durchgeführt und zum Beispiel einer Methylierungsanalyse vorgezogen.

Bei der NMR-Spektroskopie lässt sich über die charakteristischen Verschiebungen der jeweiligen Signale der Kohlenstoff oder der Wasserstoffatome und ihren intramolekularen Kopplungen Aussagen über die stereochemische Konfiguration der glykosidischen Bindungen mit hoher Präzision treffen. Besonders interessant sind hier die Signale der anomeren Kohlenstoff- und Wasserstoffatome bzw. die Signale der Atome an den Verknüpfungspunkten, da hier einfach die Konformation bestimmt werden kann.

In Abbildung 8 ist beispielhaft das ^1H -NMR- und ^{13}C -NMR-Spektrum eines Glucans abgebildet.

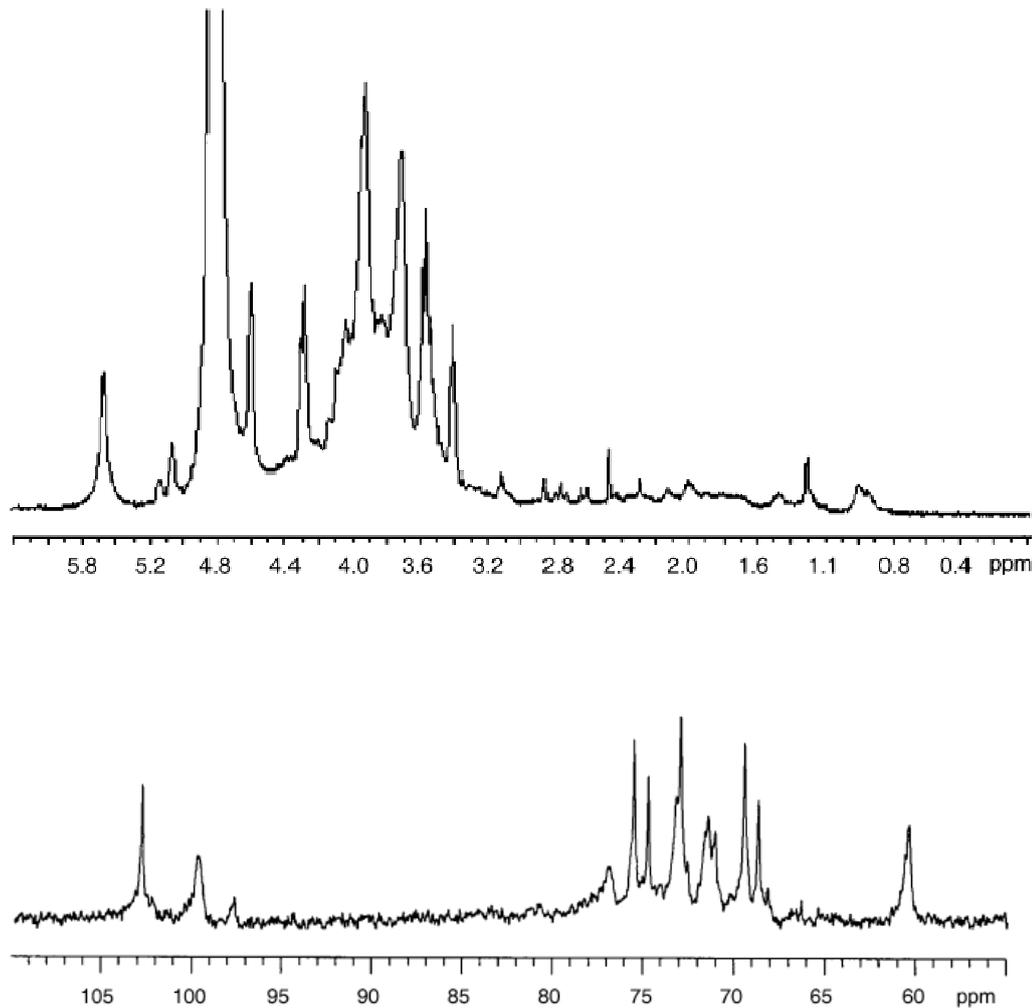


Abb. 8: ^1H -NMR- (oben) und ^{13}C -NMR-Spektrum (unten) eines α -1,4- β -1,6-Glucans aus *Agaricus brasiliensis* (Peck.) (Gonzaga et al. 2004).

Die Kombination der verschiedenen strukturanalytischen Techniken erlaubt es, die Struktur der isolierten Glucane weitgehend zu charakterisieren. Wie erwähnt werden die beschriebenen Methoden der NMR-Spektroskopie, der Monosaccharidbestimmung und der GPC in dieser Arbeit verwendet. Dies ermöglicht zum einen die strukturanalytische Charakterisierung der isolierten Glucane, zum anderen können so die Produkte der enzymatischen Methode und der Literaturmethode hinsichtlich ihrer Struktur eindeutig verglichen werden.

2.4 Quantitative Analytik der Zellwandpolysaccharide von Basidiomyceten und Ascomyceten

Neben dem strukturanalytischen Vergleich der durch die Literatur- und der enzymatischen Methode extrahierten Glucane soll auch ein Vergleich der Ausbeuten an Glucanen durchgeführt werden. Die Bestimmung der Ausbeuten und der Vergleich dieser mit denen eines bekannten Extraktionsprozesses sind wichtig, um die Effektivität der neuartigen Methode im Verhältnis zu Literaturmethoden zu bestimmen.

Für die β -Glucanbestimmungen sollen hierfür verschiedene quantitative Methoden entwickelt oder modifiziert werden (siehe 2.4.1 und 2.4.2).

Bekannte Methoden zur β -Glucanbestimmung basieren auf der enzymatischen Hydrolyse der zu analysierenden Glucane und der anschließenden Bestimmung der freigesetzten reduzierenden Zucker. Manzi und Pizzoferrato (2000, 2001) analysierten nach diesem Bestimmungsprinzip den β -Glucangehalt verschiedener Speisepilzarten. Sie wiesen in *Pleurotus pulmonarius* 0,58 g, in *Pleurotus eryngii* 0,38 g und in *Lentinula edodes* 0,22 g/100 g Trockenmasse nach. Allerdings wurden die Polysaccharide vorher nicht aus dem Zellmaterial isoliert.

Brauer et al. (2007) konnten mit einer ähnlichen Methode ebenfalls vergleichbare Glucangehalte bestimmen. Andere Arbeitsgruppen isolierten zunächst die Glucane und führten anschließend die Hydrolyse am isolierten Polysaccharid durch. Hier konnten deutlich höhere Werte ermittelt werden (Park et al. 2003, Synytsya et al. 2008, Rhee et al. 2008). Die Gehalte lagen bei 8,3 g für den Fruchtkörper von *Inonotus obliquus* (Ach.) und 10,1 g für den Fruchtkörper von *Agaricus brasiliensis* bezogen auf 100 g Trockenmasse. Problematisch ist bei diesen Methoden, dass die vollständige Hydrolyse der Glucane nach wie vor nicht gewährleistet werden kann, da sie stark von der Struktur des Glucans sowie der Wahl der Enzyme abhängt (Synytsya et al. 2008).

Eine nicht auf Hydrolyse basierende Bestimmung der β -Glucane ist aufgrund der erwähnten Problematik vorzuziehen. Daher soll später die in Abschnitt 2.4.1 beschriebene fluorimetrische Methode nach Ko und Lin (2004) zur Bestimmung der Gesamt- β -Glucanausbeuten verwendet werden. Die Methode wurde hierfür entsprechend der untersuchten Proben adaptiert und modifiziert.

Wie auch die auf Hydrolyse basierenden Methoden unterscheidet diese nicht zwischen den einzelnen Tertiärstrukturen. Eine Quantifizierung der besonders

wirksamen triplehelicalen Glucane ist daher nicht möglich. Ein interessanter Ansatz zur Bestimmung dieser Glucane ist die ELISA-Methode von Mizuno et al. (2001). Allerdings variieren bei dieser Methode die gemessenen Glucangehalte in Abhängigkeit der verwendeten Antikörper. Somit ist die Spezifität der erhaltenen Antikörper neben ihrer zeitaufwändigen Produktion das Hauptproblem dieser Methode. Daher wird für diese Arbeit eine spezielle und direkte Analyse-methode für die Bestimmung der triplehelicalen Glucane entwickelt (siehe 2.4.2). Des Weiteren wird eine Bestimmungsmethode für Chitin entwickelt. Da die in dieser Arbeit entwickelte Methode auf den enzymatischen Abbau von Chitin basiert, ist gerade die Bestimmung dieses Polysaccharids wichtig, um ein kontrolliertes Verhältnis zwischen Substrat und Enzym zu gewährleisten. Diese Methode ist in Abschnitt 2.4.3 theoretisch beschrieben.

Für die in dieser Arbeit entwickelten Extraktionsmethoden wird anschließend eine Methodvalidierung durchgeführt, um die Anwendbarkeit der Methoden statistisch zu belegen.

2.4.1 Theoretische Grundlage der quantitativen Bestimmung der Gesamt- β -Glucane mit Anilinblau

Wie bereits erwähnt ist eine fluorimetrische Methode bekannt, mit der sich spezifisch β -1,3-Glucane bestimmen lassen (Ko und Lin 2004). Diese soll aufgrund der hohen Präzision der Methode zur Bestimmung der Gesamt- β -Glucanausbeuten für diese Arbeit adaptiert werden. Im Folgenden wird die Methode theoretisch vorgestellt.

Zunächst wird bei der Methode nach Ko und Lin (2004) das Glucan mit 6 molarer Natronlauge denaturiert, um anschließend die nun als Singlehelix vorliegenden β -Glucane mit Anilinblau (Abb. 9) zu detektieren. Aufgrund des alkalischen Arbeitsmediums liegen alle Glucane unabhängig ihrer Tertiärstruktur bei pH 9,5 als Singlehelix vor, so dass praktisch der Gesamtgehalt aller β -1,3-Glucane ermittelt wird.

Hierbei wird Anilinblau, ein fluoreszierender Farbstoff, der mit singlehelicalen β -1,3-Glucanen spezifisch einen Komplex eingeht, zur Bestimmung verwendet.

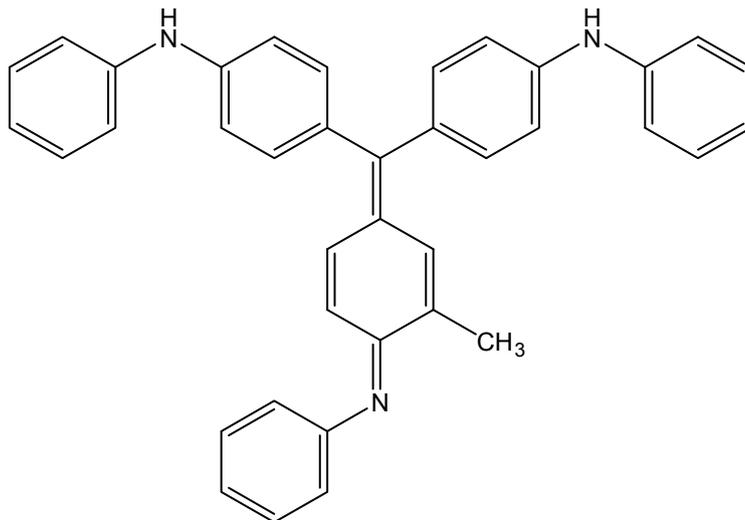


Abb. 9: Formelschema des Farbstoffes Anilinblau.

Mit dieser hier theoretisch beschriebenen Methode können die Gehalte und Ausbeuten an Gesamt- β -Glucanen bei den angewendeten Extraktionsmethoden bestimmt werden. Die Ausbeuten sind ein besonders wichtiger Punkt bei dem Vergleich der neu entwickelten enzymatischen Extraktionsmethode mit der herkömmlichen Literaturmethode.

2.4.2 Theoretische Grundlage der quantitativen Bestimmung triplehelicaler β -Glucane mit Kongorot

Zum jetzigen Zeitpunkt sind wie erwähnt keine verlässlichen Methoden zur Bestimmung dieser wichtigen β -Glucane bekannt. Gerade Glucane mit dieser Tertiärstruktur sind jedoch besonders wirksam (siehe 2.1).

Da aggressive Extraktionsschritte, wie die in der Literaturmethode angewendeten, mitunter die Triplehelix der Glucane irreversibel denaturieren können, ist eine Bestimmung von Glucanen mit dieser Tertiärstruktur besonders interessant. Die Gehalte an triplehelicalen Glucanen können als ein Qualitätsmerkmal der Methoden dienen und sind wichtige Daten im direkten Vergleich der Literaturmethode mit der enzymatischen Extraktionsmethode. Im Folgenden wird die hierfür entwickelte Methode theoretisch erläutert.

Kongorot ist eine als Textilfarbstoff bekannte Substanz, welche in der Mikroskopie zur spezifischen Anfärbung der Zellwände von Pilzen verwendet wird. Seine Strukturformel ist in Abbildung 10 dargestellt. Der Farbstoff lagert sich in

der Zelle an Glucane an, was zu einer dunkelroten Färbung der Zellwand führt (Abb. 11).

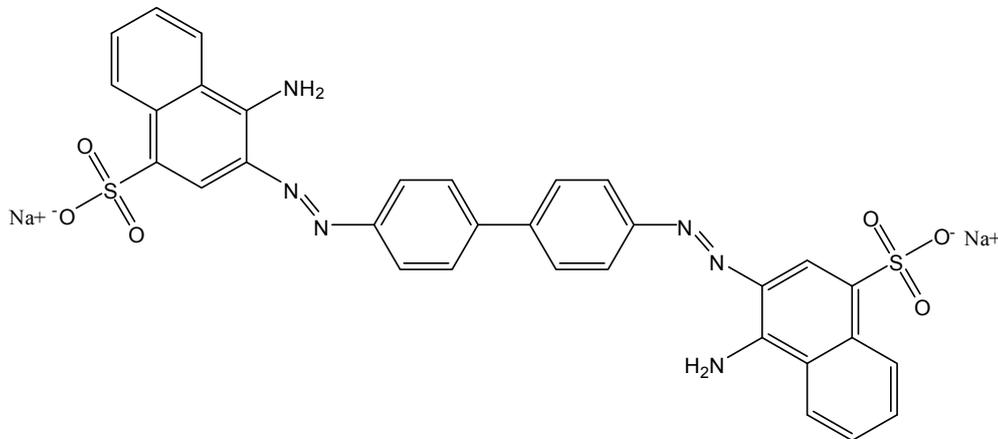


Abb. 10: Formelschema des Farbstoffes Kongorot.

Sense und Cramer (1969) untersuchten die Absorptionsspektren verschiedener Azofarbstoffe mit Cyclodextrinen und Amylose in wässriger Lösung. Hier konnte keine Bathochromie von Kongorot beobachtet werden. Ogawa et al. (1972) konnten hingegen wenige Jahre später von einem Komplex zwischen Kongorot und β -1,3-Glucanen berichten, der zu einem bathochromen Shift des Absorptionsmaximums führte.



Abb. 11: Lichtmikroskopische Aufnahme des vegetativen Mycels von *Lentinula edodes* in 200-facher Vergrößerung. Das Präparat wurde mit 2%iger (w/v) Kongorotlösung angefärbt.

Das Absorptionsmaximum von Kongorot bei 483 nm verschiebt sich bei diesem Komplex zu einer Wellenlänge von 523 nm. Ebenfalls konnte von dieser Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass dieser Komplex sich nur bildet, wenn das Glucan in geordneter Struktur und zwar als Triplehelix vorliegt. Dieser Farbstoff lagert sich eventuell in die Triplehelix der Glucane ein (Ogawa et al. 1972). Dies macht Kongorot zu einem geeigneten Farbstoff zur Quantifizierung triplehelicaler Glucane. Die Erarbeitung dieses quantitativen Nachweises ist Teil der gegenwärtigen Arbeit. Mit Hilfe dieser Methode kann erstmalig der Anteil bzw. Gehalt an triplehelicalen Glucanen bestimmt werden. Der Gehalt beziehungsweise die Ausbeute an triplehelicalen Glucanen kann als Parameter zur Verifizierung der enzymatischen Extraktionsmethode und für den Vergleich mit der Literaturmethode genutzt werden.

2.4.3 Theoretische Grundlage der quantitativen Bestimmung von Chitin

Neben den β -Glucanen ist Chitin das wichtigste Polysaccharid der Pilzzellwand. Bei diesem Polymer handelt es sich um eine β -1,4-verknüpfte N-Acetylglucosaminkette (Abb. 12). Durch die in dieser Arbeit entwickelte Methode kann erstmals der Chitingehalt verschiedener Pilze zuverlässig bestimmt werden. Ein bekannter Chitingehalt ist für die zu entwickelnde enzymatische Extraktionsmethode sehr wichtig. Chitin ist das Substrat der eingesetzten Chitinase. Durch den Abbau des Chitins sollen β -Glucane anschließend durch milde Extraktionsbedingungen isoliert werden. Ein bekannter Chitingehalt ermöglicht den Einsatz definierter und konstanter Substratmengen bei der Extraktion. Des Weiteren kann das Substrat-Enzymverhältnis variiert werden und der Einfluss dessen auf die Extraktion ermittelt werden.

Im Folgenden wird die Bestimmung von Chitin theoretisch erklärt und die hierfür entwickelte Bestimmungsmethode erläutert.

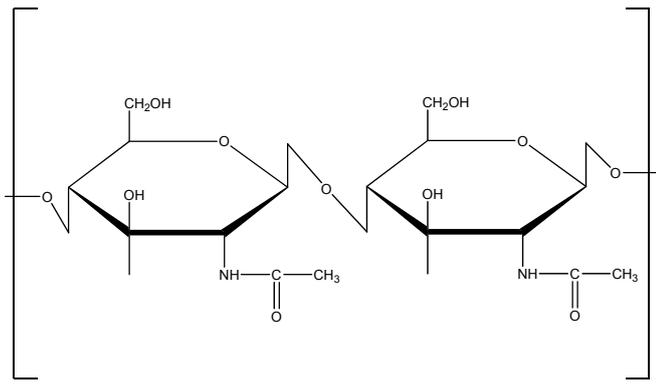


Abb. 12: Strukturformel von Chitin.

Chitin ist in den meisten Lösungsmitteln vollkommen unlöslich. Dies macht eine direkte Bestimmung äußerst schwierig (Ravindra et al. 1998). Allerdings ist es möglich, Chitin indirekt als Chitosan, welches säurelöslich ist, oder als N-Acetylglucosamin zu bestimmen. Chitin kann leicht zu Chitosan, der partiell deacetylierten Form des Chitins, umgewandelt werden (Kannan et al. 2010). Drysdale and Ride (1972) beschrieben eine Methode zur Chitinbestimmung, bei der sie Chitin mit konzentrierter Kaliumhydroxidlösung deacetylierten und nach anschließender Hydrolyse das freigesetzte Glucosamin quantifizierten. Mit dieser Methode wurden bereits die Chitingehalte einiger Pilze bestimmt (Cheung 1996, Manzi 2001). Eine weitere indirekte Methode basiert auf der Hydrolyse von Chitin zu N-Acetylglucosamin und dessen nachfolgender Bestimmung (Smith and Gilkerson 1979). Vetter et al. (1990, 2007) nutzten diese Methode für eine erfolgreiche Quantifizierung von Chitin in Pilzen. Eine ähnliche Methode beruht auf der fotometrischen Bestimmung des freigesetzten N-Acetylglucosamins (Johnson and Chen 1983 a, b). Dieser Methode liegt die Bestimmung für N-Acetylglucosamin mittels des Reagenzes N-N-Dimethylaminobenzaldehyd nach Svennerholm (1976) zu Grunde.

Die Hydrolyse von Chitin und Chitosan ist allerdings zeitaufwendig und eine vollständige Hydrolyse ist oft nicht gewährleistet. Die Detektion und Bestimmung von Chitosan ist aufgrund seiner Löslichkeit in schwachen Säuren einfacher. In aktuellen Forschungsarbeiten werden einige fotometrische Verfahren beschrieben (Prochazkov et al. 1999, Larionova et al. 2009). Allerdings reagieren die verwendeten Farbstoffe alle mit freien Aminogruppen von Proteinen und Peptiden. Bei Pilzextrakten handelt es sich um komplexe Matrices, die mitunter hohe Anteile an Proteinen beinhalten können. Dies macht die Anwendung dieser Methoden bei Extrakten aus Pilzen problematisch. Daher wurde für diese Arbeit

eine neuartige Extraktionsmethode entwickelt. Hierbei wird zunächst das zu bestimmende Chitin zu Chitosan mittels konzentrierter Kalilauge deacetyliert. Die anschließende Bestimmung des Chitosans basiert auf der Reaktion von Polyiodidanionen der Lugol'schen Lösung mit der freien im sauren positiv geladenen Aminofunktion des Chitosans. Anders als bei anderen Farbstoffen treten keine entsprechenden Querempfindlichkeiten zu anderen Matrixbestandteilen wie Proteinen auf. Dies wurde durch verschiedene Versuche belegt (siehe 4.1.4.1).

Diese Bindung wird durch das hochmolekulare Chitosan stabilisiert. Es entsteht ein unlöslicher, violetter Komplex, der als Spot Assay densitometrisch mittels einer fotografischen Technik ausgewertet wird. Die genaue Vorgehensweise ist in Abschnitt 3.2.4.1 aufgeführt.

3. Material und Methoden

3.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

3.1.1 Mono- und Polysaccharidstandards

Das als Standard verwendete triplehelicale β -1,3-1,6-Glucan Schizophyllan aus *Schizophyllum commune* wurde von der Firma Selco Wirkstoffe Vertriebs GmbH (Wald-Michelbach, Deutschland) bezogen und ist ein Produkt der Firma CPN s.r.o. (Dolní Dobruš, Tschechien). Die Glucan und Polysaccharidstandards Curdlan aus *Alcaligenes faecalis* (Ker.), Lanimarin aus *Laminaria digitata* (Huds.), Amylopektin aus *Zea mays* (L.) und Amylose aus *Solanum tuberosum* (L.) sowie Chitin und Chitosan aus Krabbenchalen wurden von Sigma-Aldrich (Seelze, Deutschland) erworben. Die zur Kalibrierung der Molekularmassenbestimmung mittels Gelpermeationschromatographie verwendeten Dextran Standards sowie die Zuckerstandards für die Bestimmung der Monosaccharidzusammensetzung stammen ebenfalls von Sigma-Aldrich (Seelze, Deutschland).

3.1.2 Enzyme und Substrate

Die verwendeten Enzyme Endo- β -1,3-Glucanase aus *Trichoderma* sp. (EC 3.2.1.39) und Protease aus *Bacillus licheniformis* (EC 3.4.21.14) stammen von der Firma Megazyme (Wicklow, Ireland). Die verwendete Chitinase aus *Streptomyces griseus* (EC 232.578.7) sowie das für die Aktivitätsbestimmung verwendete Methylumbelliferon (4-MU), 4-Methylumbelliferyl-N-acetyl- β -D-glucosamin (4-MU-(GlcNAc)) und 4-Methylumbelliferyl- β -D-N,N,N-triacetylchitotriosid (4-MU-(GlcNAc)₃) wurden von Sigma-Aldrich (Seelze, Deutschland) bezogen.

3.1.3 Farbstoffe

Die Farbstoffe für die quantitativen fotometrischen Bestimmungen, Kongorot, Anilinblau, Coomassie-Brilliantblau R250, Dinitrosalicylsäure und 3-Methyl-2-benzothiazolon-Hydrazon-Hydrochlorid (MBTH) wurden von Sigma-Aldrich (Seelze, Deutschland) bezogen.

3.1.4 Stationäre Phasen für die Chromatographien

Die stationären Phasen für die Gelpermeations- und Ionenaustauscherchromatographien Sephadex G-25, Sephacryl S 200 HR, Sephacryl S-300 HR, Q-Sepharose und CM-Sepharose sind von GE Healthcare (München, Deutschland) erworben worden. Die ZB5 Kapillarsäule und die VF 17-MS Säule für die Bestimmung der Monosaccharidzusammensetzung wurden von Sigma-Aldrich bezogen.

3.1.5 Lösungsmittel und Verbrauchsmaterialien für die Kernresonanzspektroskopie

Die Lösungsmittel für die Kernresonanzspektroskopie D₂O (99,8% Deuterierungsgrad) und NaOD (99,5% Deuterierungsgrad) sowie die verwendeten NMR-Röhrchen (Wilmad 507-PP oder höherwertig) wurden von Sigma-Aldrich bezogen.

3.1.6 Sonstige Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Sämtliche für die Nährmedien verwendete Substanzen (siehe 3.2.1) und sonstige Verbrauchsmaterialien wurden von Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland) bezogen.

Die verwendeten Konzentratortubes YM-10 stammen von Millipore (Schwalbach, Deutschland). Die für die Monosaccharidbestimmung verwendeten Chemikalien 1-Methylimidazol, Trifluoressigsäure und Natriumborhydrid wurden von der Firma Sigma-Aldrich erworben.

Die für die Chitinbestimmung verwendeten Trägermaterialien Macherey Nagel Polygram Sil G 0.2 mm (Art.-Nr. 805013), Macherey Nagel Alugram RP18W/UV254 0.15 mm (Art.-Nr. 818146), Macherey Nagel Polygram CEL300 0.1 mm (Art.-Nr. 801012), Schleicher und Schuell Gel-Blotting Papier GB 002 und das Macherey-Nagel MN 615 Filterpapier für den Spot Assay wurden bei Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland) erworben.

3.2 Angewendete Methoden

3.2.1 Mycelienanzucht, -aufarbeitung und -kinetik

3.2.1.1 Kultivierung der Mycelien auf festen Nährböden

Zur Anzucht des vegetativen Mycels wurden Zellkulturen der untersuchten Pilze zunächst unter sterilen Bedingungen auf festen Nährböden (siehe Tabelle 2) angesetzt. Hierzu wurde ein steriles Stück Fruchtkörper bzw. bereits vorhandenes Mycel auf die Medienplatten gesetzt. Die Fruchtkörper der Pilze (siehe Tab. 3) wurden käuflich im Fachhandel erworben.

In einem Kulturschrank wurden die Pilze im Dunkeln bis zur weiteren Verwendung bei 24 °C inkubiert.

Tab. 2: Rezepturen der verwendeten Nährmedien.

	Malz-Hefeextrakt Medium	Hagem-Agar-Medium	Maltose-Medium
Rezeptur	50 g Malzextrakt	0,5 g KH_2PO_4	0,5 g KNO_2
	2 g Hefeextrakt	0,5 g NH_4Cl	0,25 g K_2HPO_4
	15 g Agar	0,5 g $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	0,5 g $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$
	ad 1 l dest. Wasser	0,5 ml 1% FeCl_2 -Lsg.	0,1 g Thiamin- hydrochlorid
	pH 5,6	5 g Glucose	1 ml Spurenelement- lösung
		5 g Malzextrakt	10 g Maltose
		10 g Agar	10 g Agar
		ad 1 l dest. Wasser	ad 1 l dest. Wasser
			Spurenelementlösung:
			50 mg KNO_3
			40 mg $\text{MnSO}_4 \times 4\text{H}_2\text{O}$
			40 mg $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$
			20 mg $\text{FeCl}_3 \times 6 \text{H}_2\text{O}$
			20 mg $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$
			10 mg KI
			4 mg $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$
			ad 1 l dest. Wasser

3.2.1.2 Kultivierung der Mycelien in Flüssigkultur

Um Mycel in ausreichender Menge für weitere Versuche und Analysen zu gewinnen, wurde Mycel auf Malz-Hefeflüssigmedium (50 g Malzextrakt, 2 g Hefeextrakt, 1 l destilliertes H₂O, pH 5,6) angezogen. Dazu wurde Zellmaterial von den Festmedien entnommen und anschließend das Malz-Hefeflüssigmedium inokuliert. Die Inkubation erfolgte ebenfalls im Dunkeln bei 24°C bis zur weiteren Aufarbeitung (siehe 3.2.1.3).

3.2.1.3 Aufarbeitung der Zellmaterialien für weitere Untersuchungen

Das Mycel wurde zu Beginn der durch die Versuche zur Wachstumskinetik ermittelten stationären Phase geerntet (siehe 4.1.1). Dazu wurde das erhaltene vegetative Mycel gesiebt und das Nährmedium durch mehrmaliges Spülen mit destilliertem Wasser entfernt. Danach wurde das Zellmaterial jeweils für 48 h an einer Christ Alpha Gefriertrocknungsanlage getrocknet.

Die Fruchtkörper der Pilze wurden zunächst mit einem herkömmlichen Küchenmixer zerkleinert und anschließend mit einem Mörser verrieben. Die Fruchtkörper wurden für 72 h gefriergetrocknet. Die getrockneten Zellmaterialien wurden für weitere Versuche und Analysen umgehend weiterverwendet. In Tabelle 3 sind die in dieser Arbeit untersuchten Pilze aufgelistet.

Tab. 3: Übersicht über die verwendeten Spezies.

Name	Trivialname	Fruchtkörper untersucht	Mycel untersucht
<i>Flammulina velutipes</i>	Enokitake, Samtfußrübling	+	+
<i>Grifola frondosa</i>	Maitake, Klapperschwamm	-	+
<i>Hypsizigus tessulatus</i>	Shimeji, Buchenrasling	+	+
<i>Lentinula edodes</i>	Shiitake, Pansaniapilz	+	+
<i>Morchela esculenta</i>	Speisemorchel	-	+
<i>Pleurotus eryngii</i>	Kräuterseitling	+	+
<i>Pleurotus ostreatus</i>	Austernseitling	+	+
<i>Pleurotus pulmonarius</i>	Lungenseitling	-	+
<i>Trametes versicolor</i>	Schmetterlingstramete	-	+
<i>Agaricus bisporus</i> (Lange)	Champignon	+	-

3.2.1.4 Bestimmungen der Wachstumskinetiken

Zur Bestimmung der Wachstumsgeschwindigkeit wurden gleich große Mycelstücke aus einer bestehenden Kultur gestanzt und auf eine Petrischale mit Nährmedium überführt. Die Bestimmung des Wachstums erfolgte mit einer photographischen Technik. Dazu wurde umgehend die Fläche des Zellstücks gemessen (Anfangswert). Die Messung der Mycelfläche wurde, je nach Wachstumsgeschwindigkeit, in angemessenen Zeitintervallen wiederholt. Der Zuwachs an Mycel konnte durch die Differenz von Anfangswert und Messwert ermittelt werden.

Die photographische Messung wurde an dem Geldokumentationssystem GelDoc 2000 der Firma Bio-Rad durchgeführt. Die Fläche wurde mit dem Contour-Tool der Software Quantity-One (Version 4.2) der Firma Bio-Rad ausgewertet. Aufgrund der natürlichen Variation wurde eine zehnfache Bestimmung durchgeführt.

3.2.3 Kinetische Bestimmungen pilzeigener Enzyme

Alle Messungen wurden bei pH 6 durchgeführt, dem Optimum der in dieser Arbeit verwendeten Chitinase. Der Abbau der Chitinmatrix ist der erste Schritt der Extraktion (siehe 3.2.7). Da eine Inaktivierung der Enzyme nach diesem ersten Schritt durchgeführt werden soll, werden alle enzymkinetischen Messungen unter den Extraktionsbedingungen dieses Schrittes durchgeführt. Die Einheit der Enzymaktivität U wurde als $1 \text{ U} \hat{=} 1 \text{ } \mu\text{mol}$ freigesetztes Produkt pro Minute festgelegt.

3.2.3.1 Aufschluss und Bestimmung der Exo- und Endochitinaseaktivität

Die Probenaufarbeitung erfolgte entsprechend einer modifizierten Methode nach Novotna et al. (2008). Das gefriergetrocknete Zellmaterial wurde dabei im Mörser verrieben, eine definierte Menge eingewogen und entsprechend mit 5-10 ml Phosphatpuffer (100 mmol/l, pH 6, 0,1 mol/l EDTA) versetzt. Anschließend wurde die Probe 2 min durchmischt und für 10 min bei 125 rpm auf Eis geschüttelt.

Um einen Abbau der Chitinasen durch enthaltene proteolytische Enzyme zu unterbinden, wurde dem Extraktionspuffer das Protease inhibierende EDTA

(0,1 mol/l) zugefügt. Auf die Chitinaseaktivität hat EDTA in der eingesetzten Konzentration keinen Einfluss (Novotna et al. 2008).

Nach Zentrifugation (10 min, 3500 rpm) wurde der Überstand abdekantiert. Die Cumarinderivate 4-MU, 4-MU-(GlcNAc) und 4-MU-(GlcNAc)₃ stellen gängige Substrate zur Aktivitätsbestimmung von Exo- und Endochitinasen dar. Die verwendeten Substrate zeichnen sich durch eine hohe Spezifität und Selektivität aus (Chen et al. 1994, Ren et al. 2000, Guthrie et al. 2005). Zur Aktivitätsbestimmung wurden 500 µl einer 13 µmolaren 4-MU-(GlcNAc)-Lösung (für Exochitinase) bzw. 500 µl einer 13 µmolaren 4-MU-(GlcNAc)₃-Lösung (für Endochitinase) in eine Fluoreszenzküvette pipettiert. Je nach Proteinmenge wurden 20-50 µl Proteinrohextrakt zugegeben. Die Küvette wurde mit Phosphatpuffer (100 mmol/l, pH 6) auf ein endgültiges Volumen von 3 ml aufgefüllt und die kinetische Messung durchgeführt. Bei der ebenfalls durchgeführten Bestimmung des pH-Optimums (getesteter pH-Bereich: 3-9) der Chitinase aus *Lentinula edodes* wurde der Puffer durch einen Puffer mit entsprechendem pH-Wert ersetzt (pH 3-5: Citratpuffer 100 mmol/l, pH 6-8: Phosphatpuffer 100 mmol/l, pH 9: Tris-Puffer 100 mmol/l).

Die Kalibrierung der Messung erfolgte mit 4-MU als Standard (Konzentrationsbereich 0,1-1,6 nmol/ml). Die fluoreszenzspektroskopischen Messungen erfolgten an einem Kontron Instruments SFM25 Fluorimeter (Anregungswellenlänge: 360 nm, Emissionswellenlänge: 450 nm, spektrale Bandbreite: 20 nm). Die Aufarbeitung und Bestimmung wurde jeweils dreimal durchgeführt.

3.2.3.2 Aufarbeitung und Bestimmung der Glucanaseaktivität

Das zuvor gefriergetrocknete Pilzzellmaterial wurde mit einem definierten Volumen an Phosphatpuffer (100 mmol/l, pH 6) versetzt. Dabei wurden je Gramm Zellmaterial 10 ml Puffer hinzugefügt. Die Probensuspensionen wurden 2 min lang durchmischt. Die homogenisierten Proben wurden für 90 min bei 35.000 rpm zentrifugiert. Die folgenden Arbeitsschritte wurden anschließend auf dem Eisbad gekühlt durchgeführt. Der gewonnene klare Überstand (Proteinrohextrakt) wurde abdekantiert. Der Rohextrakt wurde mit Centriprep YM-10 Konzentratortubes auf ein Volumen von ~1 ml einkonzentriert. Anschließend erfolgte eine chromatographische Aufreinigung mit einer Sephadex

G-25 Säule (25 x 3 cm l x b, Fluß 1 ml/min, Eluent: 100 mmol/l Phosphatpuffer pH 6, Probenvolumen 250 µl). Die Detektion erfolgte mit einem UV-Vis-Detektors (280 nm). Die proteinhaltigen Fraktionen wurden gesammelt, vereinigt und zur Aktivitätsbestimmung eingesetzt. Die Glucanase-Aktivitätsbestimmung erfolgte nach Siebert et al. (1981). Es wurde Phosphatpuffer (100 mmol/l, pH 6) als Puffer verwendet. Die Glucane Schizophyllan, Curdlan und Laminarin wurden als Substrat eingesetzt. Eine Kalibrierung erfolgte mit Glucose (Konzentrationsbereich: 0,2-4 µmol/ml). Die fotometrischen Messungen wurden an einem Thermo Fischer γ -Helios Fotometer (Messwellenlänge: 560 nm) durchgeführt. Alle Messungen (Aufarbeitung und Bestimmung) wurden dreifach durchgeführt.

3.2.4 Quantitative Bestimmungsmethoden

3.2.4.1 Aufarbeitung und Bestimmung des Chitingehaltes

Für die Aufarbeitung des Zellmaterials wurden 2-3 g des zu analysierenden Zellmaterials genau eingewogen. Anschließend werden 100 ml 1 molarer Natronlauge hinzugegeben und die Probe 2 h auf dem siedenden Wasserbad erhitzt. Die erhaltene Suspension wurde zentrifugiert und der Filterkuchen quantitativ überführt. Die nachfolgende Deacetylation des Chitins wurde in Anlehnung an Ride und Drysdale (1972) und Chang et al. (1997) durchgeführt. Dazu wurde der Filterkuchen in 50 ml gesättigter KOH aufgenommen. Der resuspendierte Filterkuchen wurde für 3 h auf dem Wasserbad (100°C) erhitzt. Anschließend wurde die abgekühlte Suspension bei 3500 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde neutral gewaschen, lyophilisiert und mit 10%iger Essigsäure auf dem siedendem Wasserbad resuspendiert. Zum Schluss wurde der nicht lösliche Rückstand abzentrifugiert und der Überstand für die Bestimmung verwendet.

Zur Kalibrierung wurde Chitosan (isoliert aus Krabbenschalen, 75% deacetyliert) als Standardsubstanz verwendet. Der Deacetylierungsgrad wurde durch Inkubation mit konzentrierter KOH (3h, 100°C) erhöht. Die anschließende Kalibrierung erfolgte in einem Konzentrationsbereich von 0,5-5 mg/ml.

Für die Bestimmung wurden 2 µl der jeweiligen Kalibrierlösungen fünfmal mit einer Kolbenhubpipette (Eppendorf Research 0,1-2,5 µl) auf eine Kieselgel 60-Platte pipettiert. Ebenso wurde mit den Probelösungen verfahren, welche

gegebenenfalls vorher verdünnt wurden. Nach dem Auftragen der Proben wurde die Platte getrocknet.

Für die Entwicklung wurde die Kieselgelplatte gleichmäßig mit einer 1%igen Kaliumiodid-Iod-Lösung besprüht und unter einem Warmluftstrom getrocknet. Die densitometrische Auswertung der Spots erfolgte mittels des Gel Doc 2000 der Firma Bio-Rad unter Verwendung des Circle-Tools der Quantity-One Software (Version 4.2). Es wurde die optische Dichte pro Quadratmillimeter bestimmt. Die Hintergrundfärbung der Kieselgelplatte wurde von der Färbung der Spots mit Hilfe des Programmes subtrahiert.

3.2.4.2 Methode zur quantitativen Bestimmung der Gesamt- β -Glucane mit Anilinblau

Die fluorimetrische Bestimmung der Gesamt- β -Glucane beruht wie bereits erwähnt auf einer Methode von Ko und Lin (2004). Die Messung erfolgte am Spektralfluorimeter Kontron Instruments SFM 25 (Extinktionswellenlänge: 392 nm, Emmisionswellenlänge: 502 nm, spektralen Bandbreite: 20 nm). Die Kalibrierung wurde mit dem linearen β -1,3-Glucan Curdlan in einem Bereich von 1 $\mu\text{g/ml}$ -10 $\mu\text{g/ml}$ durchgeführt. Die Kalibrierung wurde aufgrund der erhaltenen Ergebnisse optimiert (siehe 4.1.3.1). Alle Proben wurden dreimal gemessen.

3.2.4.3 Methode zur quantitativen Bestimmung der triplehelicalen Glucane mit Kongorot

Je nach dem zu erwartendem Gehalt an triplehelicalen Glucanen wurde ein entsprechendes Probenvolumen in eine Küvette pipettiert und dieses mit dest. H_2O zu einem Gesamtvolumen von 700 μl aufgefüllt. Anschließend wurden 600 μl Citratpuffer pH 7 (440 ml 0,2 mol/l NaOH, 155 ml 0,2 mol/l Citronensäure pH 7) und 100 μl Farbstofflösung (0,08% (w/v) Kongorot in Puffer pH 7) hinzu gegeben. Nach dem Schütteln der Küvette wurden die Proben bei 523 nm gemessen. Da die Glucanfraktionen meist eine geringe Eigenfärbung besitzen, wurde eine Leerwertbestimmung angefertigt. Aus der Differenz der Extinktionen der Probe und des Leerwertes konnte anschließend der Messwert ermittelt werden.

Die Kalibrierung erfolgte mit einem Schizophyllan-Standard in einem Bereich von 30-150 µg/ml. Der Standard muss aufgrund seiner schlechten Löslichkeit im pH-Neutralen zunächst mit 1 molarer Natronlauge gelöst werden. Anschließend wird die Probe neutralisiert und der verwendete Messkolben mit Puffer pH 7 aufgefüllt. Diese Stammlösung wurde für die Kalibrierung verwendet. Alle Messungen wurden dreimal durchgeführt.

3.2.4.4 Methoden zur Validierung der neuartigen Bestimmungsmethoden

Die in dieser Arbeit entwickelten Bestimmungsmethoden, die Chitinbestimmung (3.2.4.1) und die Bestimmung triplehelicaler Glucane (3.2.4.3) wurden einer Methodvalidierung unterzogen. Hierzu wurden die Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenzen nach DIN 32 645 sowie die Messpräzision, die Empfindlichkeit, der Verfahrensvariationskoeffizient, die Verfahrensstandardabweichung und die Reststandardabweichung wie in der Literatur beschrieben bestimmt (Kromidas 1999). Des Weiteren wurden die unteren und oberen Grenzen des Arbeitsbereiches der Methoden statistisch festgelegt und Wiederfindungen mit Standards in entsprechenden Probenmatrizes ermittelt. Außerdem wurde die Linearität der Methoden mittels eines Mandel-Testes (Mandel 1964) geprüft. Diese Methodvalidierung soll die Anwendbarkeit der Methoden statistisch belegen.

3.2.5 Sonstige Bestimmungsmethoden

3.2.5.1 Methode zur Bestimmung von N-Acetylglucosamin

Zur Bestimmung des freigesetzten N-Acetylglucosamins durch die Chitinase im ersten Inkubationsschritt der enzymatischen Extraktionsmethode (siehe 3.2.7) wurde das Verfahren nach Smith und Gilkerson (1979) verwendet.

Die Bestimmung wurde mit N-Acetylglucosamin in einem Bereich von 2,2-8,9 µg/ml kalibriert. Alle Messungen wurden dreimal durchgeführt.

3.2.5.2 Methode zur Bestimmung des Proteingehaltes

Die Proteinbestimmung erfolgte nach Bradford (1976). Als Kalibrierstandard wurde Rinderserumalbumin in einem Konzentrationsbereich von 0,06-1,2 mg/ml verwendet.

3.2.5.3 Methode zur Bestimmung des Kohlenhydratgehaltes

Die Detektion der Glucane und Dextran Standards bei der Gelpermeationschromatographie (siehe 3.2.8.3) erfolgte mit dem Phenol-Schwefelsäure-Test nach Saha und Brewer (1994). Als Kalibrierstandard wurde Schizophyllan in einem Konzentrationsbereich von 2-40 µg/ml verwendet.

3.2.6 Literaturmethode zur Extraktion von β -Glucanen

Die als Literaturmethode bezeichnete Extraktionsmethode für β -Glucane beruht auf einem Verfahren von Sietsma und Wessels (1977). Sie basiert auf einer Kombination aus alkalischem und saurem Aufschluss des Zellmaterials mit Kalilauge, Salzsäure und Natronlauge. Somit erhält man in Folge drei Fraktionen. Für die Bestimmungen der Ausbeuten ist die Extraktion quantitativ durchgeführt worden. Zur Gewinnung der Glucane wurden zunächst 3-7 g des getrockneten vegetativen Pilzmycels bzw. Fruchtkörpers genau in einen 500 ml Dreihalskolben eingewogen. Danach wurde das Zellmaterial mit 120 ml 1 molarer KOH versetzt und unter Rückflusskühlung für 20 min bei 60 °C gerührt und dann filtriert. Der Filterkuchen wurde mit dest. H₂O gewaschen. Das Filtrat wurde anschließend mit halbkonzentrierter Salzsäure neutralisiert (pH 7) und quantitativ in ein 250 ml Messkolben überführt. Der Messkolben wurde anschließend mit dest. H₂O aufgefüllt. Diese Fraktion wird als KOH-Fraktion bezeichnet.

Der verbliebene Filterkuchen wurde quantitativ in einen Erlenmeyerkolben überführt und mit 10 ml 1 molarer Salzsäure und 120 ml 0,55 molarer Salzsäure versetzt. Die Salzsäure wurde hierbei zum Spülen des Filterpapiers verwendet. Danach wurde die Suspension für 1 h auf dem Wasserbad (100°C) erhitzt. Im folgenden Arbeitsschritt wurde erneut durch einen Faltenfilter filtriert. Der Filterkuchen wurde ebenfalls mit Wasser gespült. Das Filtrat (HCl-Fraktion) wurde mit 10 molarer Natronlauge neutralisiert und quantitativ in einen 250 ml Messkolben überführt und dieser mit dest. H₂O aufgefüllt.

Erneut wurde der verbliebene Rückstand quantitativ in einen Erlenmeyerkolben überführt. Anschließend wurden 120 ml 1 molarer Natronlauge hinzu gegeben. Nun wurde die Suspension auf einem 60°C warmen Wasserbad für 20 min inkubiert und anschließend filtriert. Der Filterkuchen wurde mit destilliertem Wasser gespült. Das aufgefangene Filtrat wurde mit halbkonzentrierter Salzsäure neutralisiert, in ein 250 ml Messkolben quantitativ überführt und dieser mit destilliertem Wasser aufgefüllt. Diese Fraktion wird als NaOH-Fraktion bezeichnet. Für die quantitativen Bestimmungen wurde die Aufarbeitung dreimal wiederholt. Aus der KOH- und NaOH-Fraktion wurden die Glucane entsprechend 3.2.8.1 isoliert und strukturanalytisch untersucht. Hierbei ist das quantitative Auffüllen der Messkolben nicht zwingend notwendig.

3.2.7 Enzymatische Extraktionsmethode für β -Glucanen

Das lyophilisierte Zellmaterial wurde vor der Extraktion fein gemörsert. Die Einwaage wurde so gewählt, dass der Chitingehalt der Einwaage 10 mg Chitin betrug. Dieser wurde zuvor nach 3.2.4.1 bestimmt.

Die Probe wurde mit 10 ml Citronensäure-Phosphatpuffer (0,2 mol/l Na_2HPO_4 -Lösung: 0,1 mol/l Citronensäure im Verhältnis 63,15: 36,85, pH 6) und anschließend mit 0,04 U Chitinase (Substrat: Chitin, pH 6, 25°C) versetzt. Dann wurde die Probe für 72 h bei 24°C unter konstantem Schütteln (Schüttelplatte: 40 rpm) inkubiert. Die Probenlösung wurde danach für 15 min auf dem siedenden Wasserbad erhitzt, um die Enzyme zu inaktivieren. Dann wurden diese auf Eis gekühlt. Anschließend wurde bei 4000 rpm zentrifugiert und der Überstand abdekantiert. Dieser Überstand wird als Inkubationsüberstand bezeichnet. Sollte eine quantitative Bestimmung der Ausbeute an Glucan durchgeführt werden, wurde ein Aliquot des Inkubationsüberstandes in einen Messkolben überführt und dort direkt neutralisiert. Der Messkolben wurde anschließend mit Citronensäure-Citrat-Puffer (440 ml 2 mol/l NaOH: 155 ml 2 mol/l Citronensäure pH 7) aufgefüllt. Das verbliebene Pellet wurde dreimal mit dest. Wasser gewaschen und gefriergetrocknet.

Das getrocknete Pellet wurde mit 10 ml 1 molarer KOH versetzt, gevortext und auf Eis 1 h inkubiert. Anschließend wurde für 5 min zentrifugiert (4000 rpm) und der Überstand abgenommen. Man erhält so eine zweite Glucanfraktion, die KOH-

I-Fraktion. Für eine quantitative Bestimmung wurde erneut ein Aliquot entnommen. Dieses wurde direkt neutralisiert und der entsprechende Kolben mit Puffer (pH 7) aufgefüllt.

Das verbleibende Pellet aus dem vorherigen Extraktionsschritt wurde in diesem Fall fünfmal gewaschen und anschließend gefriergetrocknet. Das getrocknete Pellet wurde nun mit 10 ml 100 mmol/l Essigsäure/Acetatpuffer pH 4,5 versetzt und gut geschüttelt. Anschließend wurde 1 U Endo- β -Glucanase (Substrat: Lanimarin, pH 4, 40°C) hinzu gegeben und die Proben für 3 h bei Raumtemperatur unter Schütteln (Schüttelplatte: 40 rpm) inkubiert. Danach wurde erneut inaktiviert (Wasserbad 100°C, 15 min) und die Proben sofort gekühlt. Anschließend wurde zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Die so erhaltene Fraktion wird als Glucanase-Fraktion bezeichnet. Bei quantitativen Bestimmungen wurde wieder ein Aliquot entnommen. Dieses wurde im 10 ml Messkolben neutralisiert. Es wurde mit Puffer (pH 7) aufgefüllt. Das Pellet wurde dreimal gewaschen und anschließend getrocknet.

Für den nächsten Extraktionsschritt wurde das Pellet erneut mit 10 ml 1 molarer KOH versetzt und umgehend auf dem Eisbad für 1 h geschüttelt. Die Probe wurde für 15 min zentrifugiert (4000 rpm) und der Überstand abgenommen. Bei einer quantitativen Bestimmung wurde ebenfalls ein Aliquot entnommen, in einem 10 ml Messkolben überführt, die Lösung neutralisiert und der Messkolben aufgefüllt. Man erhält in diesem Schritt die als KOH-II-Fraktion bezeichnete Fraktion. Die Aufarbeitung wurde für quantitative Bestimmungen dreimal durchgeführt. Es wurden ebenfalls jeweils Blindversuche durchgeführt. Hier wurde auf die Zugabe von Enzym verzichtet und stattdessen Citronensäure-Phosphatpuffer (pH 6) hinzu gegeben. Dies ermöglicht die Bestimmung der durch die Zugabe von Enzym erhaltenen Ausbeuten.

3.2.8 Strukturanalytische Methoden zur Charakterisierung der β -Glucane

3.2.8.1 Aufreinigung der isolierten Glucane

Die mit den Methoden 3.2.6 und 3.2.7 gewonnenen Glucanextrakte wurden zunächst mit Centriprep YM-10 Tubes auf ein möglichst kleines Volumen einkonzentriert. Die Konzentrate wurden nun für 10 min auf einem siedenden Wasserbad erhitzt und anschließend auf einem Eisbad abgekühlt. Dieser Schritt dient der Denaturierung der Proteine für die nachfolgende Inkubation mit Protease. Anschließend wurden die Konzentrate in je 1 ml Portionen aufgeteilt und mit 50 U Protease (Substrat: BSA, pH 7, 40°C) versetzt. Dann wurden die Proben für 72 h unter ständigem Schütteln (Schüttelplatte: 100 rpm) bei 40°C inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Protease inaktiviert (Wasserbad, 100°C, 10 min) und die Proben auf Eis gekühlt.

2 ml der Probenlösung wurden mittels Gelpermeationschromatographie fraktioniert. Dazu wurde eine mit Sephacryl 200 HR gepackte Säule verwendet (5,5 cm x 3,5 cm, 1 x b). Als Eluent diente Reinstwasser bei einem Fluss von 1 ml/min. Zur Fraktionierung werden nach 3 min je 1 ml große Fraktionen gesammelt. Die Glucangehalte der einzelnen Fraktionen wurden fluorimetrisch wie in 3.2.4.2 beschrieben bestimmt. Zudem wurde der Proteingehalt nach Bradford wie in 3.2.5.2 beschrieben ermittelt. Nun wurden die glucanhaltigen Fraktionen erneut mit Centriprep YM-10 Tubes einkonzentriert. Die nun erhaltenen Konzentrate wurden mit einer kombinierten Anionen/Kationen-Austauschchromatographie aufgereinigt. Dazu wurde eine Säule wie in der Skizze (Abb. 13) dargestellt verwendet.

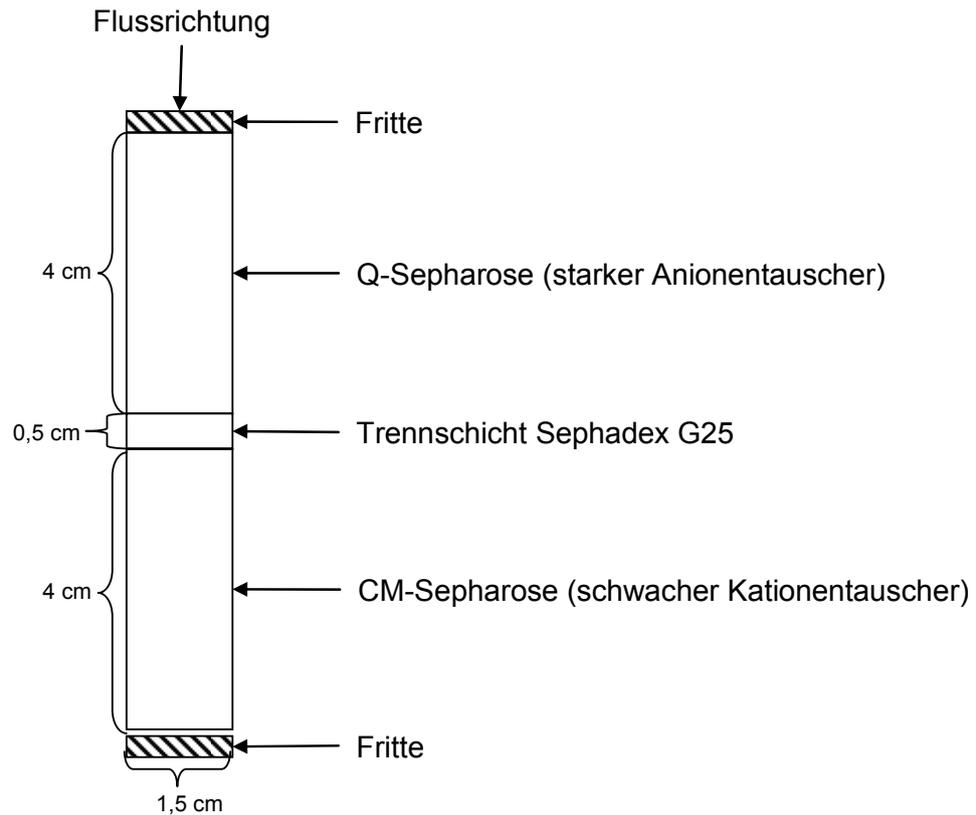


Abb. 13: Skizze der Anionen/Kationen-Austauschchromatographie.

Es wurde Reinstwasser bei einem Fluss von 1 ml/min als Eluent verwendet. Nach 3 min wurden je 1 ml große Fraktionen gesammelt und auf ihren Glucan- und Proteingehalt untersucht. Die glucanhaltigen Fraktionen wurden vereinigt und auf ein geringes Volumen mit den Centriprep YM-10 Tubes eingengt und für die weitere Strukturanalytik verwendet (siehe 3.2.8 ff.).

3.2.8.2 Kernresonanzspektroskopie

Die nach 3.2.8.1 aufgereinigten Proben wurden für die Kernresonanzspektroskopie zunächst lyophilisiert. Anschließend wurden die Proben in D_2O aufgenommen und erneut gefriergetrocknet. Dieser Schritt wurde zweimal wiederholt, um etwaiges Wasser aus den Proben zu entfernen. Zur Analyse wurden die Proben in einer 1% Natriumdeuteriumoxid-Lösung (1% NaOD in D_2O) gelöst. Alle NMR-Experimente wurden an einem Bruker Advance III 400 bzw. einem Bruker Advance III 600 Spektrometer durchgeführt. Die Messparameter der einzelnen Experimente sind in den folgenden Tabellen (Tab. 4 ff.) dargestellt. Als

externer Standard wurde Trimethylsilan (TMS) verwendet. Es wurden NMR-Röhrchen der Firma Wilmad verwendet (507-PP oder besser).

Tab. 4: ^1H -Kernresonanzspektroskopie (mit Wasserunterdrückung).

Parameter	
Frequenz [Mhz]	400 bzw. 600
Messtemperatur [°C]	32
Anzahl Scans	16
Datenpunkte	32768
Relaxation-Time [s]	2
Aquisition-Zeit [s]	1,33

Tab. 5: ^{13}C -Kernresonanzspektroskopie.

Parameter	
Frequenz [Mhz]	400 bzw. 600
Messtemperatur [°C]	32
Anzahl Scans	16384
Datenpunkte	65536
Relaxation-Time [s]	1,5
Aquisition-Zeit [s]	1,56

Tab. 6: DEPT135-Kernresonanzexperiment.

Parameter	
Frequenz [Mhz]	400 bzw. 600
Messtemperatur [°C]	32
Anzahl Scans	4096
Datenpunkte	65536
Relaxation-Time [s]	1
Aquisition-Zeit [s]	1,37

Tab. 7: Correlation Spectroscopy (H,H-COSY-NMR-Spektroskopie).

Parameter	
Frequenz [Mhz]	400 bzw. 600
Messtemperatur [°C]	32
Anzahl Scans	8
Relaxations-Zeit f1 [s]	1
Aquisitions-Zeit [s]	0,52

Tab. 8: Total Correlated Spectroscopy (H,H-TOCSY-NMR-Spektroskopie).

Parameter	
Frequenz [Mhz]	400 bzw. 600
Messtemperatur [°C]	32
Anzahl Scans	8
Relaxations-Zeit [s]	1,44
Aquisitions-Zeit [s]	0,24
Mischungs-Dauer [s]	0,06

Tab. 9: Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy (H,H-NOESY-NMR-Spektroskopie).

Parameter	
Frequenz [Mhz]	400 bzw. 600
Messtemperatur [°C]	32
Anzahl Scans	8
Relaxations-Zeit [s]	1,16
Aquisitions-Zeit f1 [s]	0,52
Mischungs-Dauer [s]	0,03

Tab. 10: Heteronuclear Single Quantum Coherence (HSQC-NMR-Spektroskopie).

Parameter	
Frequenz [Mhz]	400 bzw. 600
Messtemperatur [°C]	32
Anzahl Scans	16
Relaxations-Zeit f1 [s]	1,35
Aquisitions-Zeit [s]	0,21
Mischungs-Dauer [s]	0,03

Tab. 11: Heteronuclear Multiple Bond Coherence (HMBC-NMR-Spektroskopie).

Parameter	
Frequenz [Mhz]	400 bzw. 600
Messtemperatur [°C]	32
Anzahl Scans	128
Relaxations-Zeit [s]	1,49
Aquisitions-Zeit f1 [s]	0,41
Mischungs-Dauer [s]	0,03

3.2.8.3 Bestimmung der Molekularmasse mittels Gelpermeationschromatographie

Die gelpermeationschromatographische Bestimmung der β -Glucane wurde nach Hara et al. (1982) durchgeführt.

Hierzu wurde eine mit Sephacryl S300-HR gefüllte Säule (25 cm x 1,5 cm l x b) benutzt. Als Eluent wurde destilliertes Wasser verwendet. Der Fluss betrug 0,5 ml/min. Es wurden alle 30 s Fraktionen aufgefangen. Diese wurden wie in 3.2.5.3 beschrieben hinsichtlich ihres Kohlenhydratgehaltes analysiert. Das eingesetzte Probenvolumen betrug 250 μ l. Die Kalibrierung der Messung erfolgte mit Dextran Standards der mittleren Molekularmassen 270 kDa, 150 kDa, 80 kDa, 50 kDa und 20 kDa. Alle Messungen wurden mindestens dreifach wiederholt.

3.2.8.4 Bestimmung der Monosaccharidzusammensetzung

Die Monosaccharidzusammensetzung der Glucane wurde modifiziert nach Blakeney et al. (1983) durchgeführt. Nach Hydrolyse und Derivatisierung der alkalisch isolierten Glucane zu den entsprechenden Alditolacetaten, wurden die Monosaccharidzusammensetzungen durch Gaschromatographie ermittelt. Dazu wurde die Summe der Peakflächen aller enthaltenen Alditolacetate bestimmt. Für jedes Monosaccharid wurde anschließend der prozentuale Anteil der Peakfläche an der Gesamtfläche berechnet.

Die wie in 3.2.8.1 beschrieben aufgereinigten Probenkonzentrate wurden gefriergetrocknet. Anschließend wurden 1-3 mg der getrockneten Proben mit 2 molarer Trifluoressigsäure im Ofen bei 100 °C für 8 h hydrolysiert. Danach wurde die Trifluoressigsäure im Luftstrom abgedampft. Die getrockneten Hydrolysate wurden in 100 μ l Reinstwasser und 20 μ l Ammoniak ($c=15$ mol/l) aufgenommen und zur Reduktion direkt mit 1 ml Natriumborhydrid-Lösung (0,5 mol/l in DMSO) versetzt. Die Proben wurden für 90 min bei 40°C erwärmt. Der Überschuss an Natriumborhydrid wurde durch Zugabe von 100 μ l Eisessig entfernt. Die Proben wurden direkt mit 200 μ l 1-Methylimidazol und 2 ml Essigsäureanhydrid versetzt und 1 h unter ständigem Schütteln durchmischt. Durch die Zugabe von 5 ml eiskaltem Wasser wurde der Überschuss an Essigsäureanhydrid neutralisiert. Danach wurden die Alditolacetate zweimal mit 1 ml Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten Dichlormethanphasen wurden mit

Wasser ausgeschüttelt. Um alle flüchtigen Verbindungen zu entfernen, wurde das Lösungsmittel unter einem Kaltluftstrom abgedampft. Die Alditolacetate wurden in 2 ml Dichlormethan aufgenommen und per Gaschromatographie analysiert. Dies erfolgte mit einem Agilent Technologies 6890 N Network GC-GC-FID System mit einer ZB5 Kapillarsäule (30 m x ID 250 µm, Filmdicke=0,25 µm) und einer zweiten polaren VF 17-MS Säule (1 m x ID 100 µm, Filmdicke=0,1 µm). Die Messung wurde eindimensional durchgeführt und erfolgende unter folgenden Bedingungen:

Temperaturprogramm:

1. Säule: 150°C, 1 min halten // 2°C/ min // 240°C, 5 min halten

2. Säule: 160°C, 1 min halten // 2°C/ min // 250°C, 5 min halten

Trägergas: Helium

Make-Up Gas: Stickstoff

Brenngase: Wasserstoff/ synthetische Luft

Jedes Glucan wurde dreimal unabhängig für die Bestimmung der Monosaccharid-zusammensetzung aufgearbeitet und jeweils zweimal injiziert.

4. Ergebnisse

4.1 Vorbereitende Versuche

4.1.1 Bestimmung der Wachstumskinetik der Pilzmycelien auf verschiedenen Nährmedien

Durch die durchgeführten Wachstumsversuche lässt sich das optimale Nährmedium zur Anzucht der Pilzmycelien ermitteln. Des Weiteren ist es für eine spätere Nutzung der Mycelien zur Gewinnung von Glucanen interessant, schnell wachsende Spezies zu identifizieren. Mit den folgenden Ergebnissen ist dies möglich. So sind besonders die hier identifizierten schnell wachsenden Mycelien eine geeignete Ressource für die enzymatische Extraktion der Glucane.

Hierbei stellt die Messung des Flächenwachstums des Mycels eine einfache Möglichkeit zur Bestimmung der Wachstumskinetik dar. Durch Wachstumskurven kann die Kinetik des jeweiligen Pilzes auf dem jeweils festen Nährboden charakterisiert werden. Besonders die Dauer der lag-Phase und das Wachstum in der linearen Phase sind von Bedeutung. Eine typische Wachstumskurve ist in Abbildung 14 dargestellt.

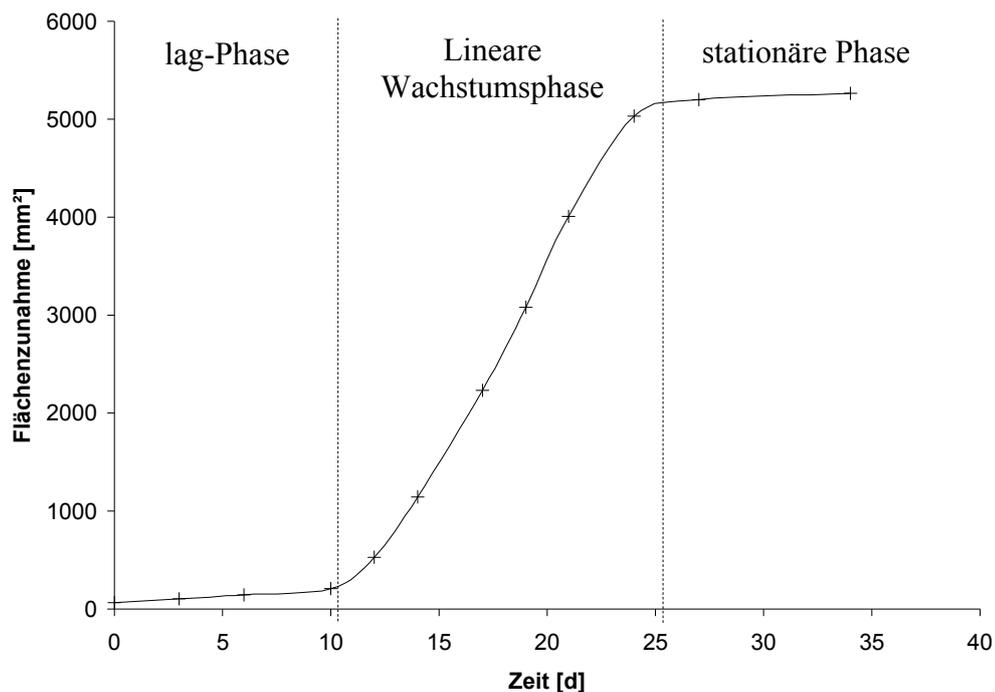


Abb. 14: Wachstumskurve des Mycels von *Morchella esculenta* auf Malz-Hefeextrakt Nährboden.

Die Wachstumskurven wurden für alle in dieser Arbeit verwendeten Pilzmycelien aufgenommen. Dies ermöglicht einen direkten Vergleich des Wachstumsverhaltens der jeweiligen Mycelien in Abhängigkeit des Mediums. In Tabelle 12 sind die Wachstumsraten in der linearen Phase sowie die Dauer der lag-Phase für die jeweiligen Pilzmycelien auf den drei getesteten Nährmedien aufgeführt.

Tab. 12: Wachstumskarakteristiken der verschiedenen Pilzmycelien auf den getesteten Nährböden.

Pilz	Malz-Hefeextrakt		Maltose-Medium		Hagem-Medium	
	Wachstum [mm ² /d]	Dauer lag- Phase [d]	Wachstum [mm ² /d]	Dauer lag- Phase [d]	Wachstum [mm ² /d]	Dauer lag- Phase [d]
<i>A. bisporus</i>	122	9	k.W.	k.W.	k.W.	k.W.
<i>F. velutipes</i>	126	2	46	1	40	1
<i>G. frondosa</i>	226	7	k.W.	k.W.	k.W.	k.W.
<i>H. tessulatus</i>	232	3	k.W.	k.W.	k.W.	k.W.
<i>L. edodes</i>	10	22	k.W.	k.W.	k.W.	k.W.
<i>M. esculenta</i>	371	12	101	k.W.	k.W.	k.W.
<i>P. eryngii</i>	293	5	k.W.	15	18	15
<i>P. pulmonarius</i>	508	2	56	6	42	6
<i>P. ostreatus</i>	336	2	k.W.	8	39	8
<i>T. versicolor</i>	432	2	69	12	28	12

k.W. = kein Wachstum

Die Wachstumsraten zeigen, dass sämtliche Pilzmycelien auf dem Malz-Hefeextrakt-Nährboden besser wachsen. Die Mycelien weisen im Vergleich sowohl auf Maltose-Nährmedium als auch auf Hagem-Nährmedium ein deutlich geringeres Wachstum auf. Somit ist das Pilzwachstum auf diesen beiden festen Nährmedien vergleichsweise unzureichend, beziehungsweise bei manchen Spezies sogar nicht messbar. Bei dem Malz-Hefeextrakt-Nährmedium handelt es sich um ein Kompletmedium. Die komplexe Zusammensetzung dieses Nährmediums sorgt für die Bereitstellung eines breiten Spektrums an Nährstoffen für das Zellwachstum der Mycelien. Während der verwendete Malzextrakt vorrangig als Quelle aufgeschlossener Kohlenhydrate dient, wird durch den

Hefeextrakt eine Versorgung mit verschiedensten Aminosäuren gewährleistet. Zudem werden dem Pilzmycel weitere für das Wachstum benötigte Substanzen wie Vitamine und Spurenelemente zugeführt. Dies könnte die deutlich besseren Wachstumseigenschaften auf diesem Nährmedium erklären.

Bei den anderen Medien handelt es sich um definierte Nährmedien, bei denen komplexe Nährstoffquellen, besonders komplexe Proteinquellen fehlen. Allerdings könnte durch ein definiertes Nährmedium ein konstantes Wachstum gewährleistet werden. Des Weiteren wäre eine Steuerung des Wachstums über die Zugabe von bestimmten Komponenten denkbar. Allerdings ist die Verwendung eines definierten Nährmediums wie die Ergebnisse zeigen nicht sinnvoll.

Boyle (1998) untersuchte den Einfluss verschiedener Medienkomponenten auf das Wachstum von *Lentinula edodes* und *Flammulina velutipes*. Hierbei konnte er feststellen, dass die wichtigste wachstumslimitierende Komponente die verwendete Stickstoffquelle ist. Er konnte des Weiteren feststellen, dass komplexe N-Quellen wie Caseinhydrolysat das Wachstum deutlich steigern. Mit einfachen N-Quellen wie Natriumglutamat konnten keine so hohen Wachstumsraten erzielt werden. Andere Arbeitsgruppen konnten darüber hinaus zeigen, dass ein Komplettmedium, was zudem über eine komplexe N-Quelle verfügt, zu einem gesteigerten Wachstum führt (Dijkstra et al. 1972, Kim et al. 2002, Montini et al. 2006).

Die Verwendung eines Komplettmediums, in diesem Fall Malz-Hefeextrakt-Nährmedium, scheint, wie auch die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, von Vorteil zu sein. Durch die Verwendung dieses Mediums lassen sich deutlich höhere Ausbeuten an Zellmaterial pro Zeit erzielen.

Auffällig ist ebenfalls das unterschiedliche Wachstumsverhalten der einzelnen Pilzarten. Während Pilze wie *Pleurotus pulmonarius*, *Trametes versicolor* oder *Morchella esculenta* hohe Wachstumsraten aufweisen und das Wachstum meist nach wenigen Tagen einsetzt, weisen Pilze wie *Lentinula edodes* oder *Agaricus bisporus* deutlich schlechtere Wachstumseigenschaften auf. Die Pilze, die auf Malz-Hefeextrakt ein gutes Wachstumsverhalten aufweisen, scheinen auch unempfindlicher zu sein was die Wahl ihrer Medien betrifft.

Die Ergebnisse zeigen, dass einige Pilzarten für die Anzucht als Mycelkultur und dementsprechend auch bei großtechnisch umzusetzenden Prozessen besser geeignet sind. Die Verwendung der schnell wachsenden Spezies wie *Pleurotus*

pulmonarius ist vorteilhaft, da große Mengen Zellmaterial einfach produziert werden können. In dieser Arbeit werden die gewonnenen Ergebnisse ebenfalls dafür genutzt, das optimale Anzuchtmedium für die Kultivierung der Mycelien im Labormaßstab zu bestimmen. Dadurch ist gewährleistet, dass genug Zellmaterial für weitere Versuche zur Verfügung steht. Die Verwendung von Malz-Hefeextrakt-Nährmedium ist wie die Ergebnisse zeigen am effektivsten. Dies wird durch einen Vergleich der unterschiedlichen Wachstumskurven der Mycelien auf den verschiedenen Nährmedien deutlich (siehe Abb. 15).

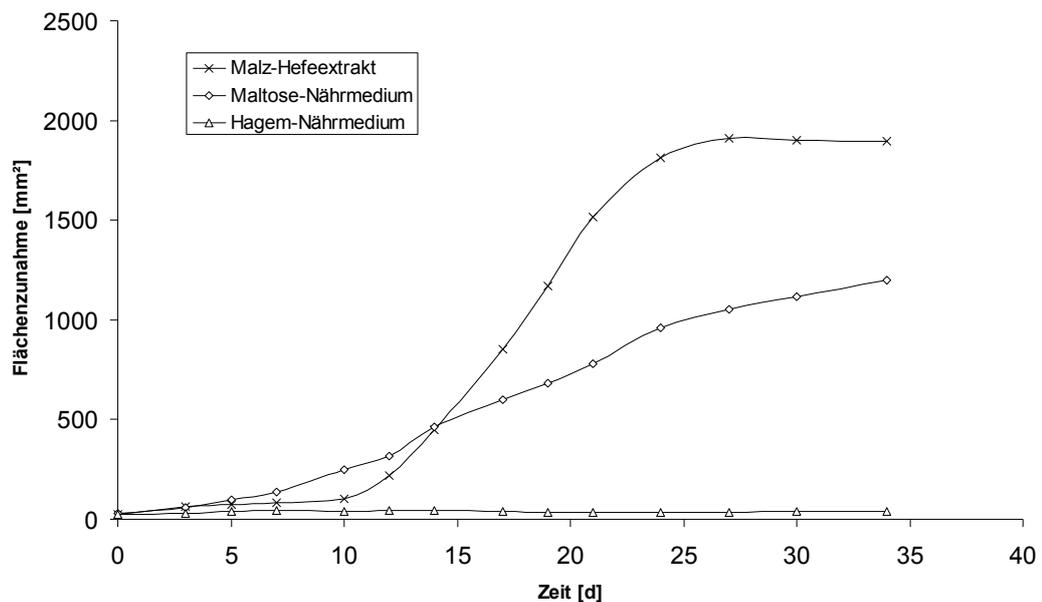


Abb. 15: Vergleich der Wachstumskurven auf den verschiedenen Nährmedien am Beispiel des Mycels von *Morchella esculenta*.

Aufgrund der ermittelten Ergebnisse werden sämtliche Mycelien für weitere Versuche wie bereits erwähnt auf dem Malz-Hefeextrakt-Nährmedium angezogen.

Hierfür werden die Mycelien allerdings in Flüssigkultur kultiviert. Die beobachteten Wachstumsverhalten lassen sich auf ein entsprechendes Flüssigmedium übertragen. Die Flüssigkultur der Mycelien ist vorteilhaft. Es können deutlich höhere Mengen an Zellmaterial gewonnen werden. Des Weiteren bildet das Mycel in Flüssigmedium clusterähnliche Pellets, die durch ein einfaches Sieb vom Medium getrennt werden können.

Die in der vorliegenden Arbeit beschriebene Extraktionsmethode wurde für die Extraktion von Glucanen aus Mycelien entwickelt. Einige der untersuchten Spezies lassen sich mit Hilfe der Wachstumsversuche als schnell nachwachsende

Rohstoffe identifizieren. Damit besitzt die enzymatische speziell auf Mycelien abgestimmte Methode einen enormen Vorteil gegenüber herkömmlichen Extraktionsverfahren, die den vergleichsweise schwer zu kultivierenden Fruchtkörper als Rohstoff verwenden.

4.1.2 Bestimmung der Eigenenzymaktivitäten der Pilze

4.1.2.1 Bestimmung der Aktivitäten der Endo- und Exochitinasen

Die in dieser Arbeit entwickelte Extraktionsmethode beruht zum großen Teil auf der enzymatischen Hydrolyse von Chitin durch Chitinase. Pilzeigene Chitinasen könnten dies maßgeblich unterstützen. Durch hohe Eigenaktivitäten könnte die Menge zugesetzter Chitinase minimiert werden. Um den Einfluss durch pilzeigene Chitinase beurteilen zu können, wurde eine Aktivitätsbestimmung wie in Abschnitt 3.2.3.1 beschrieben durchgeführt. Die Ergebnisse sind im Folgendem dargestellt.

Zunächst wurde das pH-Optimum pilzeigener Chitinasen am Beispiel des Zellmaterials vom Fruchtkörper von *Lentinula edodes* bestimmt. Hierbei wurden verschiedene Pufferlösungen verwendet und die Aktivitäten bestimmt.

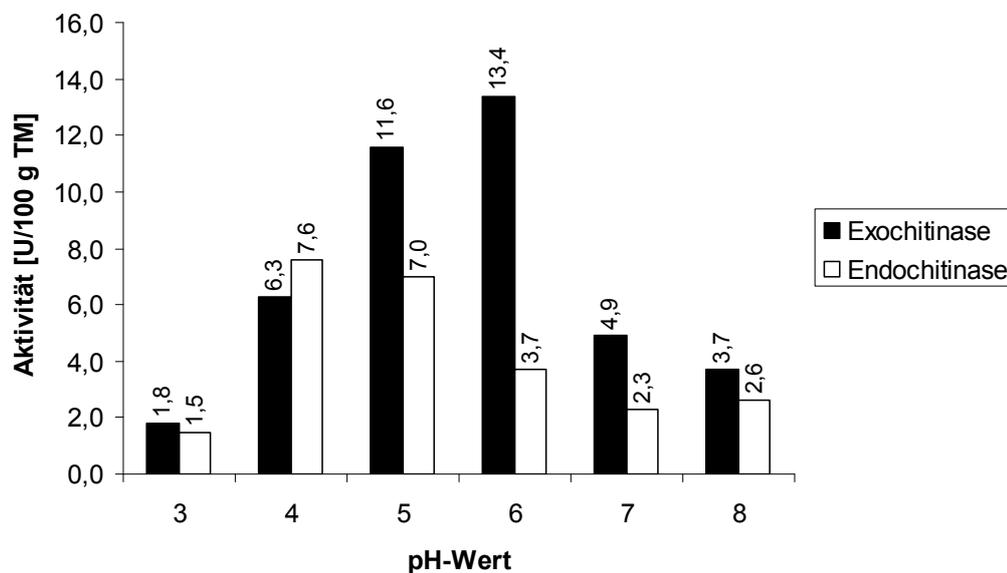


Abb. 16: Bestimmung der pH-Optima der Chitinasen aus *Lentinula edodes*.

Wie in Abbildung 16 gezeigt wird, liegt das pH-Optimum der Exochitinase bei 6 und das pH-Optimum der Endochitinase bei 4. Die Exochitinase ist für einen

Abbau von Chitin und auch für die enzymatische Extraktion aufgrund der höheren Anzahl ihrer möglichen Angriffspunkte besser geeignet.

Versuche zeigten, dass die Zugabe externer Chitinase allerdings zwingend ist, um Chitin effektiv abzubauen (siehe 4.3). Deshalb wurde auch die Zugabe von Exochitinase als Schritt der enzymatischen Extraktion konzipiert. Das pH-Optimum der zugesetzten Chitinase aus *B. subtilis* liegt ebenfalls bei 6. Aus diesem Grund wird der erste Extraktionsschritt bei pH 6 durchgeführt. Auf diese Weise kann der Abbau des Chitins optimiert und die Synergie der zugesetzten Chitinase und der pilzeigenen Enzyme genutzt werden.

Die Aktivitätsmessung (siehe Abb. 17) wurde ebenfalls unter denselben pH- und Temperaturbedingungen (pH 6, 25°C) durchgeführt. Dies ermöglicht die Bestimmung der Eigenaktivität der verwendeten Zellmaterialien. Somit ist es möglich zu beurteilen, inwieweit die pilzeigene Chitinase die enzymatische Extraktion unterstützen kann.

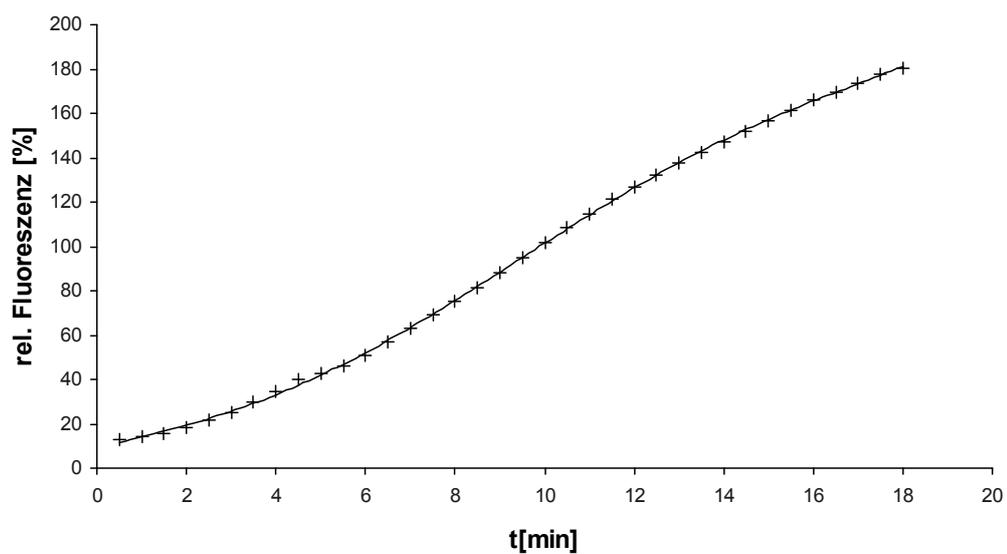


Abb. 17: Bestimmung der Endochitinaseaktivität des Fruchtkörpers von *Pleurotus eryngii*.

Durch vorhergehende Kalibrierung mit 4-MU kann die relative Fluoreszenz in die korrelierende Menge freigesetztem 4-MU umgerechnet werden. Auf diese Weise kann die Enzymaktivität im linearen Bereich ermittelt werden (siehe Tab. 13).

Tab. 13: Exo- und Endochitinaseaktivität der analysierten Proben.

Fruchtkörper	Exochitinaseaktivität [U/100 g TM]	Endochitinaseaktivität [U/g 100 g TM]
<i>L. edodes</i>	34,4±2,3	11,0±1,3
<i>P. ostreatus</i>	87,5±4,4	45,6±0,5
<i>P. eryngii</i>	32,9±1,0	24,3±3,8
<i>A. bisporus</i>	15,2±0,1	5,1±0,6
Mycel	Exochitinaseaktivität [U/ 100g TM]	Endochitinaseaktivität [U/ 100g TM]
<i>L. edodes</i>	17,1±0,6	k.A.
<i>P. ostreatus</i>	k.A.	k.A.
<i>P. eryngii</i>	6,3±0,5	k.A.
<i>P. pulmonarius</i>	26,8±2,0	k.A.
<i>A. bisporus</i>	1,1±0,1	k.A.
<i>G. frondosa</i>	9,2±0,7	k.A.
<i>T. versicolor</i>	k.A.	k.A.
<i>F. velutipes</i>	k.A.	k.A.
<i>H. tessulatus</i>	10,3±1,0	k.A.
<i>M. esculenta</i>	k.A.	k.A.

k.A.= keine Aktivität

Von den untersuchten Fruchtkörpern wurden bei den zur Familie der Pleurotaceen gehörenden *Pleurotus ostreatus* und *Pleurotus eryngii* die höchsten Aktivitäten bestimmt. Die niedrigsten Aktivitäten wurden in den Fruchtkörpern von *Flamulina velutipes*, *Hypsizygyus tessulatus* und *Agaricus bisporus* gemessen. In jedem der untersuchten Fruchtkörper ist die Exochitinaseaktivität deutlich höher als die Endochitinaseaktivität.

In dem Mycel von *Pleurotus pulmonarius* konnte die höchste Exochitinaseaktivität nachgewiesen werden. Endochitinaseaktivität konnte in keinem der untersuchten Mycelien bestimmt werden. Keine Chitinaseaktivität zeigten die Mycelien von *Pleurotus ostreatus*, *Trametes versicolor*, *Flamulina velutipes* und *Morchella esculenta*. In den vegetativen Mycelien ist die gemessene Exochitinaseaktivität deutlich niedriger als in den zugehörigen Fruchtkörpern.

Wessels (1993) beschreibt den Fruktationsprozess von Pilzen als Abbau und anschließende Neustrukturierung und Bildung der Zellwand. Bei dem Abbau spielen besonders Chitinasen eine wichtige Rolle. Dies würde die erhöhte Chitinaseaktivität in Fruchtkörpern erklären. Zudem ist der Fruchtkörper einer

Vielzahl exogener Einflüsse ausgesetzt, was eine erhöhte Neustrukturierung der Zellwand nötig macht.

Die Höhe der gemessenen Chitinaseaktivität ist für die enzymatische Extraktion zu gering. Vorversuche sowie die Ergebnisse der Extraktionsversuche zeigen deutlich, dass erst durch die externe Zugabe von Chitinase der Abbau des vorhandenen Chitins adäquat abläuft (siehe 4.3). Die Substratspezifität der pilzeigenen Enzyme ist wahrscheinlich zu gering. Hier ist es durchaus denkbar, dass zum Beispiel an das Chitin gebundene Proteine die Hydrolyse durch die eigene Chitinase unterbinden. Auf die Zugabe an entsprechender Chitinase kann deshalb nicht verzichtet werden.

4.1.2.2 Bestimmung der Glucanaseaktivität

Glucanasen können wasserunlösliche β -Glucane durch partiellen Abbau für die Extraktion zugänglich machen und die Ausbeuten erhöhen. Andererseits könnten Glucanasen auch zu einem partiellen Abbau der freigesetzten Glucane führen und die Effizienz der Extraktionsmethode mindern. Um den Einfluss der pilzeigenen Glucanasen abzuschätzen, ist eine Bestimmung der Aktivität nötig.

Zur Aktivitätsbestimmung wurde die Methode nach Siebert et al. (1981) modifiziert (siehe 3.2.3.2) und angewendet. Zunächst wurde hierfür das Zellmaterial wie beschrieben mit einer eigens entwickelten Methode aufgearbeitet (siehe 3.2.3.2). Die Aktivität wurde unter denselben pH- und Temperaturbedingungen (pH 6, 25°C) wie im ersten Schritt der enzymatischen Extraktion durchgeführt (siehe 3.2.7). Die ermittelte Enzymaktivität ermöglicht eine Einschätzung des Einflusses der pilzeigenen Enzyme auf diesen Extraktionsschritt. Nach dem ersten Extraktionsschritt erfolgt eine Inaktivierung der Enzyme. Es ist somit nicht nötig, die Aktivität unter anderen Bedingungen zu ermitteln (siehe 3.2.7).

In Tabelle 14 sind die Glucanaseaktivitäten der untersuchten Fruchtkörper und Mycelien aufgeführt.

Tab. 14: Glucanaseaktivität der Proben unter Verwendung verschiedener Substrate.

Fruchtkörper	Glucanase Aktivität (Curdlan) [U/100 g TM]	Glucanase Aktivität (Schizophyllan) [U/100 g TM]	Glucanase Aktivität (Lanimarin) [U/100 g TM]
<i>A. bisporus</i>	14,1±0,5	k.A.	47,0±3,6
<i>L. edodes</i>	274,0±10,4	38,8±1,7	446,5±16,6
<i>P. eryngii</i>	2,6±0,2	0,4±0,0	3,4±0,1
<i>P. ostreatus</i>	0,1±0,0	k.A.	0,2±0,0
Mycel	Glucanase Aktivität (Curdlan) [U/100 g TM]	Glucanase Aktivität (Schizophyllan) [U/100 g TM]	Glucanase Aktivität (Lanimarin) [U/100 g TM]
<i>A. bisporus</i>	5,6±0,4	k.A.	18,3±0,5
<i>F. velutipes</i>	34,0±0,6	k.A.	77,1±3,8
<i>G. frondosa</i>	10,6±0,9	k.A.	21,7±0,9
<i>H. tessulatus</i>	2,7±0,3	k.A.	4,3±10,6
<i>L. edodes</i>	3,6±0,0	k.A.	5,8±0,4
<i>M. esculenta</i>	2,7±0,0	k.A.	18,7±0,3
<i>P. eryngii</i>	12,2±2,0	k.A.	26,1±2,1
<i>P. ostreatus</i>	11,8±1,1	k.A.	12,1±0,9
<i>P. pulmonarius</i>	11,1±1,4	k.A.	31,7±1,4
<i>T. versicolor</i>	15,3±2,5	k.A.	17,0±0,9

k.A. = keine Aktivität

Wie die Ergebnisse zeigen, besteht eine hohe Abhängigkeit zwischen der gemessenen Enzymaktivität und dem gewählten Substrat. Die pilzeigenen Glucanasen haben zu Laminarin die höchste Substratspezifität. Lanimarin besitzt ein β -1,3-verknüpftes Glucosegrundgerüst mit β -1,3-glykosidisch verknüpften Seitenketten, die über β -1,6-glykosidischen Bindungen an die Hauptkette gebunden sind.

Die Substratspezifität für das lineare β -1,3-Glucan Curdlan ist geringer. Die Aktivität fällt deutlich geringer aus. Die Substratspezifität ist unterschiedlich stark ausgeprägt. So ist zum Beispiel die Aktivität der Glucanasen aus dem Mycel von

Morchella esculenta bei Verwendung von Curdlan als Substrat um 85,6% kleiner als die Aktivität bei Verwendung von Lanimarin. Bei der Glucanase aus dem Mycel von *Pleurotus ostreatus* liegt die Differenz hingegen nur bei 1,7%.

Wird das strukturell dem Laminarin sehr ähnliche Schizophyllan als Substrat eingesetzt, konnte nur bei wenigen Fruchtkörpern eine Aktivität bestimmt werden. Die Ergebnisse machen demnach deutlich, wie signifikant das zur Verfügung stehende Substrat die Aktivität der Glucanasen beeinflusst.

Auffällig sind die hohen Aktivitäten der Glucanasen, die aus dem Fruchtkörper von *Lentinula edodes* extrahiert werden konnten. Die gemessenen Aktivitäten sind bis auf diese Ausnahme nicht sehr hoch. Die Relevanz der pilzeigenen Glucane auf die enzymatische Extraktion wird deshalb nicht entscheidend sein.

Aufgrund der hohen Substratabhängigkeit ist es schwer möglich, den direkten Einfluss der pilzeigenen Glucanasen auf die enzymatische Extraktion abzuschätzen. Deswegen wurden weitere Versuche durchgeführt, um den Einfluss besser beurteilen zu können. So wurde vor Beginn der enzymatischen Extraktion die Glucanase thermisch inaktiviert (100°C Wasserbad, 2 min) und anschließend die Extraktion durchgeführt. Würden pilzeigene Glucanasen die freigesetzten Glucane direkt abbauen, würde die Inaktivierung der Enzyme zu einer Zunahme der Ausbeute führen. Dies konnte nicht beobachtet werden. Somit scheint der Einfluss der pilzeigenen Glucanasen nicht relevant zu sein. Dies ist für die enzymatische Extraktion besonders vorteilhaft, da die gewonnenen Glucane in ihrer Struktur erhalten bleiben.

4.1.3 Entwicklung und Optimierung quantitativer Bestimmungsmethoden zur Polysaccharidanalytik

4.1.3.1 Methodenoptimierung zur Bestimmung des Gesamt- β -1,3-Glucangehaltes

In dieser Arbeit wurde die Bestimmungsmethode nach Ko und Lin (2004), mit der sich spezifisch β -Glucane mit einem β -1,3-Grundgerüst und einer singlehelicalen Tertiärstruktur bestimmen lassen, adaptiert. In Abschnitt 2.4.1 wurde näher auf das Prinzip der Methode eingegangen. In Verbindung mit der Bestimmung der triplehelicalen β -Glucane ist es folglich möglich, den Anteil an triplehelicalen Glucanen am Gesamt- β -Glucangehalt zu bestimmen. Mit diesen Methoden

können die Gesamt- β -Glucan ausbeuten der enzymatischen Methode und der Anteil an triplehelicaler Glucane ermittelt werden. Da die gleichen Bestimmungen auch mit den Extrakten der Literaturmethode durchgeführt wurden, ist hier ein sehr aussagekräftiger Vergleich möglich.

Durch die in dieser Arbeit durchgeführte Optimierung konnte vor allem die vorausgehende Kalibrierung verbessert werden. Es konnte gezeigt werden, dass ein annähernd logarithmischer Zusammenhang zwischen Konzentration und relativer Fluoreszenz besteht (siehe Abb. 18 a). Ursprünglich wurde von Ko und Lin (2004) die relative Fluoreszenz direkt gegen die Konzentration aufgetragen und die Glucan Gehalte durch lineare Extrapolation bestimmt. Dieser direkte lineare Zusammenhang ist wie die Ergebnisse zeigen nicht sinnvoll. Für die einfache Darstellung und Handhabung der Daten wurde der Logarithmus der relativen Fluoreszenz gegen die Konzentration aufgetragen und eine lineare Regression durchgeführt. Dies ist in Abbildung 18 b) dargestellt. Die modifizierte Darstellung ermöglicht eine lineare Kalibrierung mit hoher Regression. Daher wird im späteren Verlauf dieser Arbeit diese Darstellungsform zur Gehaltsbestimmung genutzt.

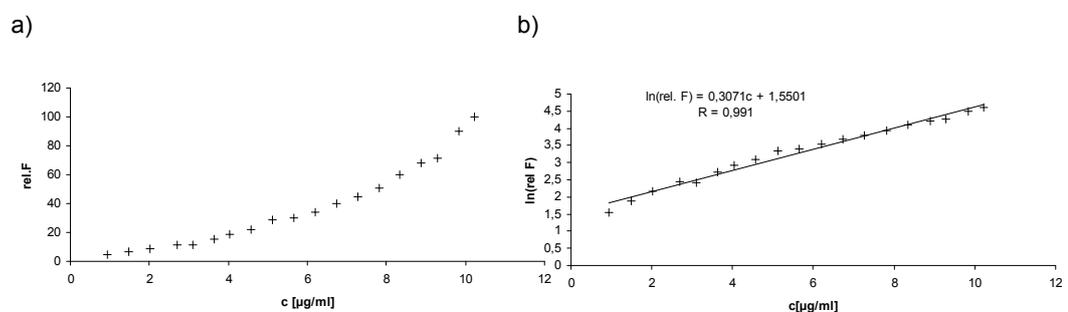


Abb. 18: Zusammenhang zwischen relativer Fluoreszenz und Konzentration: a) einfache Darstellung, b) logarithmische Darstellung.

Anschließend wurde die Nachweisgrenze der Methode nach der Kalibriergradenmethode analog DIN 32 645 bestimmt. Die Nachweisgrenze beträgt 0,048 µg/ml. Bei der quantitativen Bestimmung der Gehalte des Pilzmaterials (siehe 4.2 und 4.3) wurde darauf geachtet, dass alle Bestimmungen oberhalb der Bestimmungsgrenze von 0,144 µg/ml durchgeführt wurden.

Die Validierung des Arbeitsbereiches zeigte, dass ein linearer Zusammenhang über einen weiten Konzentrationsbereich besteht. Mit verschiedenen weiteren

Versuchen wie der Bestimmung der Wiederfindungen konnte gezeigt werden, dass die Methode für die untersuchten Glucanextrakte geeignet ist.

Mit dieser Methode lässt sich einfach der Gesamtgehalt an Glucanen der Pilzextrakte bestimmen. Somit steht mit dieser Bestimmungsmethode ein hilfreiches Werkzeug zur Bestimmung der Ausbeuten zu Verfügung.

4.1.3.2 Methodenentwicklung zur Bestimmung triplehelicaler β -Glucane mit Kongorot

β -Glucane mit einer triplehelicalen Tertiärstruktur gelten wie erwähnt als besonders wirksam (siehe 2.1). Der Anteil an triplehelicalen Glucanen am Gesamt- β -Glucangehalt ist somit ein interessantes Qualitätsmerkmal einer Extraktionsmethode. Besonders herkömmliche Verfahren wie die in dieser Arbeit zum Vergleich herangezogene Literaturmethode denaturieren die triplehelicalen Glucane. Die dort angewandten Extraktionsbedingungen führen außerdem zu einem Abbau von Seitenketten. Da die Bildung der Triplehelix stark von der Anzahl der Seitenketten abhängt, ist dies ein nicht wünschenswerter Effekt (siehe 2.1). Durch die schonende enzymatische Extraktion werden die denaturierenden und degradierenden Effekte mit großer Wahrscheinlichkeit reduziert. Daher ist die Bestimmung der triplehelicalen Glucane sinnvoll, um die enzymatische Methode mit dem Literaturverfahren besser vergleichen zu können.

Da in der Literatur keine adäquate Methode beschrieben ist, wird in dieser Arbeit ein Verfahren zur Bestimmung triplehelicaler Glucane entwickelt. Die theoretischen Aspekte der Bestimmungsmethode sind in Abschnitt 2.4.2 erläutert. Im Folgenden sind die Ergebnisse der Methodenentwicklung dargestellt.

Zunächst waren für die Entwicklung einer quantitativen Methode zur Bestimmung der triplehelicalen Glucane im Vorfeld Versuche zu verschiedenen Methodenparametern erforderlich. Hierbei mussten Versuche zur optimalen Farbstoffkonzentration, zur Ermittlung des Arbeitsbereiches usw. durchgeführt werden.

In Verbindung mit triplehelicalen β -Glucanen verschiebt sich das Absorptionsmaximum des verwendeten Farbstoffes Kongorot von 483 nm zu einer Wellenlänge von 523 nm (Ogawa et al. 1972). Kongorot lagert sich spezifisch an β -Glucanen an, die als Triplehelix vorliegen. Abbildung 19 zeigt das Absorptionsspektrum von Kongorot sowie von Kongorot in Gegenwart von Schizophyllan

und einer exemplarisch ausgewählten Probe (Methode: Literaturmethode, Extrakt: NaOH, Probe Mycel von *Pleurotus ostreatus*). Der bathochrome Shift ist in Gegenwart von Schizophyllan und Probenextrakt deutlich zu erkennen.

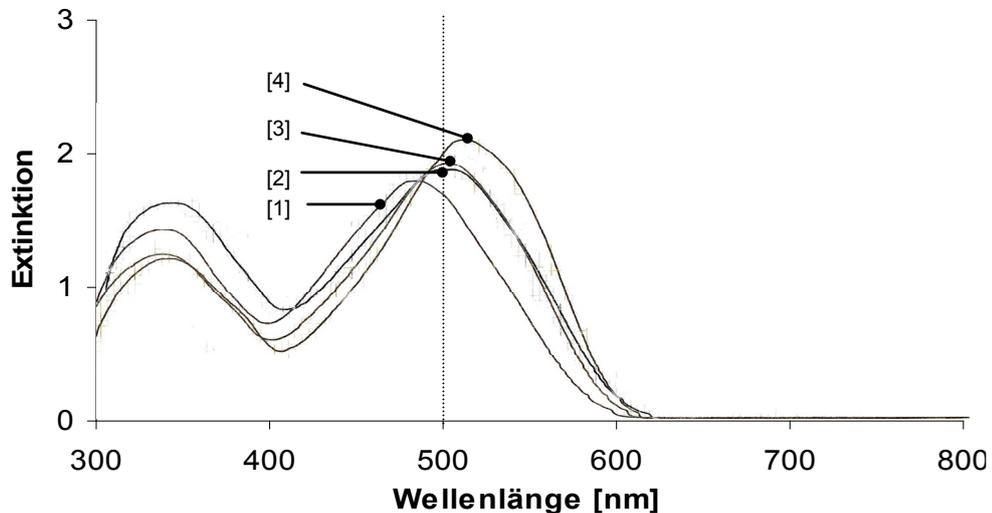


Abb. 19: Absorptionsspektren einer [1] Blindlösung, der [2] NaOH-Fraktion von *Pleurotus ostreatus* Mycel, einer [3] 100 µg/ml Schizophyllanlösung und einer [4] 200 µg/ml Schizophyllanlösung.

Als Messwellenlänge wurde 523 nm verwendet. Dabei wurde in dieser Methode immer gegen einen glucanfreien Blindwert gemessen, der nur Kongorot in entsprechender Konzentration enthielt. So wurde nur der bathochrome Shift gemessen, der aus dem Kongorot-Glucan-Komplex resultierte.

Bei einer fotometrischen Bestimmungsmethode ist die Konzentration an eingesetztem Farbstoff von entscheidender Bedeutung. Um eine optimale Farbstoffkonzentration zu ermitteln, wurden verschiedene Konzentrationen an Farbstoff untersucht. Dazu wurden Kongorotlösungen mit unterschiedlichen Gehalten hergestellt und eine Kalibrierung mit dem Schizophyllanstandard über einen Konzentrationsbereich von 50-700 µg/ml Schizophyllan durchgeführt. Die Ergebnisse zeigten, dass eine quantitative Bestimmung nur mit 0,03-0,11%igen Kongorotlösungen (w/v) in einem Konzentrationsbereich von 30-150 µg/ml Schizophyllan möglich ist. Höhere Gehalte an Kongorot verhindern aufgrund ihrer starken Eigenfärbung eine exakte fotometrische Bestimmung, während eine zu geringe Farbstoffkonzentration zu keinem nachweisbaren bathochromen Shift führt. Die Gültigkeit des Arbeitsbereiches wurde für jede Farbstoffkonzentration analog geprüft.

Die optimale Konzentration an Kongorot wurde ermittelt, indem die Empfindlichkeit der Methode in Abhängigkeit zu der Farbstoffkonzentration überprüft und verglichen wurde (siehe Abb. 20).

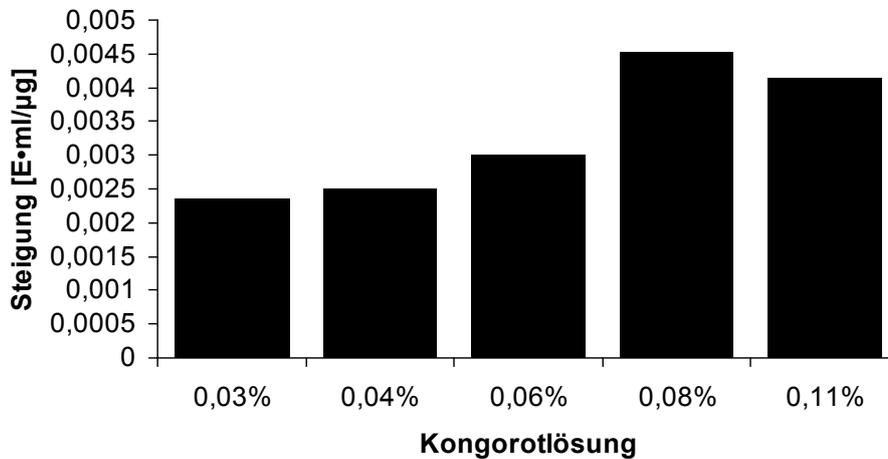


Abb. 20: Empfindlichkeit (Steigung der Kalibriergeraden) der Methode bei verschiedenen Farbstoffkonzentrationen.

Aufgrund der Ergebnisse wurde eine Kongorotkonzentration von 0,08% (w/v) gewählt. Die Methode wurde dementsprechend mit dieser Farbstoffkonzentration in einem Konzentrationsbereich von 30-150 µg/ml Schizophyllan statistisch validiert.

In diesem Bereich ist ein linearer Zusammenhang, geprüft nach Mandel (1964), zwischen Konzentration und Extinktion vorhanden. In Abbildung 21 ist beispielhaft eine Kalibriergerade der Methode mit 95%igen Prognoseintervall dargestellt.

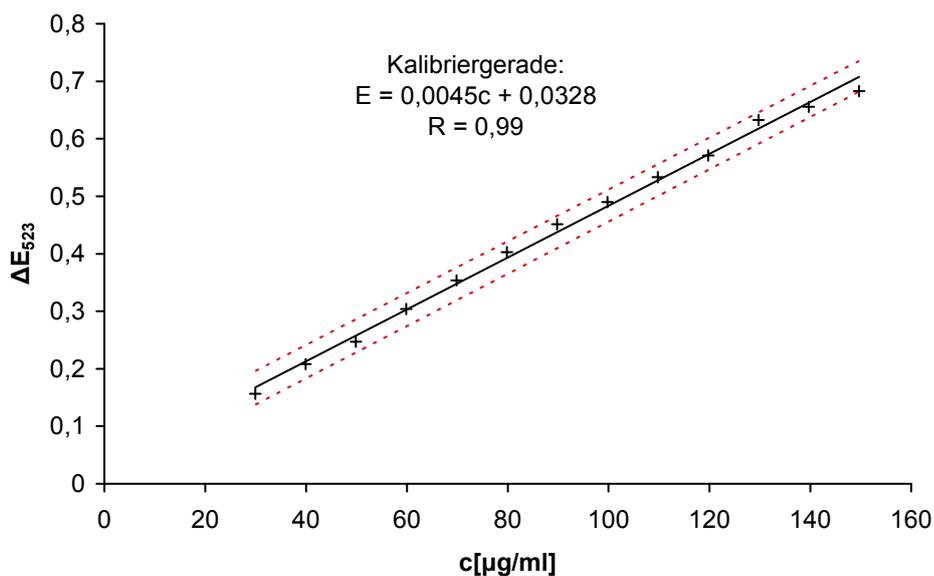


Abb. 21 Kalibriergerade der Methode in einem Konzentrationsbereich von 30-150 µg/ml Schizophyllan.

Die Nachweisgrenze der Methode wurde nach der Kalibriergradenmethode entsprechend DIN 32 645 bestimmt. Weitere Validierungsparameter wurden wie in 3.2.4.4 erläutert ermittelt. In Tabelle 15 sind diese Parameter zusammengefasst dargestellt.

Tab. 15: Zusammenfassung der ermittelten Validierungsparameter.

Parameter	
Arbeitsbereich	30-150 µg/ml
X_{NG} ($\alpha=\beta=0,1\%$; $n=30$)	8,53 µg/ml
Empfindlichkeit ($n=30$)	$0,00467\pm 9; 379 \cdot 10^{-5}$ E·ml/µg
S_y ($n=30$)	0,012
S_{x0} ($n=30$)	2,64
V_{x0} ($n=30$)	2,9%
Rel. W. ($n=20$)	$9\pm 3\%$
Messpräzision ($n=10$)	$103\pm 5\%$
Varianzenhomogenität $\alpha=0,01$; $f_1=1$; $f_2=10$	erfüllt
Linearität nach Mandel $\alpha=0,01$; $f_1=1$; $f_2=10$	erfüllt

Für die Methode liegt demnach eine Varianzenhomogenität des Arbeitsbereiches vor. Wie auch für den Mandel-Test wurde eine statistische Sicherheit von 99% gewählt.

Die in dieser Arbeit entwickelte fotometrische Methode auf Basis des Kongorot- β -Glucan-Komplexes ist somit sehr gut für die Quantifizierung von triplehelicalen β -Glucanen in den Probenextrakten geeignet.

Mit einer Nachweisgrenze von 8 µg/ml steht eine Methode zur Verfügung, die eine Messung von triplehelicalen β -Glucanen in relativ geringen Konzentrationen ermöglicht. Der relative Variationskoeffizient von 2,9% bestätigt, dass eine Messung von β -Glucanen mit guter Präzision erfolgt. Die Einflüsse der verschiedenen Probenmatrizes auf die Messung wurden exemplarisch untersucht und sind für eine Methode dieser Art als gering einzuschätzen. Dies bestätigt, dass für ein quantitatives Screening der aus Pilzmaterial extrahierten β -Glucane mit triplehelicaler Tertiärstruktur keine aufwendige Aufreinigung nötig ist, um genaue Messwerte zu erhalten. Diese neuartige Methode erfüllt die in dieser Arbeit geforderten Ansprüche an eine Bestimmung. In Verbindung mit der modifizierten fluorimetrischen Bestimmungsmethode der Gesamt- β -Glucane lässt sich der Anteil dieser wichtigen triplehelicalen Tertiärstruktur am Gesamt- β -Glucan-

gehalt ermitteln. Die Bestimmung dieses Verhältnisses ist ein interessantes Ergebnis, welches als Qualitätsmerkmal, auch in Hinsicht auf die potentielle Wirkung des Glucans, fungieren kann.

4.1.4.1 Entwicklung eines quantitativen Spot Assays zur Bestimmung von Chitin

Wie bereits in 2.1 beschrieben ist Chitin stark über ein sogenanntes „Cross-Linking“ mit Glucanen vernetzt. Bei der in dieser Arbeit entwickelten Extraktionsmethode soll diese Vernetzung durch den enzymatischen Abbau des Chitins gelöst werden.

Ein bekanntes Verhältnis zwischen eingesetztem Enzym und Substrat ist für die Entwicklung der enzymatischen Extraktionsmethode wichtig. Durch einen bekannten Chitingehalt lässt sich die Menge an nötiger Chitinase bestimmen. Da somit das Verhältnis von Substrat und Enzym bekannt ist, lässt sich die Inkubationsdauer ebenfalls abschätzen. Dies vereinfacht die Entwicklung der Extraktionsmethode immens. Außerdem kann bei einem konstanten Enzym-Substratverhältnis die Reproduzierbarkeit der durchgeführten analytischen Bestimmungen gewährleistet werden.

Aktuelle Bestimmungsmethoden sind wie bereits erwähnt problematisch (siehe 2.4). Deshalb wurde im Rahmen dieser Arbeit eine neuartige Bestimmungsmethode für Chitin entwickelt. Diese beruht auf der Reaktion der im sauren Milieu positiv geladenen Aminofunktion des Chitosans und des Polyiodidanions der Lugol'schen Lösung. Der entstandene Polyiodid-Chitosankomplex ist wie auch weitere anionische Chitosankomplexe unlöslich. Daher wurde die Methode als Spot Assay auf einem geeignetem Trägermaterial konzipiert (siehe 2.4.3). Durch verschiedene Versuche konnte gezeigt werden, dass keine Querempfindlichkeit zu Proteinen besteht. So wurden bis zu 5 mg/ml Protein (BSA) zu diversen Chitosanstandards hinzugesetzt. Einen Einfluss auf die Bestimmung des Chitosangehaltes konnte nicht beobachtet werden.

Für die Chitinbestimmung wurde in einer vorangegangenen Aufarbeitung Chitin zu Chitosan deacetyliert und isoliert (siehe 3.2.4.1). Anschließend wurde die entwickelte Methode zur Bestimmung durchgeführt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden weitere anionische Farbstoffe wie Säurefuchsin getestet. Das beste Ergebnis hinsichtlich Empfindlichkeit, Reproduzierbarkeit und im Bezug auf Kreuzreaktivität wurde mit Lugol'scher Lösung erzielt.

Vorversuche zeigten des Weiteren, dass die Entwicklung mit 1% Lugol'scher Lösung am besten ist, da hier einfach das überschüssige Iod mittels Warmluftstrom entfernt werden kann. Zudem führt das Besprühen der Platte mit Detektionsreagenz zu besseren Ergebnissen als das Tauchen der Platten.

Die getesteten Trägermaterialien sind in 3.1.6 aufgeführt. Für den Vergleich der Trägermaterialien wurde Chitosan in einem Konzentrationsbereich von 0,5-5 mg/ml aufgetragen und die dadurch erhaltene Kalibriergerade hinsichtlich Linearität und Empfindlichkeit verglichen. Von den getesteten Trägermaterialien konnten mit Kieselgel 60 TLC-Platten (0,2 mm Schichtdicke) die besten Ergebnisse hinsichtlich Empfindlichkeit und Linearität erzielt werden. Daraufhin wurden alle Versuche auf diesem Material durchgeführt. Ein Beispiel für eine Bestimmung ist in Abbildung 22 dargestellt.

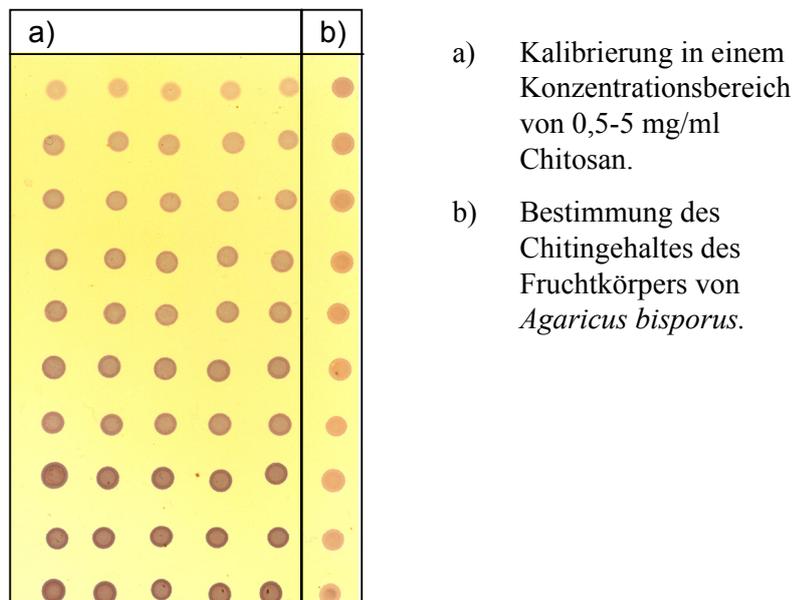


Abb. 22: Beispiel der densitometrischen Bestimmung.

Die Kalibrierungen wurden mit Chitosan in einem Konzentrationsbereich von 0,5-5 mg/ml durchgeführt. Ein Beispiel für eine Kalibriergerade ist in Abbildung 23 wiedergegeben.

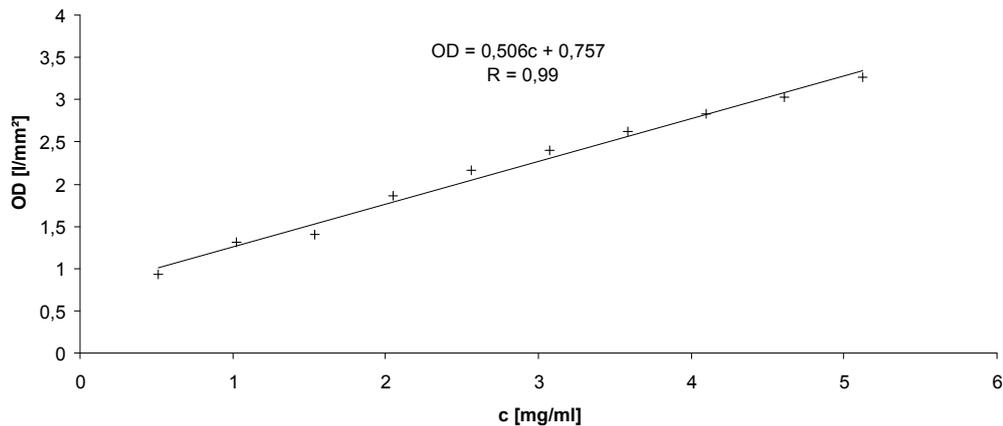


Abb. 23: Kalibriergerade in einem Konzentrationsbereich von 0,5-5 mg/ml Chitosan.

Die Bestimmung von Chitin als Chitosan setzt voraus, dass Chitin durch den gewählten Deacetylierungsschritt vollständig in Chitosan überführt werden kann. Um dies zu überprüfen, wurde käufliches Chitin, wie beschrieben in Anlehnung an Chang et al. (1977), mit gesättigter Kaliumhydroxid-Lösung deacetyliert (siehe 3.2.4.1). Danach wurde das entstandene Chitosan mit Chitosanstandards quantitativ bestimmt. Es konnten $93\pm 9\%$ des ursprünglichen Chitins als Chitosan bestimmt werden. Eine mathematische Umrechnung der Ergebnisse ist demnach nicht nötig und die Bestimmung des Chitingehaltes kann direkt durch die Kalibrierung mit Chitosanstandards erfolgen.

In Tabelle 16 sind einige statistische Kenndaten der Methode angegeben. Sie ermöglichen die Beurteilung der Validität der Methode.

Tab. 16: Validierungsparameter der Bestimmungsmethode für Chitin.

Parameter	
Arbeitsbereich	0,5-5 mg/ml
X_{NG} ($\alpha=\beta=0,1\%$)	107 $\mu\text{g/ml}$
Empfindlichkeit (n=30)	$0,50 \text{ I}\cdot\text{mm}^{-2}/\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$
S_y (n=30)	0,045
S_{x0} (n=30)	0,082
V_{x0} (n=30)	2,9%
Rel. W. (n=20)	$101\pm 8\%$.
Messpräzision (n=10)	$98\pm 4\%$.
Varianzenhomogenität $\alpha=0,01$; f1=1; f2=10	erfüllt
Linearität nach Mandel $\alpha=0,01$; f1=1; f2=10	erfüllt

Die Nachweisgrenze wurde nach DIN 32 645 unter Verwendung der Kalibriergradenmethode bestimmt. Die Wiederfindung wurde unter Verwendung drei verschiedener Proben bestimmt. Hierzu wurde ebenfalls käuflich erworbenes Chitin benutzt.

Mit dieser Methode ist erstmals eine direkte Bestimmung von Chitin möglich. Es konnten keine Kreuzreaktionen mit Substanzen der Probenmatrices, wie sie bei anderen Methoden auftreten, beobachtet werden (siehe 2.4.3). Des Weiteren besitzt die Methode Vorteile gegenüber enzymatischen Bestimmungsmethoden. Die Nachteile dieser Methoden wurden bereits in der Theorie erläutert (siehe 2.4.3).

Problematisch bei dieser Bestimmungsmethode ist der recht hohe Konzentrationsbereich, in dem gearbeitet werden muss. Die Aufarbeitungsmethode muss dementsprechend angepasst werden. Eine geeignete Aufarbeitung konnte ebenfalls entwickelt werden (siehe 3.2.4.1).

Die Validierungsparameter zeigen, dass die entwickelte Methode ein nützliches Werkzeug zur Bestimmung von Chitin in Zellmaterialien aus Pilzen darstellt. Mit ihrer Hilfe lässt sich der Chitingehalt der verwendeten Pilze bestimmen. Die Ergebnisse der Chitinbestimmung, die wie beschrieben für die Entwicklung der enzymatischen Extraktionsmethode besonders wichtig sind, sind im Folgenden Abschnitt dargestellt.

4.1.4.2 Bestimmung des Chitingehaltes von Echten Pilzen

Mit der beschriebenen Bestimmungsmethode wurde der Chitingehalt der verwendeten Zellmaterialien der unterschiedlichen Pilze untersucht. Hierbei wurde im Mittel ein Chitingehalt von 2,5 g/100 g TM für Mycelien und von 3,5 g/100 g TM für die untersuchten Fruchtkörper ermittelt. Die erhaltenen Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle aufgeführt (siehe Tab. 17).

Tab. 17: Chitingehalte der verschiedenen Spezies.

Fruchtkörper	Chitingehalt [g/100 g TM]
<i>Agaricus bisporus</i>	4,7±0,9
<i>Lentinula edodes</i>	1,9±0,2
<i>Pleurotus eryngii</i>	3,2±0,4
<i>Pleurotus ostreatus</i>	0,8±0,2

Mycel	Chitingehalt [g/100 g TM]
<i>Agaricus bisporus</i>	9,6±1,2
<i>Flammulina velutipes</i>	1,2±0,2
<i>Grifola frondosa</i>	1,6±0,2
<i>Hypsizygus tessulatus</i>	1,6±0,2
<i>Lentinula edodes</i>	2,5±0,2
<i>Morchella esculenta</i>	1,7±0,4
<i>Pleurotus eryngii</i>	3,6±0,4
<i>Pleurotus ostreatus</i>	0,8±0,3
<i>Pleurotus pulmonarius</i>	1,6±0,2
<i>Trametes versicolor</i>	1,3±0,1

Hervorzuheben ist der hohe Chitingehalt der Fruchtkörper von *Agaricus bisporus* und *Pleurotus eryngii*. Bei den Mycelien ist besonders der vergleichbar hohe Gehalt in *Agaricus bisporus* auffällig. Das Mycel von *Pleurotus eryngii* weist auch einen etwas höheren Gehalt auf. Es ist kein Zusammenhang zwischen der Familiensystematik und dem Chitingehalt zu erkennen. So variiert zum Beispiel der Chitingehalt der untersuchten Mycelien der Pilze aus der Familie der Pleurotacean stark voneinander. Das Mycelium des Ascomyceten *Morchella esculenta* zeigt keinen Unterschied zu den Mycelien der Basidiomyceten. Vetter und Siller (1993) bestimmten den Chitingehalt verschiedener wild gewachsener Fruchtkörper. Sie verwendeten dazu die Methode nach Smith und Gilkerson (1979). Sie konnten Gehalte in einem Bereich von 0,1-9,7 g/100 g TM bestimmen. Diese Werte liegen in derselben Größenordnung wie die in dieser Arbeit ermittelten Ergebnisse. Später konnte Vetter (2007) einige kommerziell gezüchtete Fruchtkörper, die in dieser Arbeit ebenfalls untersucht wurden, analysieren. Die von Vetter bestimmten Gehalte lagen im Bereich 6-8 g, 2-5 g und 5-6 g Chitin/100 g TM für verschiedene Varianten von *Agaricus bisporus*, *Pleurotus ostreatus*

und *Lentinula edodes*. Wie seine Ergebnisse zeigten, schwankt der Chitingehalt schon zwischen unterschiedlichen Varianten erheblich. Mit der hier beschriebenen neuartigen Bestimmungsmethode konnten vergleichbare Werte ermittelt werden.

Ofenbeher-Miletić et al. (1984) bestimmten ebenfalls den Chitingehalt verschiedener Pilze. Hierzu ermittelten sie den Stickstoffgehalt unlöslicher Extraktionsrückstände und errechneten daraus den Chitingehalt. Die ermittelten Ergebnisse liegen in einem Bereich von 1,9-13,6 g/100 g TM. Sie sind mit denen in dieser Arbeit ermittelten Ergebnissen ebenfalls vergleichbar. Weitere Arbeiten bestätigen Chitingehalte in diesen Größenordnungen (z.B. Chen und Johnson 1983, Dikeman et al. 2005).

Mit den erhaltenen Werten lässt sich die Menge an verfügbarem Substrat für den Abbau für Chitinase bei definierter Einwaage bestimmen. Dadurch sind Faktoren wie die Menge des nötigen Enzyms und die benötigte Inkubationsdauer für den kompletten Abbau des Chitins kalkulierbare Faktoren. Dies macht die in diesem Abschnitt gewonnenen Ergebnisse für die spätere Entwicklung der enzymatischen Extraktionsmethode äußerst wichtig.

Die prozentuale Menge des Chitins an der Trockenmasse ist allerdings für die meisten Zellmaterialien recht gering. Dies könnte negativen Einfluss auf die enzymatische Extraktion haben. Möglicherweise könnte der Abbau dieser relativ kleinen Komponente und des damit verbundenen Lösens des „Cross-Linkings“ zu Glucanen nicht ausreichen, um Glucane zu extrahieren. Die weiteren Ergebnisse dieser Arbeit haben allerdings gezeigt, dass durch die Inkubation mit Chitinase Glucane unter gewissen Bedingungen extrahiert werden können. Dies ist in 4.3 näher diskutiert.

4.2 Bestimmung der Ausbeuten an β -Glucanen bei Verwendung der Literaturmethode

Bei der Entwicklung einer neuartigen Extraktionsmethode ist der Vergleich mit etablierten Extraktionsmethoden interessant. Für einen Vergleich wurde für diese Arbeit die in der Literatur beschriebene Extraktionsmethode von Sietsma und Wessels (1977) ausgewählt. Diese Methode wurde für quantitative Bestimmungen allerdings modifiziert (siehe 3.2.4.2). Der Vergleich der Ausbeuten ermöglicht die Beurteilung der Effektivität der enzymatischen Extraktionsmethode gegenüber der Literaturmethode. Die in dieser Arbeit entwickelte Methode ist für eine Glucanextraktion nur praktikabel, wenn zumindest annähernd so hohe Ausbeuten gewonnen werden wie bei der Literaturmethode. Die Wahl fiel auf dieses Verfahren, weil ihr Prinzip beispielhaft für gängige Extraktionsmethoden ist (siehe 2.1). In diesem Abschnitt werden die erzielten Ausbeuten sowohl an triplehelicalen Glucanen als auch die Ausbeute an Gesamt- β -Glucanen bestimmt. In 4.3 und 5 werden die Daten mit den Ergebnissen der enzymatischen Extraktion verglichen. Dieser Vergleich ist äußerst interessant und ermöglicht es, die enzymatische Extraktionsmethode hinsichtlich der erzielten Ausbeuten zu beurteilen. Des Weiteren werden ab 4.4 folgend die erhaltenen Produkte strukturanalytisch charakterisiert und anschließend mit den Produkten der enzymatischen Extraktion verglichen.

Wie in 3.2.6 beschrieben ist, werden durch die Extraktionsmethode von Sietsma und Wessels (1977) drei Glucanfraktionen gewonnen. Diese wurden separat hinsichtlich ihrer Glucangehalte untersucht.

Zunächst wurden diese Fraktionen nach der Methode von Ko und Lin (2004) analysiert und der Gesamt- β -Glucangehalt bestimmt. In Tabelle 18 sind die Gesamt- β -Glucan ausbeuten der Literaturmethode dargestellt.

Tab. 18: Gesamt- β -Glucan ausbeuten der Literaturmethode in der Trockenmasse.

Fruchtkörper	KOH-Fraktion [g/100 g]	HCl-Fraktion [g/100 g]	NaOH-Fraktion [g/100 g]	Gesamt [g/100 g]
<i>Agaricus bisporus</i>	1,5 \pm 0,2	0,7 \pm 0,3	0,4 \pm 0,0	3,8
<i>Lentinula edodes</i>	4,5 \pm 0,1	0,5 \pm 0,1	4,5 \pm 0,1	9,5
<i>Pleurotus eryngii</i>	3,1 \pm 0,1	0,5 \pm 0,1	9,8 \pm 0,1	13,5
<i>Pleurotus ostreatus</i>	2,3 \pm 0,1	0,8 \pm 0,0	6,0 \pm 0,5	9,1
Mycel	KOH-Fraktion [g/100 g]	HCl-Fraktion [g/100 g]	NaOH-Fraktion [g/100 g]	Gesamt [g/100 g]
<i>Agaricus bisporus</i>	0,7 \pm 0,1	2,1 \pm 0,2	0,9 \pm 0,3	3,8
<i>Flammulina velutipes</i>	2,3 \pm 0,2	0,8 \pm 0,0	0,8 \pm 0,2	4,0
<i>Grifola frondosa</i>	3,3 \pm 0,7	0,6 \pm 0,0	1,0 \pm 0,2	4,9
<i>Hypsizygus tessulatus</i>	2,2 \pm 0,2	1,0 \pm 0,1	1,1 \pm 0,0	4,2
<i>Lentinula edodes</i>	2,3 \pm 0,0	0,9 \pm 0,0	0,9 \pm 0,1	4,2
<i>Morchella esculenta</i>	1,2 \pm 0,1	1,3 \pm 0,2	1,4 \pm 0,2	4,0
<i>Pleurotus eryngii</i>	1,9 \pm 0,1	0,9 \pm 0,1	0,6 \pm 0,0	3,3
<i>Pleurotus ostreatus</i>	2,6 \pm 0,3	0,9 \pm 0,1	1,1 \pm 0,0	4,6
<i>Pleurotus pulmonarius</i>	1,5 \pm 0,3	0,6 \pm 0,1	0,5 \pm 0,0	2,5
<i>Trametes versicolor</i>	4,4 \pm 0,4	1,2 \pm 0,1	1,2 \pm 0,1	6,8

Die Gesamt- β -Glucan ausbeuten der Mycelienproben lagen bei 2,5-4,9 g/100 g Trockenmasse, während die der Fruchtkörper bei 2,6-13,4 g/100 g Trockenmasse lag. Bei den Fruchtkörpern ist besonders *Pleurotus eryngii* auffällig. Aus diesem können mit Abstand die größten Mengen an Gesamt- β -Glucan extrahiert werden. Bei den Mycelien konnte aus *Trametes versicolor* die meisten β -Glucane isoliert werden. Aus *Agaricus bisporus* konnten sowohl aus dem Fruchtkörper als auch aus dem Mycel nur vergleichbar geringe Mengen Glucan extrahiert werden. Bemerkenswert ist hier der hohe Chitingehalt in *Agaricus bisporus* Zellmaterialien (siehe 4.1.4.2). Ein Zusammenhang zwischen Glucan und Chitingehalt ist durchaus denkbar, da es sich bei beiden Substanzen um strukturgebende Zellwandkomponenten handelt, die ähnliche Funktionen besitzen.

Es konnte kein Zusammenhang zwischen den einzelnen Pilzfamilien, Genera und sogar Abteilung festgestellt werden. Es gibt für keine Familie signifikante Übereinstimmungen hinsichtlich des Glucangehalts.

Aus dem vegetativen Mycel konnten annähernd gleiche Mengen β -1,3-Glucane mit der HCl- und NaOH-Fraktion isoliert werden. Der Hauptanteil mit 41,5% konnte durch die KOH-Extraktion isoliert werden. Bei den Fruchtkörpern hingegen wurde der Hauptteil in etwa gleichen Mengen durch die Behandlung mit KOH und NaOH extrahiert. Nur ein relativ geringer Anteil konnte durch die Extraktion mit Salzsäure gewonnen werden. Aufgrund dieser Beobachtungen und des in der Literatur beschriebenen besseren Lösungsverhaltens von Glucanen in alkalischen Lösungen (Wasser 2002 und 2010, Synytsya et al. 2008) wurden in der Konzeption der enzymatischen Extraktionsmethode alkalische Extraktionsschritte verwendet. Diese bestätigten sich später als sehr wirkungsvoll (siehe 4.3). Die Verteilung der Ausbeuten auf die einzelnen Fraktionen zeigt deutlich, dass die alkalischen Extraktionsschritte effektivere Isolationschritte sind. (siehe Abb. 24).

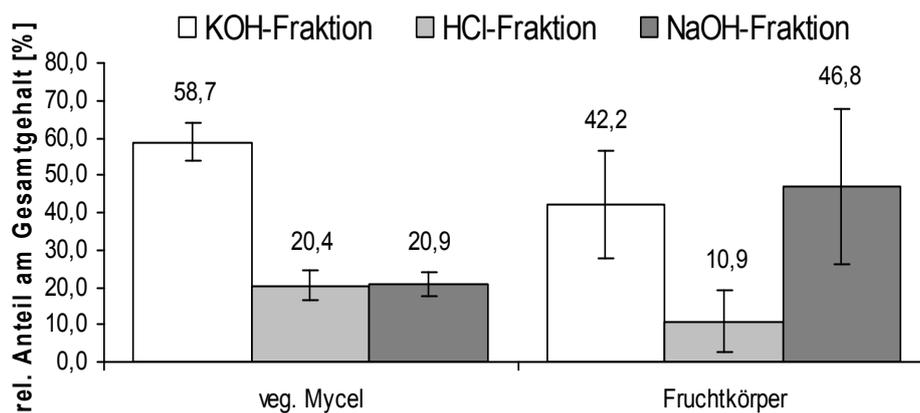


Abb. 24: Verteilung der Ausbeuten an Gesamt- β -Glucanen auf die verschiedenen Fraktionen der Literaturmethode.

Die höheren Anteile an triplehelicalen Glucanen in den alkalischen Fraktionen lässt sich durch die bessere Löslichkeit der Glucane in jenen Lösungen erklären. Der hohe Anteil der durch die Salzsäure extrahierten β -1,3-Glucane des Mycel legt nahe, dass im Mycel anders als im Fruchtkörper die Glucane nicht so stark mit der Chitinmatrix verknüpft sind. Zudem sollte es sich hierbei um niedermolekulare da säurelösliche Glucane handeln. Die absoluten Mengen an β -Glucanen, die durch Salzsäure im Fruchtkörper und Mycel isoliert wurden, sind sehr ähnlich. Im Fruchtkörper scheinen somit zusätzliche, stärker mit der Zellwandmatrix verknüpfte Glucane eingebunden zu sein. Diese lassen sich erst durch einen weiteren alkalischen Extraktionsschritt in Lösung bringen. Die hohe Effektivität des ersten Extraktionsschrittes bei den Mycelien erklärt sich durch

geringere Verknüpfungen der Glucane mit anderen Zellwandkomponenten sowie durch eine bessere Löslichkeit der Glucane. Die Mycelien könnten somit das bessere Ausgangsmaterial für die enzymatische Gewinnung von Glucanen darstellen. Die milden Extraktionsbedingungen, die angewendet werden sollen, könnten bei leicht zugänglichen Glucanen effektiver sein.

Die Beobachtung, dass Pilzmycel niedrige Gehalte besitzen bzw. das niedrige Ausbeuten erzielt werden, ist nicht überraschend. Pilzmycel bildet im Boden lockere Strukturen. Dies ermöglicht dem Pilz besser Arbuskeln auszubilden oder Nährstoffe im Allgemeinen aufzunehmen. Der Fruchtkörper benötigt ein dichteres Zellgewebe, um sowohl biotischen als auch abiotischen Einflüssen standzuhalten. Diese Zelldichte ist ein möglicher Grund für die höheren Gehalte an β -Glucanen in Fruchtkörpern.

Die erhaltenen Ergebnisse sind mit bereits existierenden Literaturdaten durchaus vergleichbar. So konnten Park et al. (2003) und Ree et al. (2008) β -1,3-Glucan-gehalte von 8,3 g für den Fruchtkörper von *Inonotus obliquus* und 10,1 g/100 g Trockenmasse für den Fruchtkörper von *Agaricus brasiliensis* bestimmen. Obwohl diese Fruchtkörper hier nicht untersucht wurden, konnten ähnliche Gehalte in den Fruchtkörpern der untersuchten Spezies bestimmt werden. Diese beiden Arbeitsgruppen extrahierten die Glucane vor einer durchgeführten enzymatischen Bestimmung zunächst mit alkalischen Lösungen. Wird dieser Extraktionsschritt nicht durchgeführt, können nur Gehalte in einer Größenordnung von 0,2 g-0,4 g/100 g Trockenmasse bestimmt werden (Manzi 2001 a, b).

Neben der Bestimmung der Gesamt- β -Glucanausbeute wurden die gewonnenen Fraktionen mit der in 4.1.3.2 beschriebenen neu entwickelten Methode zur Bestimmung der β -1,3-1,6-Glucane analysiert. Der Anteil an triplehelicalen Glucanen kann als Qualitätsmerkmal der gewonnenen Glucane dienen. Die Wirkpotenz der triplehelicalen Glucane wurde bereits diskutiert (siehe 2.1).

Die Bestimmung der triplehelicalen Glucane ist Teil der Strukturaufklärung der Glucane. In diesem Kontext wird diese Bestimmung ebenfalls in Abschnitt 5 aufgegriffen. In Tabelle 19 sind die Ergebnisse der Bestimmung aufgeführt.

Tab. 19: Ausbeuten an triplehelicalen Glucanen in der Trockenmasse unter Verwendung der Literaturmethode.

Fruchtkörper	KOH-Fraktion [g/100 g]	HCl-Fraktion [g/100 g]	NaOH-Fraktion [g/100 g]	Gesamt [g/100 g]
<i>Agaricus bisporus</i>	0,5±0,0	0,5±0,1	1,0±0,0	1,9
<i>Lentinula edodes</i>	4,3±0,4	0,3±0,0	4,9±0,2	9,5
<i>Pleurotus eryngii</i>	3,3±0,1	0,0±0,0	9,7±1,0	12,9
<i>Pleurotus ostreatus</i>	2,2±0,6	0,1±0,0	6,0±0,3	8,3

Mycel	KOH-Fraktion [g/100 g]	HCl-Fraktion [g/100 g]	NaOH-Fraktion [g/100 g]	Gesamt [g/100 g]
<i>Agaricus bisporus</i>	0,0±0,0	2,5±0,3	0,9±0,1	3,4
<i>Flammulina velutipes</i>	n.b.	0,7±0,0	0,8±0,1	-
<i>Grifola frondosa</i>	0,7±0,3	0,6±0,0	0,5±0,1	1,8
<i>Hypsizygus tessulatus</i>	0,8±0,0	0,2±0,0	1,1±0,2	2,1
<i>Lentinula edodes</i>	1,3±0,2	0,5±0,1	0,8±0,0	2,6
<i>Morchella esculenta</i>	0,7±0,3	1,2±0,1	1,0±0,3	2,9
<i>Pleurotus eryngii</i>	n.b.	0,9±0,1	0,4±0,0	-
<i>Pleurotus ostreatus</i>	1,4±0,0	0,4±0,1	1,2±0,1	3
<i>Pleurotus pulmonarius</i>	0,1±0,1	0,1±0,0	0,3±0,0	0,4
<i>Trametes versicolor</i>	1,9±0,2	0,3±0,1	1,2±0,0	3,3

n.b. = nicht bestimmbar

Der Gesamtgehalt an triplehelicalen Glucanen liegt in den verschiedenen Zellmaterialien in einem Bereich von 0,4-3,3 g/100 g Trockenmasse bei den Mycelien und 1,9-2,9 g/100 g Trockenmasse bei den Fruchtkörpern.

Aus dem Mycel von *Pleurotus pulmonarius* konnte nur eine sehr geringe Menge an β -1,3-1,6-Glucanen isoliert werden. Die dort erhaltenen Ausbeuten weichen deutlich von denen der anderen Proben ab. Dazu zählt auch die Probe von *Pleurotus ostreatus*. Auch sonst konnte kein familiärer Zusammenhang beobachtet werden. Die Gesamtausbeute an triplehelicalen Glucanen aus den Mycelien von *Flammulina velutipes* und *Pleurotus eryngii* konnte nicht gemessen werden. Bei der Analyse der jeweiligen KOH-Fractionen konnte kein bathochromer Shift beobachtet werden. Deshalb werden diese Werte nicht berücksichtigt. Möglicherweise könnte das Glucan durch die durchgeführte Neutralisation nicht entsprechend renaturiert worden sein.

Es gibt nur wenige Daten aus der Literatur, die mit diesen Ergebnissen verglichen werden können. Mizuno et al. (2001) publizierte eine interessante ELISA-

Methode zur Quantifizierung pilzlicher β -Glucane. Mit diesem Assay wurden zum Beispiel für die Fruchtkörper von *Grifola frondosa* 2,4 g, *Lentinula edodes* 3,4 g und *Flammulina velutipes* β -Glucan pro 100 g Trockenmasse bestimmt. Allerdings variierten die Ergebnisse je nachdem, welcher Antikörper verwendet wurde. Da allerdings für eine exakte Bestimmung für die jeweiligen Glucane ein spezifischer Antikörper durch zeitaufwendige Prozesse hergestellt werden muss, ist die Anwendung dieser Methode stark eingeschränkt. Ansonsten sind die dort ermittelten Ergebnisse durchaus mit denen, die in dieser Arbeit vorgestellt wurden, vergleichbar. Die erhaltenen Ergebnisse von Mizuno et al. liegen in derselben Größenordnung. Die in dieser Arbeit neu entwickelte Bestimmungsmethode ist jedoch deutlich einfacher durchzuführen, da sie auf zeitintensiv und teuer herzustellende Antikörper verzichtet und für ein breites Spektrum an Glucanen anwendbar ist.

Bemerkenswert ist der Unterschied (siehe hierzu Abb. 25) bei der Verteilung der Ausbeuten auf die Fraktionen bei den vegetativen Mycelien. Anhand der Ergebnisse ist deutlich zu erkennen, dass der Anteil an triplehelicalen Glucanen an der Gesamt- β -Glucanausbeute bei der NaOH-Fraktion am höchsten ist. Ebenfalls zeigt sich wieder, dass die alkalischen Extraktionschritte deutlich effektiver sind.

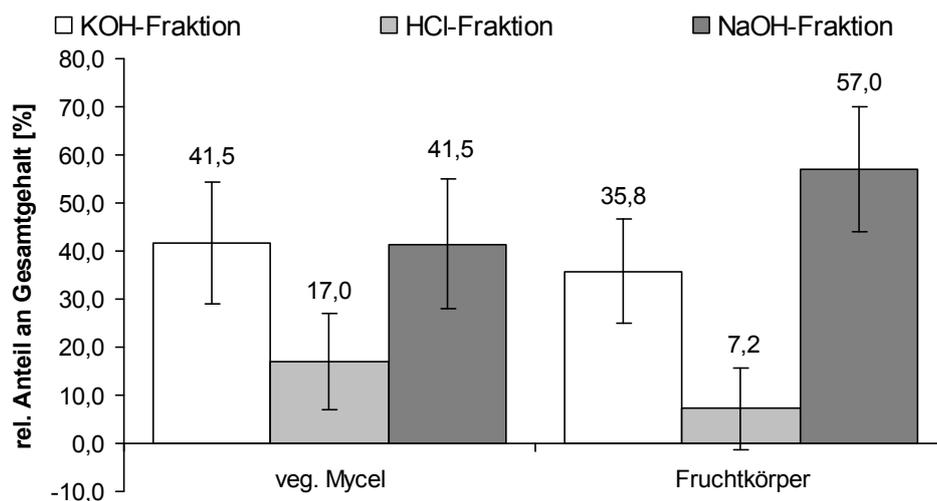


Abb. 25: Relativer Anteil an triplehelicalen Glucanen in den verschiedenen Fraktionen.

Bei den HCl-Fractionen ist der Anteil an triplehelicalen Glucanen an der Gesamtglucanausbeute am geringsten. Dies ist keine überraschende Beobachtung, berücksichtigt man die schlechte Löslichkeit triplehelicaler Glucane im

Sauren. Bei der NaOH-Fraktion scheinen bei den meisten Proben die gesamten Glucane eine Triplehelix als Tertiärstruktur zu besitzen. Diese Glucane mit einer Triplehelix-Tertiärstruktur scheinen stärker in der Zellwand verknüpft zu sein, sodass diese erst nach vorangegangenen Extraktionsschritten isoliert werden können. Dies könnte durchaus problematisch für die enzymatische Extraktion sein, da hier nur schonende Extraktionsschritte angewendet werden. Auffällig ist ebenfalls, dass der Anteil an triplehelicalen Glucanen am Gesamt- β -Glucangehalt bei den Fruchtkörpern höher ist als bei den Mycelien (siehe Abb. 26).

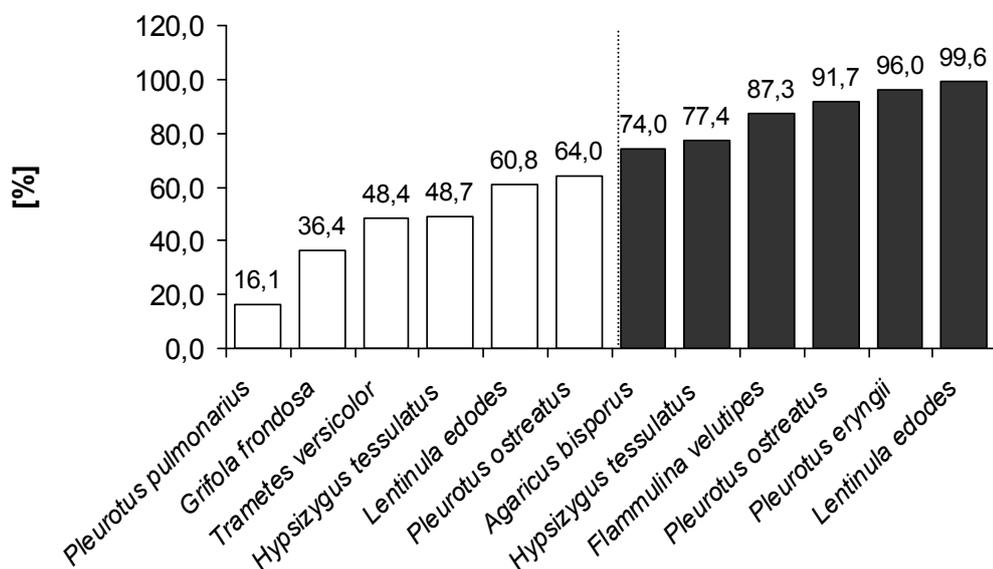


Abb. 26: Relative Anteile triplehelicaler Glucane am Gesamt- β -Glucangehalt.

Die höheren Glucangehalte im Allgemeinen aber auch der höhere Anteil an triplehelicalen Glucanen lässt sich durch die äußeren Einflüsse erklären, denen der Fruchtkörper ausgesetzt ist. Eine höhere Zellwandstabilität ist nötig, um biotischen und abiotischen Einflüssen standzuhalten, anders als bei den Mycelien, bei denen eine flexiblere Zellwand sinnvoll ist. Diese erhöhte Stabilität, so zeigen die Ergebnisse, könnte durch den höheren Gehalt an Glucanen und insbesondere an triplehelicalen Glucanen gewährleistet werden. Dies könnte bedeuten, dass Fruchtkörper für die Extraktion von Glucanen also auch bei einer enzymatischen Extraktion besser geeignet sind. Natürlich ist die einfachere Anzucht der Mycelien bei einer solchen Betrachtung ein nicht zu vernachlässigender Faktor. Obwohl die Ausbeuten bei der Literaturmethode in Fruchtkörpern mehr als doppelt so hoch sind, ist die einfache Anzucht der

Mycelien ein so immenser Vorteil, dass das Mycel das bessere Ausgangsmaterial für die Extraktion darstellt.

Mit der Extraktionsmethode von Sietsma und Wessel (1977) steht eine einfache Extraktionsmethode für Glucane zur Verfügung. Mit ihr können größere Mengen an Glucanen gewonnen werden. In einem technischen Maßstab ist die eingesetzte Energiemenge, die Menge eingesetzter Chemikalien zur Extraktion und zur Neutralisierung der Extrakte nicht unerheblich. Die konzipierte enzymatische Extraktion wäre unter diesen Standpunkten eine interessante Alternative. Wie andere in der Literatur eingesetzte Extraktionsverfahren, beruht diese Methode auf einem Einsatz von Laugen unter höheren Temperaturen. Dies könnte wie bereits diskutiert zu einer partiellen Degradation der Glucane führen. Die Glucane der KOH- und NaOH-Fractionen wurden aufgereinigt und das Glucan anschließend strukturanalytisch untersucht (siehe 4.4 ff.). Es wurden allerdings nur die Glucane aus den Spezies untersucht, bei denen eine enzymatische Extraktion durchgeführt werden konnte (siehe 4.3). Zusammen mit den in diesem Abschnitt vorgestellten Ergebnissen sind die strukturanalytischen Ergebnisse für die durchgeführten Vergleiche essentiell.

Weitere bereits vorgestellte Literaturergebnisse zeigen, dass mit ähnlichen Extraktionsmethoden Ausbeuten in ähnlicher Größenordnung gewonnen werden können. Mit der Literaturmethode steht ein Modell eines herkömmlichen als Standard durchgeführten Extraktionsprinzips zu Verfügung. Durch den Vergleich mit der in dieser Arbeit entwickelten enzymatischen Extraktionsmethode ist es somit möglich, die Ausbeute repräsentativ zu vergleichen. Dadurch können die Möglichkeiten der enzymatischen Extraktion anschaulich beurteilt werden.

4.3 Entwicklung der enzymatischen Extraktionsmethode für β -Glucane

Das Prinzip der enzymatischen Extraktion ermöglicht eine schonende Freisetzung von β -Glucanen. Durch den Erhalt der Primär- und Tertiärstruktur der Glucane könnten die so gewonnenen Produkte ein höheres immunstimulierendes und antikarzinogenes Potential als herkömmlich isolierte Glucane besitzen. Die in der vorliegenden Arbeit entwickelte Methode wurde speziell für die Extraktion von Glucanen aus Mycelien entwickelt. Dies ist bei Literaturmethoden nicht üblich

(siehe 2.1). Die enzymatische Extraktion wurde auch bei einigen Fruchtkörpern getestet, um gegebenenfalls zu zeigen, dass die Methode auch für diese geeignet ist.

Die theoretische Konzeption der in dieser Arbeit vorgestellten enzymatischen Extraktion wurde bereits unter 2.2 aufgeführt. Für eine praktische Umsetzung dieses Konzepts war eine Reihe von Vorversuchen und weiteren Experimenten nötig, um diese Methode wie geplant umzusetzen.

In dem ersten Extraktionsschritt soll das verwendete Zellmaterial mit Chitinase in einem geeigneten Puffer inkubiert werden. Dies soll zu einem partiellen Abbau der Chitinmatrix führen. Glucane sollen durch diesen Schritt bereits partiell extrahiert und für weitere Extraktionsschritte zugänglich gemacht werden. Wie bereits erwähnt (siehe 4.1.2.1) reicht die Inkubation des Zellmaterials nicht aus, um Chitin durch pilzeigene Chitinase abzubauen. Die Hydrolyse des Chitins kann, möglicherweise wegen einer sehr geringen Substratspezifität, nicht durch die pilzeigene Enzymaktivität ausreichend katalysiert werden.

Vorversuche zeigten allerdings, dass die Zugabe von pilzfremder Chitinase zu einem Abbau von Chitin führt. Es wurde hierfür eine Exochitinase aus *Bacillus subtilis* verwendet. Diese besitzt wie die meisten Exochitinasen ein pH-Optimum von pH 6. Dies stimmt mit dem für Pilzchitinase beispielhaft ermittelten pH-Optimum überein (siehe 4.1.2.1). Deshalb wurde der erste Extraktionsschritt bei pH 6 durchgeführt. Dadurch kann möglicherweise ein synergistischer Effekt der pilzfremden und pilzeigenen Enzyme genutzt werden.

Die in Vorversuchen ermittelte optimale Enzymmenge beträgt 0,04 U Chitinase pro 10 mg Chitin. Das Zellmaterial wurde daher so eingewogen, dass 10 mg Chitin als Substrat vorlagen. Eine höhere Enzymkonzentration beschleunigte den Abbau nicht mehr signifikant. Geringere Enzymmengen verlangsamten den ersten Extraktionsschritt erheblich. Eine Erhöhung der Menge an Substrat war nur sehr begrenzt möglich, da sonst die Probensuspension zu viskos wurde und eine ausreichende Durchmischung nicht sichergestellt war.

Die für einen effizienten Abbau von Chitin nötige optimale Inkubationsdauer im ersten Schritt der Extraktion wurde durch entsprechende Vorversuche bestimmt. Hier konnten mit einer Inkubationsdauer von 72 h die besten Ergebnisse erzielt werden. Kürzere Inkubationsdauern reduzierten die Menge an abgebautem Chitin und somit die Effektivität. In Abbildung 27 ist der prozentuale Umsatz an Chitin

der verschiedenen Zellmaterialien (schwarz: Fruchtkörper; weiß: Mycel) nach 72 h Inkubation dargestellt.

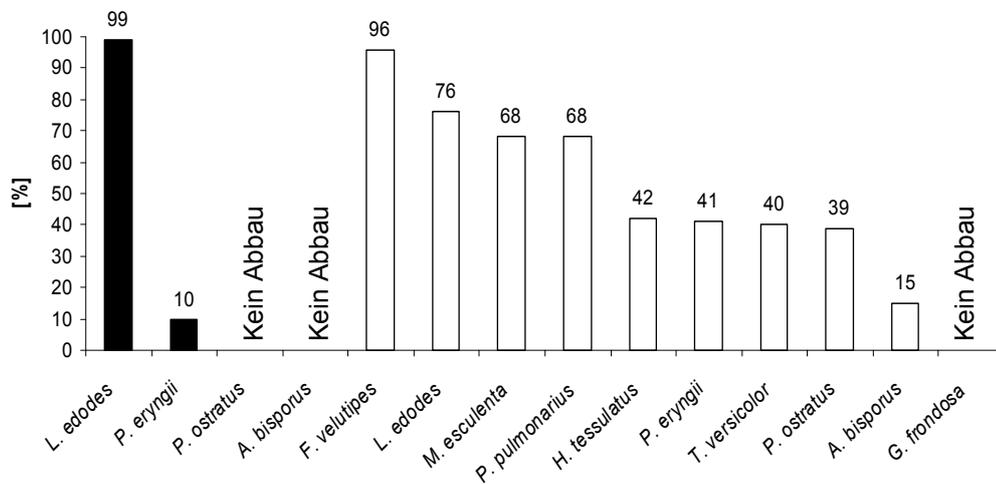


Abb. 27: Prozentual umgesetztes Chitin durch die Inkubation mit 0,04 U Chitinase für 72 h bei 25°C.

Bei dem Fruchtkörper von *Agaricus bisporus* und bei dem Mycel von *Grifola frondosa* wurde kein Chitin abgebaut. Die Methode konnte nicht mit dem Fruchtkörper von *Pleurotus ostreatus* durchgeführt werden. Sie hätte für dieses Zellmaterial modifiziert werden müssen. Die erhaltene Suspension in Schritt 1 war zu viskos und konnte nicht entsprechend aufgearbeitet werden.

Als zweiten Extraktionsschritt sollte das verbliebene Zellmaterial mit alkalischen Reagenzien behandelt werden. Dies sollte schwer wasserlösliche Glucane in Lösung bringen. Vorversuche mit verschiedenen Pufferlösungen (pH 8-11) führten zu keiner Extraktion von weiteren Glucanen. Erst die Verwendung von 1 molarer NaOH führte zu einer Extraktion größerer Mengen Glucane. Die Inkubation mit 1 molarer NaOH wurde auf einem Eisbad für 1 h durchgeführt, um die thermische Belastung so gering wie möglich zu halten.

Im dritten Inkubationsschritt sollten weitere Glucane durch eine partielle Hydrolyse mit β -Glucanase extrahiert, beziehungsweise für die Extraktion zugänglich gemacht werden. Ziel war es, zunächst unlösliche Glucane zu dann löslichen Glucanen abzubauen. Bei der verwendeten Glucanase handelt es sich um eine Exoglucanase aus *Trichoderma* sp. Hier wurde eine geringe Menge an β -Glucanase eingesetzt, um den Abbau besser zeitlich kontrollieren zu können.

Für diesen Extraktionsschritt musste die optimale Inkubationsdauer ermittelt werden. Dies ist ein entscheidender Schritt bei der Entwicklung der Extraktions-

methode. Die Inkubation mit β -Glucanase kann einerseits durch die gewünschte partielle Hydrolyse zu einer besseren Löslichkeit der Glucane führen, andererseits aber die Glucane auch zu stark hydrolysieren und somit eventuell zu einer Zerstörung der besonders wichtigen triplehelicalen Tertiärstruktur führen. In Abbildung 28 a) und b) ist die Menge freigesetzter Glucane in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer am Beispiel des Mycels von *Lentinula edodes* dargestellt. Hierbei wurde bereits die komplett ausgearbeitete Methode verwendet, allerdings die Inkubationsdauer mit Glucanase variiert. Dies soll den Einfluss der Inkubationsdauer auf die Ausbeute an Glucanen verdeutlichen.

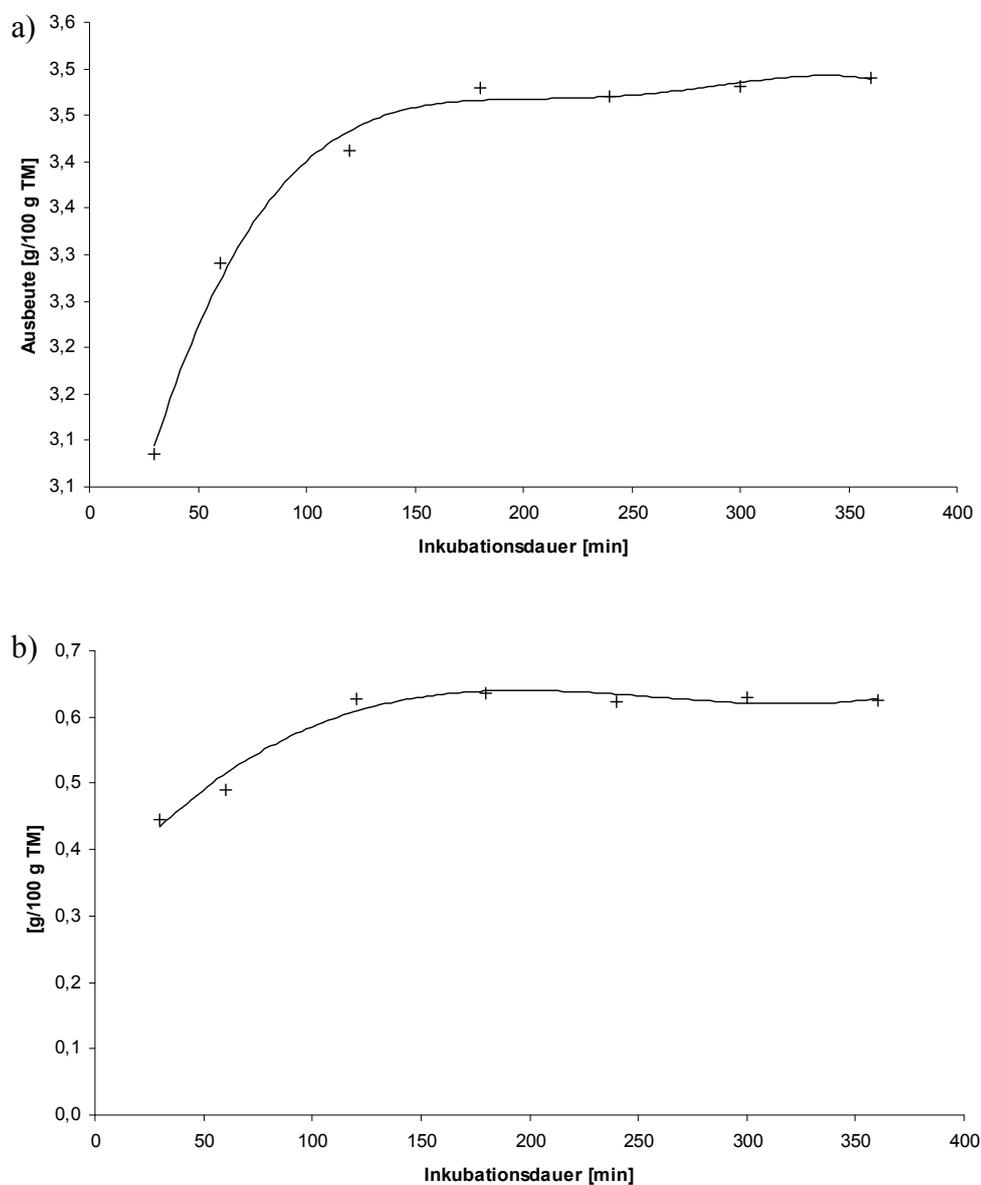


Abb. 28: Bestimmung der optimalen Inkubationsdauer mit β -Glucanase durch Quantifizierung der Ausbeuten an a) Gesamt- β -Glucanen und b) triplehelicalen Glucanen.

Abbildung 28 zeigt, dass drei Stunden die optimale Inkubationsdauer ist. Eine längere Inkubation führt zu keinen höheren Ausbeuten, sondern eher zu einer unerwünschten Reduzierung der Kettenlänge.

Anschließend an diesen Extraktionsschritt beinhaltet die Methode einen weiteren auf 1 molarer NaOH basierenden Schritt. Hiermit sollen weitere schwerlösliche Glucane in Lösung gebracht werden. Abbildung 29 zeigt eine schematische Übersicht der in dieser Arbeit entwickelten Extraktionsmethode.

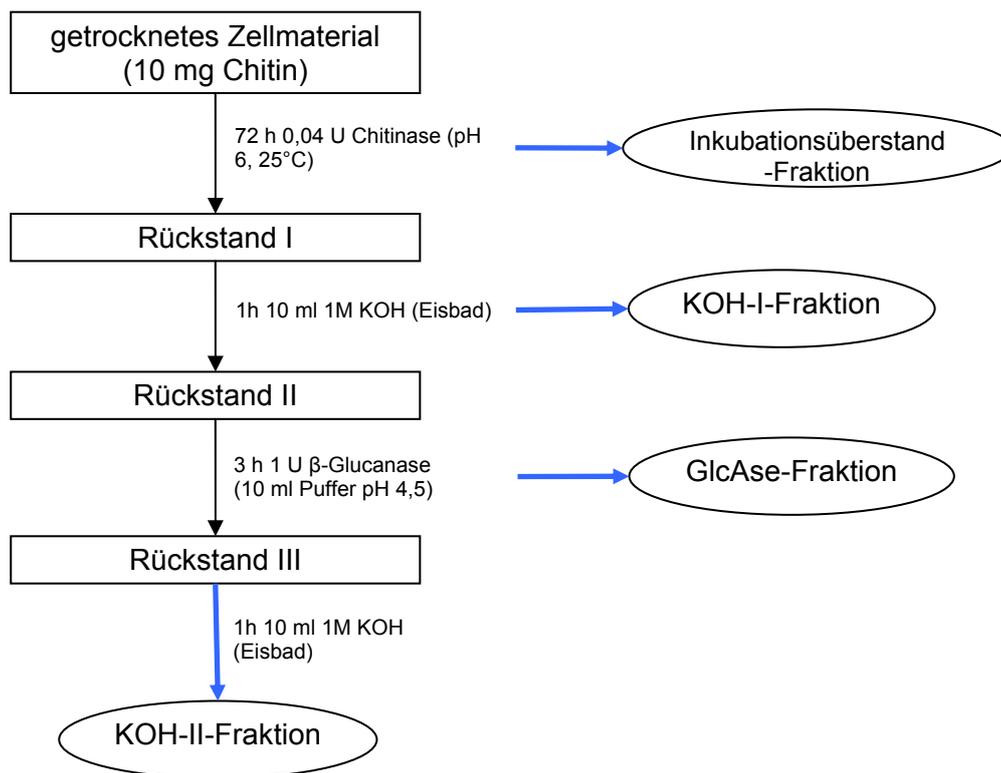


Abb. 29: Darstellung der enzymatischen Extraktionsmethode.

Es wurden weitere Versuche durchgeführt, um die Ausbeuten der Extraktion zu erhöhen. So wurden die Proben vor Beginn der enzymatischen Extraktion mit Protease behandelt. Dies sollte die ebenfalls in der Zellwand vorhandenen Proteine abbauen und die Extraktion somit unterstützen. Die Proben wurden auch mit diversen anderen Reagenzien wie 0,1 molarer HCl oder Harnstoff vorbehandelt. Alle Verfahren sollten Verknüpfungen lösen und somit das Zellmaterial für die enzymatische Extraktion besser zugänglich machen. Keiner dieser Versuche zeigte einen positiven Effekt auf die Extraktion und wurde daher nicht weiter berücksichtigt.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass mit dieser Methode erstmals eine enzymatische Extraktionsmethode für β -Glucane aus Pilzen zur Verfügung steht, welche für die in dieser Arbeit verwendeten Zellmaterialien, sofern für die enzymatische Extraktion zugänglich, genutzt werden kann. Das entwickelte Prinzip ist neuartig. Durch den Abbau des mit den Glucanen eng verknüpften Chitins können die Glucane mit schonenden Extraktionsbedingungen isoliert werden. Die Glucane könnten sich daher strukturell erheblich von denen unterscheiden, die durch die Literaturmethode isoliert werden. Die entsprechende strukturanalytische Charakterisierung ist in Abschnitt 4.4 ff. beschrieben.

Im Folgenden werden die quantitativen Ergebnisse, d.h. die jeweiligen erhaltenen Ausbeuten, vorgestellt. In Tabelle 20 sind die Ausbeuten an Gesamt- β -Glucanen aufgeführt.

Tab. 20: Ausbeuten an Gesamt- β -Glucanen der verschiedenen Spezies.

Pilz	Ausbeute [g/100 g TM]	Δ B [g/100 g TM]
<i>A. bisporus</i> (Zellkultur)	1,4 \pm 0,03	0,5
<i>H. Tessulatus</i> (Zellkultur)	2,4 \pm 0,02	0,3
<i>L. edodes</i> (Zellkultur)	3,5 \pm 0,04	0,3
<i>P. pulmonarius</i> (Zellkultur)	3,1 \pm 0,11	0,7
<i>T. versicolor</i> (Zellkultur)	3,0 \pm 0,0	0,4
<i>L. edodes</i> (Fruchtkörper)	2,0 \pm 0,10	0,1
<i>M. esculenta</i> (Zellkultur)	1,7 \pm 0,03	0,2
<i>P. eryngii</i> (Fruchtkörper)	0,5 \pm 0,04	0
<i>P. eryngii</i> (Zellkultur)	3,3 \pm 0,10	0,1
<i>P. ostreatus</i> (Zellkultur)	2,0 \pm 0,01	0,2

Es wurden wie in 3.2.7 beschrieben ebenfalls Blindversuche durchgeführt. Bei diesen Blindversuchen wird die Probe exakt wie beschrieben behandelt, statt Enzym allerdings die entsprechende Menge Puffer eingesetzt.

Wie die Ergebnisse zeigen werden bereits durch die Behandlung mit Pufferlösungen und 1 molarer NaOH, das heißt ohne Zugabe von Enzym im Blindversuch, nicht zu vernachlässigende Mengen Glucan extrahiert. Durch die Zugabe von Enzym kann bei den in der Tabelle markierten Zellmaterialien allerdings eine Steigerung der Ausbeute von 9-36% beobachtet werden. In den Tabellen ist deshalb ebenfalls neben der absoluten Ausbeute die Differenz zur

Ausbeute bei den Blindversuchen (ΔB) dargestellt. Bei den anderen Zellmaterialien kann durch die Zugabe an Enzym keine signifikante Erhöhung der Ausbeute im Vergleich zum jeweiligen Blindversuch festgestellt werden. Als Qualitätsgrenze wurde hier eine Differenz von 200 mg/100 g TM gewählt. Diese Extraktionsmethode scheint somit nur bei bestimmten Zellmaterialien effektiv Glucane zu extrahieren. Es kann festgestellt werden, dass die Extraktion der Glucane nach diesem Prinzip nur aus Mycelien möglich ist. Sollen β -Glucane aus Fruchtkörpern isoliert werden, muss auf herkömmliche Literaturmethoden zurückgegriffen werden. Das vegetative Mycel stellt allerdings aufgrund seiner einfachen Kultivierung das zu bevorzugende Zellmaterial dar.

Vergleicht man die Ausbeuten der Gesamt- β -Glucanen dieser Methode mit den in 4.2 vorgestellten Ausbeuten der Literaturmethode, so ist deutlich, dass mit der Literaturmethode bei fast allen Zellmaterialien höhere Ausbeuten erzielt werden können. Dies entspricht aufgrund den in der Literaturmethode angewandten drastischen Extraktionsbedingungen den Erwartungen. Durch diese Extraktionsbedingungen kann scheinbar das „Cross-Linking“ der Glucane besser gelöst werden. Allerdings ist die enzymatische Extraktionsmethode deutlich schonender. Der Vorteil des Strukturerhalts überwiegt die geringeren Ausbeuten an Glucanen. Die erhaltenen Ausbeuten bei der enzymatischen Extraktion sind allerdings auch nicht so gering, dass man diese im Vergleich als vernachlässigbar bezeichnen kann. Abbildung 30 vergleicht die Gesamt- β -Glucan ausbeuten der Methoden.

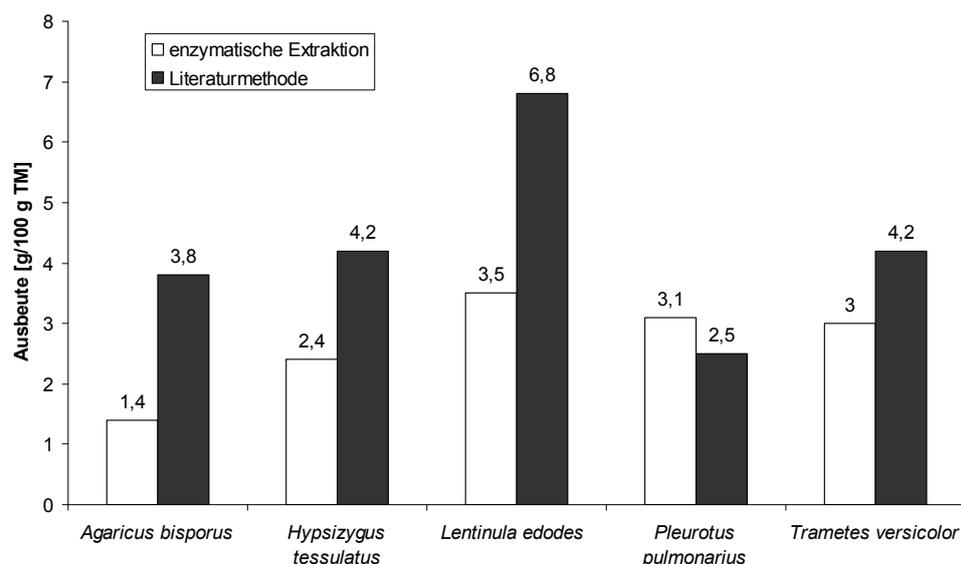


Abb. 30: Vergleich der Gesamt- β -Glucan Ausbeuten der verschiedenen Spezies.

Nur bei dem Mycel von *Pleurotus pulmonarius* konnte mit der enzymatischen Extraktionsmethode eine höhere Ausbeute erzielt werden. Der genaue Grund, warum die enzymatische Extraktion bei dieser Spezies effektiver ist, lässt sich nicht genau erklären. Möglicherweise kann durch den enzymatischen Abbau von Chitin bei *Pleurotus pulmonarius* das „Cross-Linking“ mit Glucanen besser als bei einer alkalischen Behandlung gelöst werden.

Die Ausbeute bei *Trametes versicolor* ist im Vergleich hierzu bei der Literaturmethode mehr als doppelt so hoch. Es lassen sich somit zusätzlich scheinbar eng in die Zellwandmatrix verknüpfte Glucane durch den Einsatz von Säuren und Laugen unter Temperatureinfluss isolieren. Bei *Lentinula edodes* und *Hypsizyugus tessulatus* ist die enzymatische Extraktion deutlich effektiver als bei *Trametes versicolor*. Aus dem Mycel von *Agaricus bisporus* konnten nur geringe Mengen Glucan extrahiert werden. Bei diesem Pilz ist die Ausbeute bei der Literaturmethode allerdings ebenfalls gering.

Interessant ist die Verteilung der Ausbeuten auf die einzelnen Fraktionen. (siehe Abb. 31).

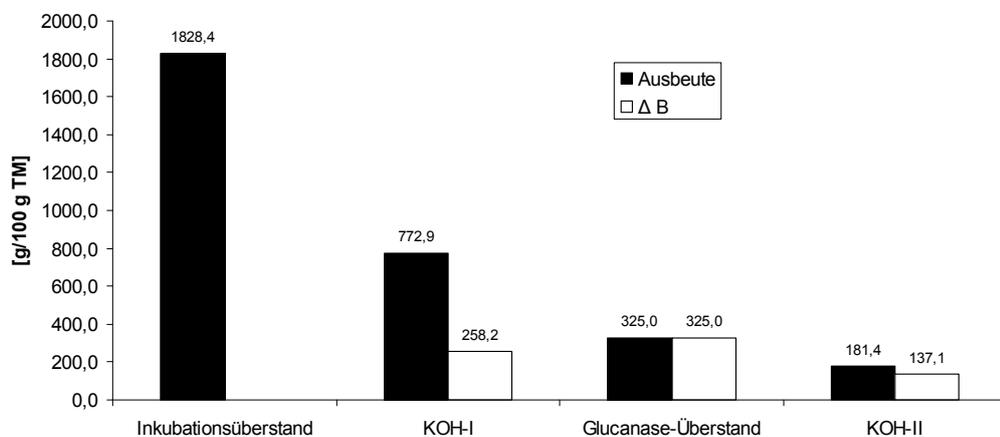


Abb. 31: Verteilung der Ausbeuten an Gesamt- β -Glucanen auf die einzelnen Fraktionen der Extraktion am Beispiel des Mycels von *Pleurotus pulmonarius*.

Mit der ersten Fraktion können im Vergleich zum Blindwert nur geringfügig höhere Mengen Glucan extrahiert werden. Dies wurde bereits in Vorversuchen gezeigt. Die Inkubation mit Chitinase hat aber direkten Einfluss auf die nächste Fraktion, die KOH-I-Fraktion. Durch die Inkubation mit Chitinase sind die Glucane leichter für eine weitere Extraktion zugänglich. Dies führt bei allen

Pilzen, bei denen die enzymatische Extraktion möglich ist, zu einer Steigerung der Ausbeute im Vergleich zum Blindwert.

Mit den nachfolgenden Extraktionsschritten können nur durch die Zugabe von Enzym Glucane isoliert werden. In den Blindversuchen konnte hier jeweils keine bzw. nur geringe Mengen Glucan gewonnen werden. Obwohl die Ausbeuten in diesen Extraktionsschritten nicht mehr so groß sind, kann durch die Inkubation mit Glucanase die Effizienz der Extraktion nochmals gesteigert werden.

Bei den verwendeten Zellmaterialien konnten Ausbeuten erzielt werden, die mit denen der Literaturmethode durchaus vergleichbar sind. Auch wenn die Ausbeuten meist geringer sind, ist der gesamte enzymatische Extraktionsprozess deutlich schonender. Es ist daher ebenfalls interessant, inwieweit sich die Glucane strukturanalytisch unterscheiden.

Die Bestimmung der Ausbeuten an triplehelicalen Glucanen ermöglicht hier eine Beurteilung der vorherrschenden Tertiärstruktur. Im Folgenden sind die Ausbeuten an triplehelicalen Glucanen dargestellt. Es konnte beobachtet werden, dass durch den Zusatz an Enzymen die Ausbeuten an triplehelicalen β -Glucanen im Vergleich zum Blindversuch deutlich gesteigert werden kann (siehe Tab. 21). Dies bestätigt neben den gesteigerten Gesamt- β -Glucan ausbeuten die Effizienz des Extraktionsverfahrens.

Tab. 21: Ausbeuten an triplehelicalen Glucanen der verschiedenen Spezies.

Pilz	Ausbeute [g/100 g TM]	Δ B [g/100 g TM]
<i>A. bisporus</i> (Zellkultur)	0,6	0,5
<i>H. Tessulatus</i> (Zellkultur)	0,3	0,1
<i>L. edodes</i> (Zellkultur)	0,7	0,7
<i>P. pulmonarius</i> (Zellkultur)	0,6	0,4
<i>T. versicolor</i> (Zellkultur)	1,2	0,8
<i>L. edodes</i> (Fruchtkörper)	0,6	0
<i>M. esculenta</i> (Zellkultur)	0,1	0,1
<i>P. eryngii</i> (Fruchtkörper)	0,1	0
<i>P. eryngii</i> (Zellkultur)	1,0	0,1
<i>P. ostreatus</i> (Zellkultur)	0,3	0

Die Ausbeuten an triplehelicalen β -Glucanen sind nicht so hoch wie in der Literaturmethode. Interessant ist allerdings, dass durch den Einsatz der Enzyme

die Ausbeute dieser wichtigen Glucane deutlich im Vergleich zum Blindwert gesteigert werden kann. Als Beispiel sei das Zellmaterial von *Lentinula edodes* aufgeführt, bei dem kein triplehelicales Glucan im Blindversuch extrahiert werden konnte.

Interessant ist, dass bei manchen Zellmaterialien die Differenz zum Blindversuch an triplehelicalen Glucanen höher ist als die Differenz bei den Gesamt- β -Glucanen. Die Inkubation mit Glucanase und die damit verbundene partielle Hydrolyse führen offenbar teilweise zu einer Umlagerung der Tertiärstruktur in die Triplehelix. Eine Abhängigkeit zwischen Tertiärstruktur und durch diese Hydrolyse beeinflusste Faktoren wie intramolekulare Verknüpfungen und Molekularmasse ist bereits in einigen Arbeiten beschrieben (Wasser 2002 und 2010, Zhang et al. 2005). Da diese von der Extraktionsmethode abhängig sind, ist eine schonende Extraktion sinnvoll. Mit der enzymatischen Extraktionsmethode steht ein solches schonendes Verfahren zu Verfügung.

Die durch die Inkubation mit Glucanase induzierte Bildung der Triplehelix wird besonders deutlich, wenn man die Verteilung der Ausbeuten auf die einzelnen Fraktionen betrachtet. Beispielhaft ist dies in Abbildung 32 dargestellt. Die Inkubation mit Glucanase könnte zum Beispiel durch die Reduzierung der Molekularmasse bzw. Kettenlänge die Bildung einer Triplehelix durchaus induzieren.

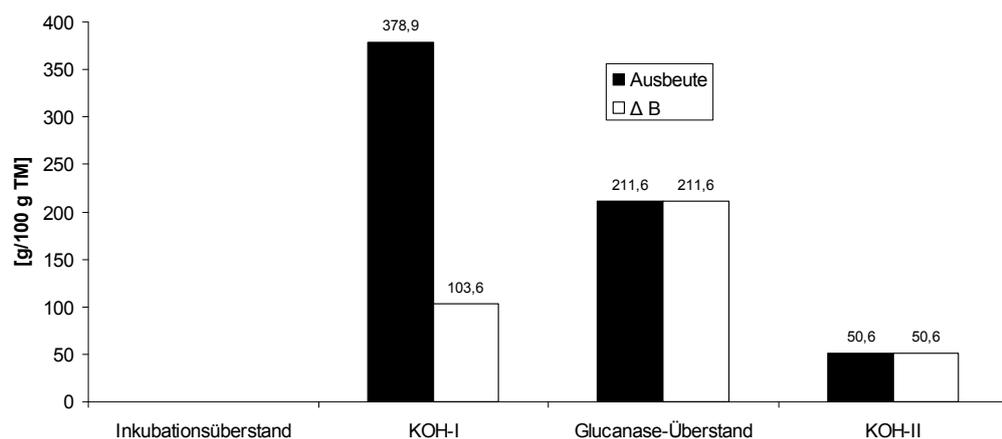


Abb. 32: Verteilung der Ausbeuten an triplehelicalen β -Glucanen auf die einzelnen Fraktionen der Extraktion am Beispiel des Mycels von *Pleurotus pulmonarius*.

Im ersten Inkubationsschritt können keine triplehelicalen Glucane isoliert werden. Dies kann bei allen Zellmaterialien beobachtet werden. Die Ausbeuten sind in der KOH-I-Fraktion am größten (siehe Abb. 32). Hier konnten sowohl aus den

Proben als auch bei den jeweiligen Blindversuchen triplehelicale Glucane isoliert werden. Allerdings werden durch die Verwendung von Chitinase im ersten Schritt mehr Glucane als im Blindversuch extrahiert. In der KOH-II-Fraktion werden durch die Inkubation mit Glucanase ebenfalls triplehelicale Glucane isoliert. Dies ist in den jeweiligen Blindversuchen nicht der Fall und scheint zu verdeutlichen, dass durch die partielle Hydrolyse und die daraus resultierende Verkürzung der Kettenlänge, die Bildung der Triplehelix als Tertiärstruktur begünstigt wird. Bei dem Vergleich mit der Literaturmethode ist nicht die absolute Ausbeute an triplehelicalen Glucanen interessant, sondern der Anteil dieser Glucane an der Gesamt- β -Glucan ausbeute (siehe Abb. 33).

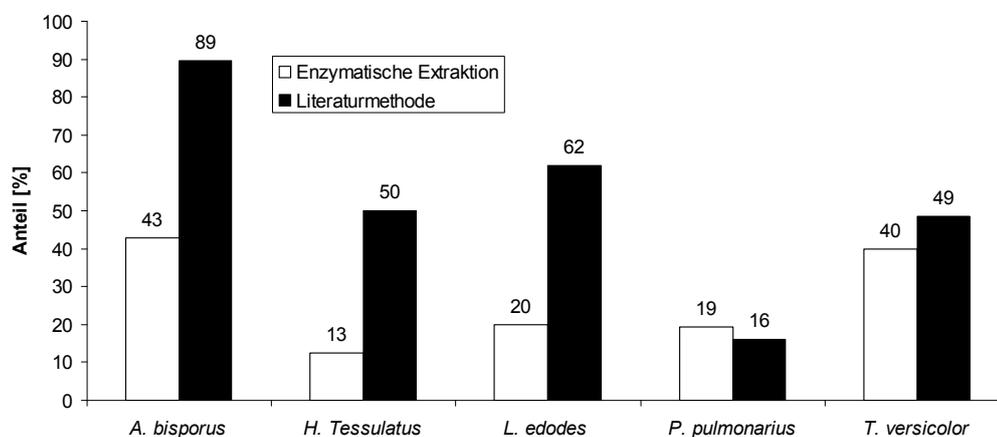


Abb. 33: Anteile an triplehelicalen Glucanen an der Gesamt- β -Glucan ausbeute der verschiedenen Spezies.

Mit der enzymatischen Extraktionsmethode können nur bei zwei Spezies vergleichbare Ergebnisse wie bei der Literaturmethode erzielt werden. Bei *Pleurotus pulmonarius* konnte sogar ein etwas höherer Anteil an triplehelicalen Glucanen gewonnen werden. Aus *Trametes versicolor* konnten Glucane mit einem vergleichbaren Anteil an triplehelicalen Glucanen extrahiert werden. Bei *Agaricus bisporus*, *Hypsizygyus tessulatus*, *Lentinula edodes* wurden deutlich geringere Anteile an triplehelicalen Glucanen bestimmt.

Interessant ist die Frage, ob es sich bei diesen Glucanen auch um strukturell ähnliche Glucane hinsichtlich ihrer Verknüpfungen und Molekularmassen handelt.

Die weiteren im Verlauf der Arbeit gewonnenen strukturanalytischen Ergebnisse zeigen, dass bei der KOH- und NaOH-Fraktion unterschiedliche Glucane

gewonnen wurden (siehe 4.4 ff.). Nur die Glucane der KOH-Fraktion ähneln den enzymatisch extrahierten Glucanen hinsichtlich ihrer Primärstruktur. Es konnte besonders beobachtet werden, dass bei den Glucanen der KOH-Fraktion und der enzymatischen Extraktion ähnliche glykosidische Bindungen und eine ähnliche Monosaccharidzusammensetzung zu finden sind.

Deshalb ist ein separater Vergleich der Anteile an triplehelicalen Glucanen zwischen den einzelnen Fraktionen der Literaturmethode und der enzymatischen Methode sinnvoll. Dieser Vergleich ist in Abschnitt 5 auch unter Berücksichtigung der Strukturaufklärung beschrieben.

Wie die Ergebnisse zeigen, ist eine Extraktion von β -Glucanen auch mit einer triplehelicalen Tertiärstruktur auf enzymatischer Basis möglich. Allerdings ist die Methode nur bei ausgewählten Zellmaterialien erfolgreich durchführbar. Mit der enzymatischen Extraktionsmethode können Gesamt- β -Glucanausbeuten von 1,4 bis 3,5 g pro 100 g Trockenmasse extrahiert werden. Damit werden die Ergebnisse, die bei einer alkalischen Extraktion (Literaturmethode) erreicht werden, nicht ganz erzielt. Allerdings wird auf eine thermische Beanspruchung weitestgehend verzichtet, was die Methode auch energetisch effektiver gestaltet. In keinem der Extraktionsschritte ist das Erhitzen der Probe anders als bei der Literaturmethode nötig. Dadurch können Glucane schonend unter milden Bedingungen extrahiert werden, was wiederum den Erhalt der Struktur gewährleistet.

4.4 Strukturanalytische Charakterisierung der extrahierten Glucane

Die strukturanalytische Charakterisierung der durch die Extraktionsmethoden erhaltenen Glucane (siehe 4.2 und 4.3) ermöglicht einen genauen Vergleich der gewonnenen Produkte. Aufgrund des engen Zusammenhangs zwischen Struktur und Wirkung sind Kenntnisse über die Struktur besonders wichtig. Des Weiteren werden durch die durchgeführte Strukturanalytik erstmals sowohl enzymatisch als auch herkömmlich extrahierte Glucane aus Mycelien ausführlich charakterisiert. Über Glucane aus Mycelien ist wenig bekannt. Somit ist es interessant, diese zusätzlich mit Glucanen aus Fruchtkörpern zu vergleichen. Hierzu wurden die mit

der Literaturmethode gewonnenen Glucane aus Fruchtkörpern von zwei ausgewählten Arten analysiert.

In den folgenden Abschnitten sind die Ergebnisse der strukturanalytischen Methoden dargestellt. Es wurden die Glucane analysiert, welche mit Hilfe der enzymatischen Extraktion gewonnen werden konnten. Verglichen wurden diese mit den Glucanen, die durch die Literaturmethode isoliert wurden. Hierbei wurden allerdings nur die Glucane aus den Spezies untersucht, bei denen auch die enzymatische Extraktion möglich ist (siehe 4.3). Die anderen Proben, die durch die Literaturmethode gewonnen werden konnten, wurden nicht in den Vergleich mit einbezogen.

Es wurden die Glucane der KOH-Fraktion und NaOH-Fraktion getrennt analysiert. Dies ermöglicht, die durch die Extraktion induzierte Degradation der Glucane abzuschätzen. Somit können weitere Vergleiche mit den aus Mycelien gewonnenen Glucanen durchgeführt werden.

4.4.1 Aufreinigung der Glucanextrakte

Für die Strukturanalytik ist eine Aufreinigung der Glucanextrakte zwingend notwendig, da Verunreinigungen der Probenextrakte spätere Bestimmungen stören.

Die Aufreinigung der durch die Extraktionen gewonnenen Glucane erfolgte wie in 3.2.8.1 beschrieben. Durch die verwendeten Centriprep YM-10 Konzentratortubes (MWCO 10 kDa) werden niedermolekulare Verunreinigungen entfernt. Die weitere Aufreinigung erfolgte mittels Gelpermeationschromatographie (siehe ebenfalls 3.2.8.1). Auf diese Weise werden weitere niedermolekulare Verbindungen von den Glucanen abgetrennt. Gleichgroße Substanzen wie zum Beispiel Proteine können allerdings nicht entfernt werden. Diese sind trotz der vorangegangenen Inkubation mit Protease noch im erheblichen Maße vorhanden. So liegen die bestimmten Proteinmengen in den Eluaten der durchgeführten GPC zwischen 30-50% der jeweiligen Glucanmenge. Die vorhandenen Proteine können die nachfolgenden strukturanalytischen Bestimmungen empfindlich stören. Deshalb wurden diese mit einer Kombination aus Anionen- und Kationenaustauschchromatographie abgetrennt (siehe 3.2.8.1). Das Protokoll einer Aufreinigung mit der Ionenaustauschchromatographie ist in Abbildung 34 dargestellt.

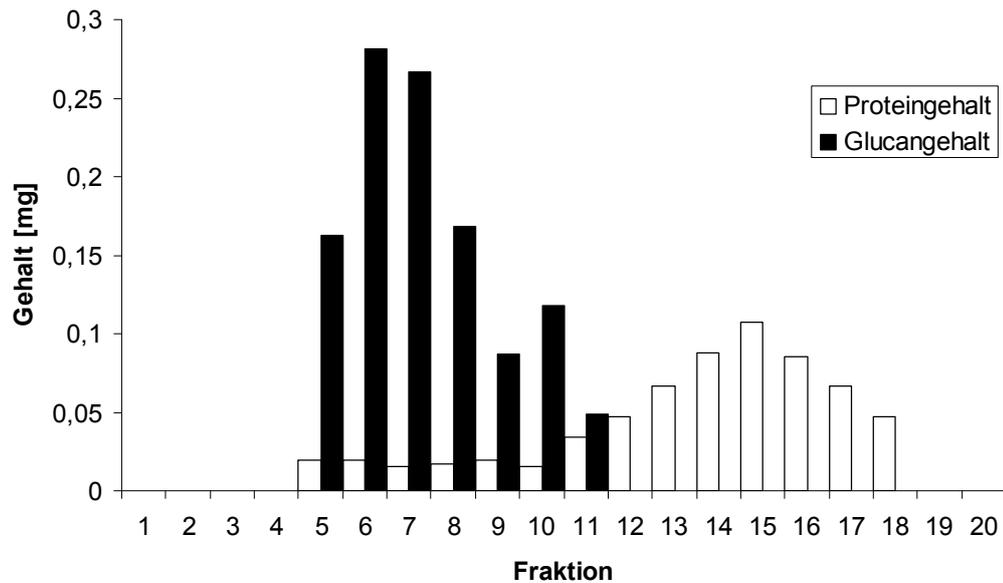


Abb. 34: Protokoll der Aufreinigung mittels Ionenaustauschchromatographie (Extrakt: KOH-Fraktion des Fruchtkörpers von *Pleurotus ostreatus*).

Durch diesen Aufreinigungsschritt kann der Proteingehalt auf 2-15% reduziert werden. Hierbei handelt es sich mit großer Wahrscheinlichkeit um Proteine, die in die Glucanstruktur eingebunden sind und deshalb nicht abgetrennt werden können. Es ist auffällig, dass bei den enzymatisch extrahierten Glucanen der Proteingehalt der aufgereinigten Glucane mit 10-15% etwas höher ist, als bei den Glucanen, die mit der Literaturmethode gewonnen wurden (2-3% NaOH-Fraktion, 5-12% KOH-Fraktion). Dies bedeutet, dass Proteoglycane durch die enzymatische Extraktion besser erhalten bleiben. Dies könnte wie schon in Abschnitt 2.1 beschrieben positiven Einfluss auf die Wirkung der Glucane haben. Das so aufgereinigte Glucan wurde anschließend für die strukturanalytischen Bestimmungen getrocknet und entsprechend weiter aufgearbeitet (siehe 3.2.8 ff.).

4.4.2 Kernresonanzspektroskopische Charakterisierung der Polysaccharidstrukturen

Mit Hilfe der Kernresonanzspektroskopie können die Bindungen innerhalb des Glucans charakterisiert werden. Die durch die NMR-Spektroskopie ermittelten Daten tragen zum Vergleich der extrahierten Glucane bei. Über glykosidische Bindung verknüpfte Seitenketten können durch drastische Extraktionsbedingungen wie bei der Literaturmethode hydrolysiert werden. Dies würde die

Wirkung negativ beeinflussen. Durch die enzymatische Extraktion könnten diese erhalten bleiben. Die NMR-Spektroskopie ist eine aussagekräftige Methode die glykosidischen Bindungen zu bestimmen und wurde deswegen verwendet.

Durch die spezifischen Verschiebungen der Signale in den ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren lassen sich die glykosidische Bindungen des Glucans identifizieren. Von besonderem Interesse sind die Signale des Kohlenstoffs beziehungsweise Wasserstoffatoms am anomeren Zentrum, da hier durch die Verschiebung im Spektrum die Konfiguration der glykosidischen Bindungen ermittelt werden kann. Die substituierten C- bzw. H-Atome innerhalb des Glykosides geben ebenfalls Aufschluss über die auftretenden intramolekularen Bindungen. Durch die Abschirmung aufgrund der Substitution sind die Signale dieser Atome weiter zu tieferen Feld verschoben als die jeweiligen unsubstituierten Atome. Somit sind mit Hilfe der ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektroskopie spezifische Aussagen über die Stereochemie der analysierten Glucane möglich. Diese beeinflusst wie erwähnt direkt die Wirkung der Glucane.

4.4.2.1 Charakterisierung der durch die Literaturmethode isolierten Glucane

Im Folgenden sind die Ergebnisse der NMR-Analysen der durch die Literaturmethode gewonnenen Glucane beschrieben. Die genaue Charakterisierung der auftretenden Verknüpfungen ist erst durch die vergleichende Auswertung der verschiedenen Experimente möglich. Mit Hilfe der ^1H -NMR-Spektren konnte bei allen Proben eine β -Konfiguration am C1-Atom identifiziert werden. Das charakteristische Signal des anomeren H1-Atoms liegt bei $\sim\delta$ 4,5-4,6 ppm. Die für eine β -Konfiguration üblichen 3J (H1/H2)-Kopplungskonstanten von ca. 7,6 Hz bestätigen bei den jeweiligen Proben die β -Konfiguration.

Die Signale der substituierten H-Atome geben weiteren Aufschluss über die Art der Bindung. Es konnte bei den meisten Proben eine Substitution am C3-Atom beobachtet werden. Das charakteristische Signal des H3-Atoms liegt in diesem Fall bei $\sim\delta$ 4,1 ppm. Zusätzlich konnte eine Substitution am C6-Atom durch das charakteristische Signal der entsprechenden H6-Atome bei δ 4,2-4,3 ppm (H6a) bzw. bei δ 3,7-3,9 ppm (H6b) beobachtet werden. Die Lage der Signale wird durch Literaturangaben bestätigt (Zhang et al. 1999, Kim et al. 2000, Ruot et al. 2004). In Abbildung 35 ist beispielhaft ein ^1H -NMR-Spektrum dargestellt.

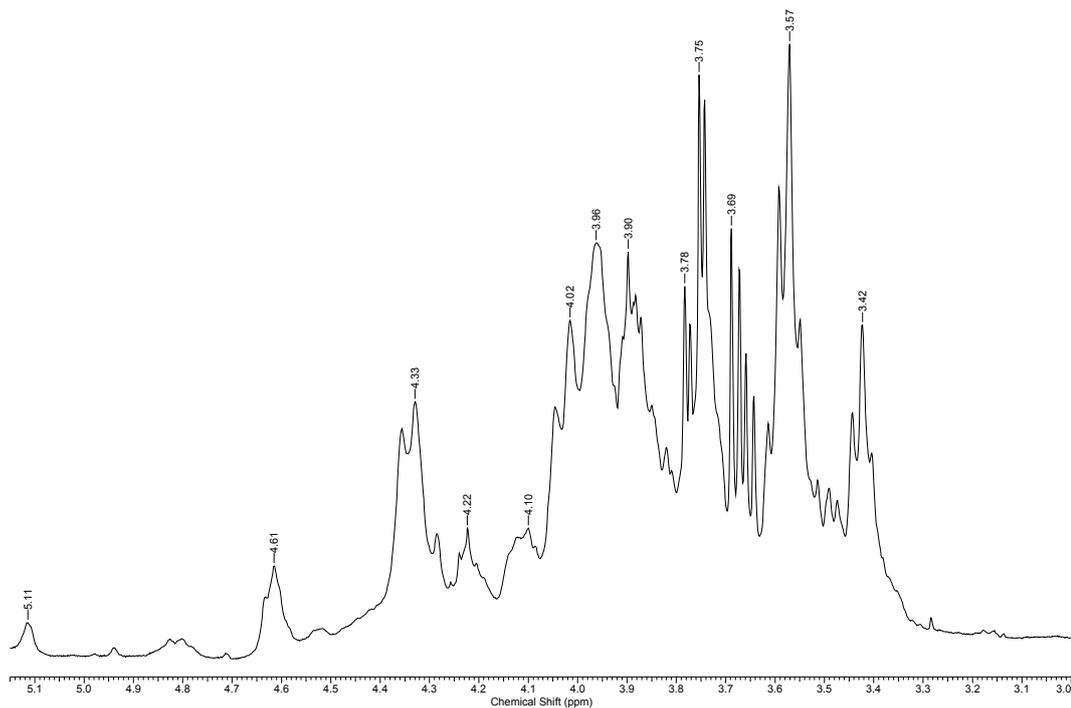


Abb. 35: ^1H -NMR-Spektrum (mit Unterdrückung des H_2O -Signals) des Glucans aus der NaOH-Fraktion des Fruchtkörpers von *Lentimula edodes* in D_2O .

Wie Abbildung 34 zeigt, ist ein weiteres H_1 -Signale bei $> \delta$ 5 ppm zu erkennen. Diese Verschiebung ist für H_1 -Atome in α -Konfiguration typisch (Mizuno et al. 1990, Ma et al. 1991, Pramanik et al. 2007, Roy et al. 2009). Eine α -Konfiguration konnte in weiteren Proben ebenfalls beobachtet werden (siehe Tab. 21).

Die Zuordnung der Signale erfolgte über zweidimensional korrelierte Spektroskopie, DEPT-Experimente und den Vergleich mit Referenzspektren von Standardglucanen und Literaturdaten (Mizuno et al. 1990, Ma et al. 1991, Zhang et al. 1999, Kim et al. 2000, Ruot et al. 2004, Pramanik et al. 2007, Roy et al. 2009). Als Beispiel eines zweidimensionalen NMR-Experimentes, wie es zur Signalzuordnung genutzt wurde, ist in Abbildung 36 ein ^3J -H,H-COSY-Spektrum dargestellt.

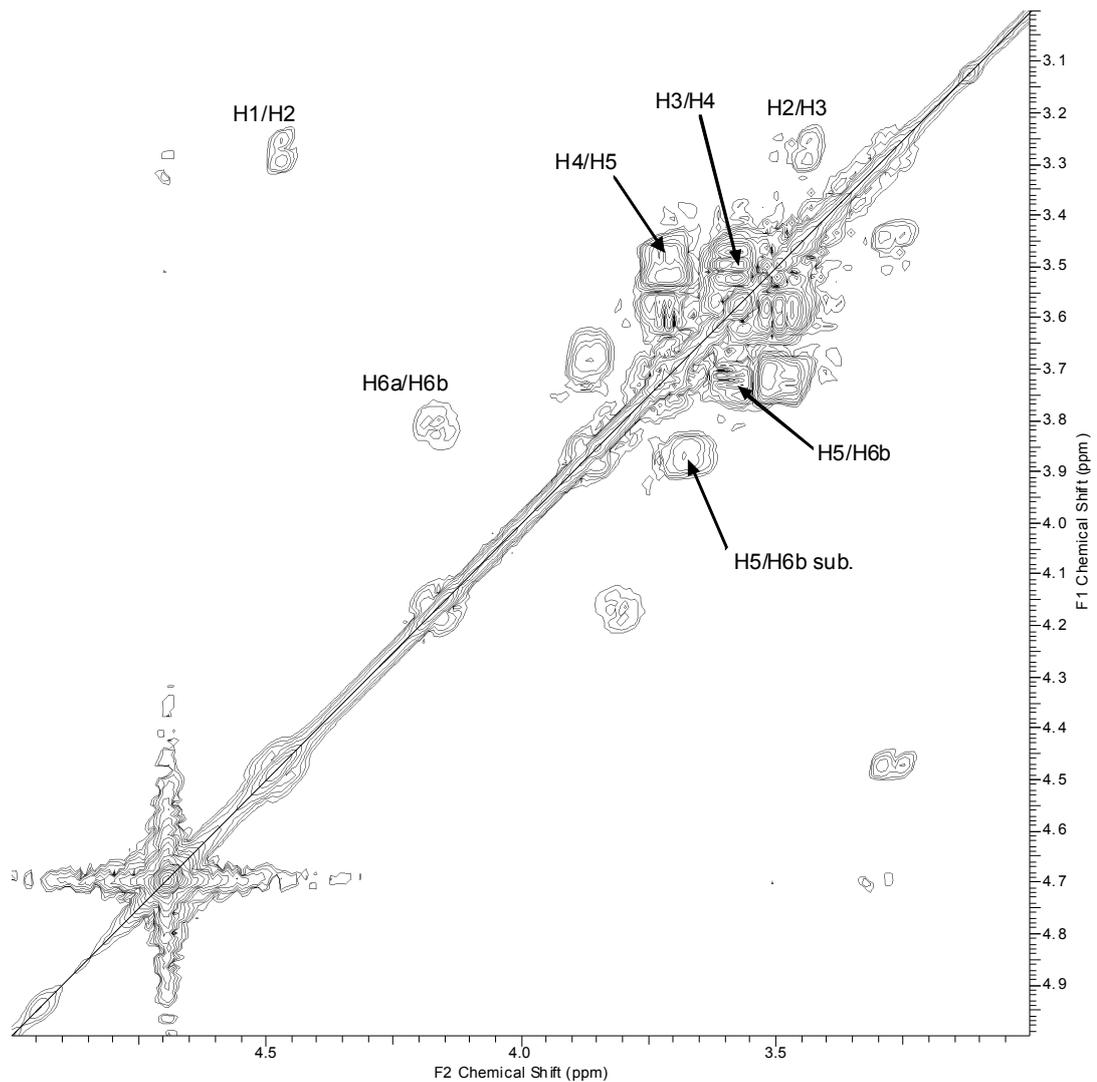


Abb. 36: $^3\text{J-H,H-COSY}$ -Spektrum des Glucans aus der NaOH-Fraktion des Mycels von *Lentinula edodes* in D_2O .

Abbildung 36 zeigt das COSY-Spektrum eines β -1,3-1,6-Glucans. Die jeweilige Zuordnung der Signale ist entsprechend dargestellt. Über die in den COSY-Spektren zu erkennenden $^3\text{J-H,H}$ -Kopplungen und durch weitere NMR-Experimente wie TOCSY, HSQC und HMBC kann die Zuordnung der H-Atome zu den jeweiligen Signalen erfolgen. In Tabelle 22 sind auf den folgenden Seiten die Zuordnungen der Signale für sämtliche Proben dargestellt.

Tab. 22: Charakterisierung der glykosidischen Bindungen und Zuordnung der Signale der ¹H-NMR-Spektren der Glucane.

a) Mycelien

	δ H1[ppm]	δ H2[ppm]	δ H3[ppm]	δ H4[ppm]	δ H5[ppm]	δ H6a/H6b* ^a [ppm]
<i>Lentinula edodes</i> (KOH-Fraktion)						
(α 1→4)	5,15	3,77	3,88	3,85	3,61	3,87/3,76
(β 1→3)	4,44	3,33; 3,25	4,15	3,51	3,61	3,87/3,76
(β 1→6)	4,44	3,33; 3,25	3,47	3,51	3,61	4,22/4,04
<i>Lentinula edodes</i> (NaOH-Fraktion)						
(β 1→3)	4,48	3,28	4,11	3,51	3,58	3,87/3,82
(β 1→6)	4,48	3,28	3,50	3,51	3,58	4,17/4,06
<i>Pleurotus pulmonarius</i> (KOH-Fraktion)						
(α 1→3)	5,12	3,78	4,09	3,54	3,66	3,86/3,78
(α 1→4)	5,20	3,78	3,89	3,83	3,66	3,86/3,78
(β 1→3)	4,48	3,35; 3,28	4,16	3,56	3,66	3,86/3,78
(β 1→6)	4,44	3,35; 3,28	3,48	3,56	3,66	4,30/4,01
<i>Pleurotus pulmonarius</i> (NaOH-Fraktion)						
(α 1→4)	5,22	3,80	3,87	3,85	3,57	3,89/3,79
(β 1→3)	4,42	3,32; 3,27	4,12	3,43	3,57	3,89/3,79
<i>Trametes versicolor</i> (KOH-Fraktion)						
(α 1→3)	5,11	3,72	4,09	3,53	3,59	4,00/3,92
(α 1→4)	5,22	3,72	3,88	3,82	3,59	4,00/3,92
(α 1→6)	5,01	3,72	3,88	3,53	3,59	4,00/3,92
(β 1→3)	4,42	3,39; 3,31	4,14	3,53	3,59	4,00/3,92
(β 1→6)	4,42	3,39; 3,31	3,50	3,53	3,59	4,20/4,03
<i>Trametes versicolor</i> (NaOH-Fraktion)						
(α 1→3)	5,03	3,77	4,08	3,53	3,61	3,96/3,91
(α 1→4)	5,25	3,77	3,89	3,85	3,61	3,96/3,91
(β 1→3)	4,48	3,35; 3,27	4,15	3,54	3,61	3,96/3,91
(β 1→6)	4,45	3,35; 3,27	3,47	3,54	3,61	4,21/4,04
<i>Hypsizygus tessulatus</i> (KOH-Fraktion)						
(α 1→4)	5,15	3,79	3,96	3,79	3,68	* ^b
(α 1→6)	4,98	3,79	3,48	3,55	3,68	4,25/4,04
(β 1→3)	4,42	3,30	4,03	3,55	3,68	* ^b
(β 1→6)	4,42	3,30	3,48	3,55	3,68	4,25/4,04
<i>Hypsizygus tessulatus</i> (NaOH-Fraktion)						
(α 1→4)	5,20	3,75	3,84	3,81	3,53	3,89/3,82
(α 1→6)	4,90	3,75	3,41	3,48	3,53	4,25/4,01
(β 1→3)	4,42	3,27; 3,20	4,08	3,49	3,53	3,89/3,82
(β 1→6)	4,36	3,27; 3,20	3,41	3,48	3,53	4,25/4,01

b) Fruchtkörper

	δ H1[ppm]	δ H2[ppm]	δ H3[ppm]	δ H4[ppm]	δ H5[ppm]	δ H6a/H6b**[ppm]
<i>Lentinula edodes</i> (KOH-Fraktion)						
(α 1→4)	5,15	3,88	4,10	3,86	3,72	3,96/3,92
(α 1→6)	4,94	3,94	3,86	3,65	3,72	4,28/4,01
(β 1→6)	4,63	3,58	3,61	3,65	3,72	4,28/4,01
<i>Lentinula edodes</i> (NaOH-Fraktion)						
(α 1→4)	5,15	3,90	4,05	3,88	3,75	3,96/3,90
(β 1→3)	4,61	3,42	4,10	3,69	3,75	3,96/3,90
(β 1→6)	4,61	3,42	3,57	3,69	3,75	4,33/4,02
<i>Pleurotus ostreatus</i> (KOH-Fraktion)						
(α 1→4)	5,11	3,84	3,91	3,84	3,68	3,97/3,88
(α 1→6)	4,97	3,91	3,43	3,47	3,68	4,20/4,00
(β 1→3)	4,48	3,36	4,07	3,47	3,68	3,97/3,88
(β 1→6)	4,48	3,36	3,43	3,47	3,68	4,20/4,00
<i>Pleurotus ostreatus</i> (NaOH-Fraktion)						
(β 1→6)	4,48	3,44;3,29t	3,51	3,54	3,63	4,19/4,06;3,90t/3,77

^a Signale untereinander austauschbar^b Signal nicht eindeutig zu identifizieren

Die ¹³C-NMR-Spektren der Glucane geben weiteren Aufschluss über die intramolekularen Verknüpfungen der untersuchten Glucane. Die Signale des C1-Atoms sowie der Verknüpfungsstellen im glykosidischen Ring ermöglichen auch hier eine nähere Charakterisierung. Das charakteristische Signal des C1-Atoms bei einer β -1,3-glykosidischen Verknüpfung liegt ungefähr bei $\sim\delta$ 105,5 ppm. Charakteristisch hierfür sind ebenfalls die Signale des substituierten C3-Atoms, die bei $\sim\delta$ 89 ppm (β -1,3) bzw. $\sim\delta$ 87 ppm (β -1,3-1,6) liegen und im Vergleich zum nicht substituierten C3-Atom ($\sim\delta$ 78 ppm), deutlich zu tieferem Feld verschoben sind. Die β -1,3-glykosidische Verknüpfung ist typisch für Glucane Echter Pilze. Dieser Verknüpfungstyp wurde für die Glucane zahlreicher Pilze beschrieben. (u.a. Zhang et al. 1999, Kim et al. 2000, Carbonero et al. 2006). In Abbildung 37 ist das ¹³C-NMR-Spektrum des Glucans aus der NaOH-Fraktion des Mycels von *Hypsizygyus tessulatus* in D₂O dargestellt.

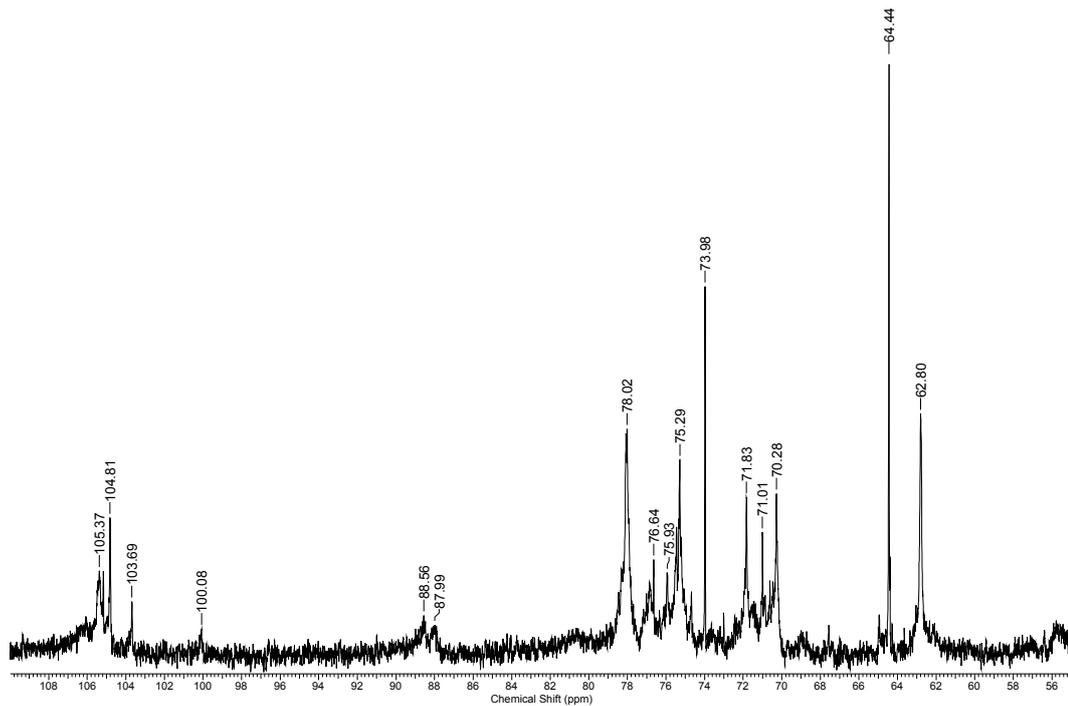


Abb. 37: ^{13}C -NMR-Spektrum des Glucans aus der NaOH-Fraktion des Mycelis von *Hypsizygus tessulatus* in D_2O .

Die bereits in den ^1H -NMR beobachteten glykosidischen Verknüpfungen in α -Konfiguration sind auch im ^{13}C -NMR Spektrum zu erkennen. Das Signal für α -1,3-Verknüpfungen liegt bei $\sim\delta$ 99,5 ppm, für α -1,6-Verknüpfungen bei $\sim\delta$ 100,2 ppm und für α -1,4-Verknüpfungen bei $\sim\delta$ 103,5 ppm. Die Zuordnung der Signale erfolgte über Referenzspektren und die zweidimensionalen HMBC- und HSQC-Spektren. In Abbildung 38 ist das DEPT135-Spektrum dargestellt. Hier lässt sich über das negative Signal des substituierten C6-Atoms bei $\sim\delta$ 70 ppm eindeutig eine β -1,6-Verknüpfung identifizieren.

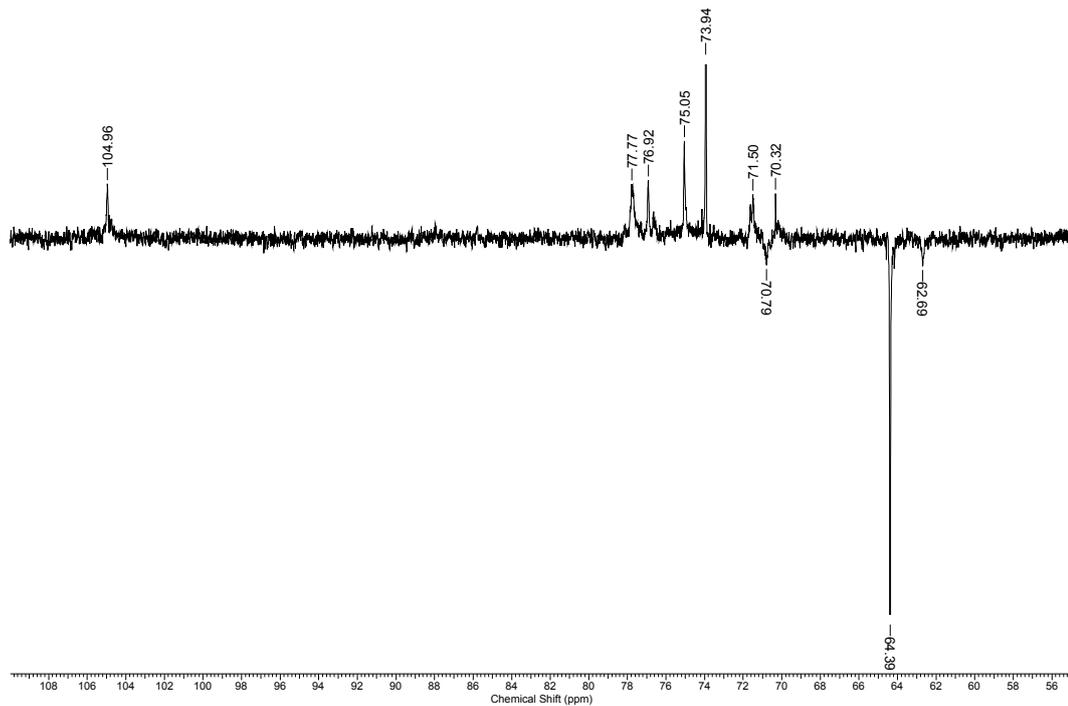


Abb. 38: DEPT135-Spektrum des Glucans aus der NaOH-Fraktion des Fruchtkörpers von *Pleurotus ostreatus* in D_2O .

Das zugehörige Signal des C1-Atoms liegt bei $\sim\delta$ 104,6 ppm. Die Zuordnung der negativen Signale zu dem C6-Atom ist eindeutig und leicht möglich, da es als einziges C-Atom eine Bindung zu zwei Wasserstoffatomen aufweist. In Tabelle 23 sind auf den folgenden Seiten die Zuordnungen der Signale für sämtliche Proben aufgeführt.

Tab. 23: Charakterisierung der glykosidischen Bindungen und Zuordnung der Signale der ^{13}C -NMR Spektren der Glucane aus den jeweiligen a) Mycelien und b) Fruchtkörpern der verschiedenen Pilze.

a) Mycel

	δ C1 [ppm]	δ C2 [ppm]	δ C3 [ppm]	δ C4 [ppm]	δ C5 [ppm]	δ C6 [ppm]
<i>Lentinula edodes</i> (KOH-Fraktion)						
(α 1→4)	103,73	75,32	71,96	80,03	76,12	64,12; 62,36
(β 1→3)	105,22	72,03	87,45	70,12	76,12	64,12; 62,36
(β 1→6)	104,98	72,03	79,02	70,12	76,12	70,65
<i>Lentinula edodes</i> (NaOH-Fraktion)						
(β 1→3)	105,30	74,91	85,76; 86,31	70,02	77,41	64,31; 62,54t
(β 1→6)	104,70	71,41	77,72	70,02	77,41	70,63
<i>Pleurotus pulmonarius</i> (KOH-Fraktion)						
(α 1→3)	99,36	76,15	80,25	68,43	71,59	63,99; 62,41
(α 1→4)	103,05	75,09	73,09	78,11	71,59	63,99; 62,41
(β 1→3)	105,07	74,69	87,71	70,63	77,67	63,99; 62,41
(β 1→6)	104,85	71,93	78,11	70,63	77,67	70,51
<i>Pleurotus pulmonarius</i> (NaOH-Fraktion)						
(α 1→4)	103,64	75,39	73,99	78,00	71,03	64,46; 62,76
(β 1→3)	105,07	71,78	89,23	70,61	76,65	64,46; 62,76
<i>Trametes versicolor</i> (KOH-Fraktion)						
(α 1→3)	99,77	74,91	80,55	68,44	71,63	64,40; 63,30
(α 1→4)	103,31	74,91	72,23	78,94	71,63	64,40; 63,30
(α 1→6)	101,97	74,91	72,23	68,44	71,63	71,48
(β 1→3)	105,21	73,35	88,48	70,05	75,87	64,40; 63,30
(β 1→6)	104,00	71,84	75,87	70,05	75,87	71,48
<i>Trametes versicolor</i> (NaOH-Fraktion)						
(α 1→3)	99,80	76,15	79,95	68,49	71,56	64,03; 62,44
(α 1→4)	103,23	74,62	72,94	78,11	71,56	64,03; 62,44
(β 1→3)	105,23	73,56	87,61	69,83	77,50	64,03; 62,44
(β 1→6)	104,37	70,61	77,86	69,83	77,50	70,28
<i>Hypsizygus tessulatus</i> (KOH-Fraktion)						
(α 1→4)	103,81	76,13	73,35	78,46	71,68	64,58; 62,91
(α 1→6)	100,25	75,45	73,35	70,33	71,68	70,82
(β 1→3)	105,39	74,07	88,32	70,33	77,93	64,58; 62,91
(β 1→6)	104,95	72,30	78,18	70,33	77,93	70,82
<i>Hypsizygus tessulatus</i> (NaOH-Fraktion)						
(α 1→4)	103,69	75,93	73,96	78,20	71,56	64,44; 62,80
(α 1→6)	100,06	75,93	73,96	70,28	71,56	71,01
(β 1→3)	105,37	75,29	88,56; 87,90	70,28	76,64	64,44; 62,80
(β 1→6)	104,81	71,83	88,56	70,28	76,64	71,01

b) Fruchtkörper

	δ C1 [ppm]	δ C2 [ppm]	δ C3 [ppm]	δ C4 [ppm]	δ C5 [ppm]	δ C6 [ppm]
<i>Lentinula edodes</i> (KOH-Fraktion)						
(α 1→4)	103,69	75,03	77,45	80,04	76,81	64,50
(α 1→6)	100,04	75,03	77,45	69,16	76,81	70,65
(β 1→6)	104,86	71,49	77,45	74,01	76,81	70,65
<i>Lentinula edodes</i> (NaOH-Fraktion)						
(α 1→4)	103,85	75,50	72,18	80,80	77,35	64,74; 63,06
(β 1→3)	105,35	71,97	89,26	70,39	77,35	64,74; 63,06
(β 1→6)	104,33	71,97	78,50	70,39	77,35	71,00
<i>Pleurotus ostreatus</i> (KOH-Fraktion)						
(α 1→4)	103,69	75,41	72,41	78,02	77,26	64,40; 62,94
(α 1→6)	99,93	75,41	72,41	69,05	77,26	71,14
(β 1→3)	105,35	75,21	87,89	70,35	77,26	64,40; 62,94
(β 1→6)	104,93	72,01	78,42	70,35	77,26	71,14
<i>Pleurotus ostreatus</i> (NaOH-Fraktion)						
(β 1→6)	104,96	71,09	77,77	70,32	76,92	70,79; 62,69

Die ^{13}C -NMR-Spektren ermöglichen eine sichere Charakterisierung der glykosidischen Bindungen. Mithilfe der Standardpolysaccharide (siehe 3.1.1) können die Zuordnungen bestätigt werden. Unterstützend können weitere zweidimensionale NMR-Experimente die Ergebnisse bestätigen. Abbildung 39 zeigt das NOESY-Spektrum des β -1,6-Glucans aus der NaOH-Fraktion von *Pleurotus ostreatus*. Mit Hilfe des Kern-Overhauser-Effekts (NOE) lassen sich hier die glykosidischen Bindungen bestimmen (nach Monteiro et al. 2000, Pramanik et al. 2007, Gosh et al. 2008). Die intramolekularen NOE-Kontakte sind in dem dargestellten Strukturschema abgebildet (siehe Abb. 39).

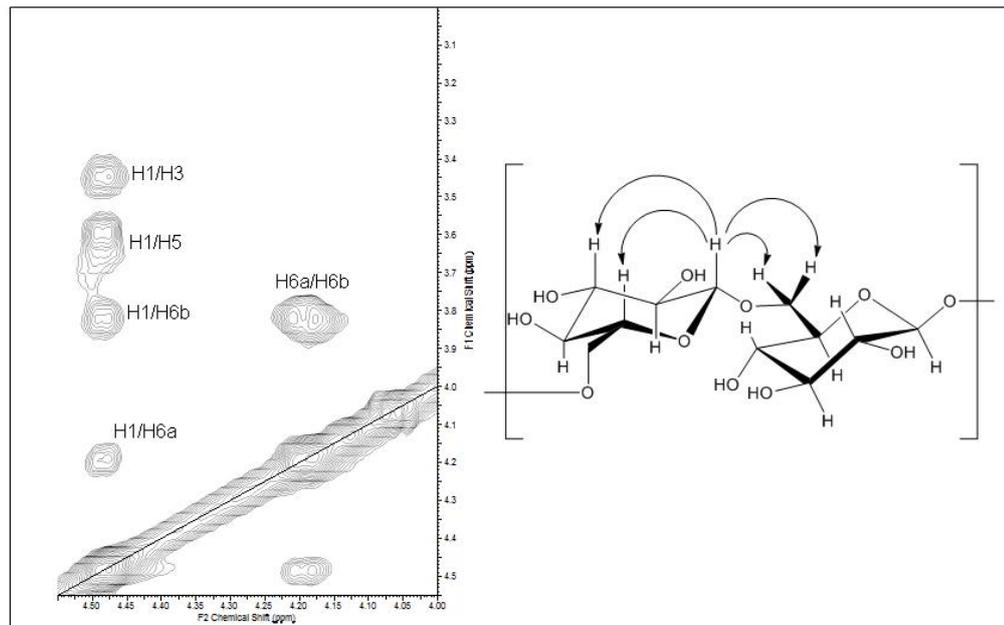


Abb. 39: Ausschnitt aus dem NOESY-Spektrum des Glucans der NaOH-Fraktion des Fruchtkörpers von *Pleurotus ostreatus* in D₂O.

Außerdem konnten NOE-Kontakte zwischen den α -konfigurierten H1-Atomen und β -konfigurierten Atomen des glykosidischen Rings beobachtet werden. Dies spricht für eine Verknüpfung α - und β -konfigurierter Glucoseketten untereinander.

Wie bereits erwähnt handelt es sich bei den meisten der hier isolierten Glucane um β -1,3-Glucane. Dies ist die typische Bindungsart für Pilzglucane. Des Weiteren konnte auch die typische β -1,6-Bindung in den meisten Proben nachgewiesen werden.

Darüber hinaus konnten mehrere Verknüpfungen in α -Konfiguration bestimmt werden. Auffällig ist, dass die Anzahl der Bindungstypen von der KOH- zur NaOH-Fraktion bei den untersuchten Glucanen abnimmt. So ist zum Beispiel das Glucan, welches aus der KOH-Fraktion von *Pleurotus ostreatus* (Fruchtkörper), isoliert wurde, ein β -1,3-1,6- α -1,4-1,6-Glucan, während das Glucan der NaOH-Fraktion nur eine β -1,6-Verknüpfung aufweist. Es ist offensichtlich, dass die weitere Extraktion zu der erwähnten Degradation der Glucane führt. Dies reduziert die auftretenden Bindungstypen erheblich. Das bedeutet, dass tatsächlich eine mitunter unerwünschte strukturelle Veränderung auftritt. Am wahrscheinlichsten ist es, dass besonders die Inkubation mit Salzsäure im zweiten Extraktionsschritt die Bindungen der leicht angreifbaren Seitenketten hydrolysiert. Trotz der Abnahme an Verknüpfungsarten, konnte wie in Abschnitt 4.2 beschrieben nicht beobachtet werden, dass die weitere Extraktion mit HCl und

NaOH Einfluss auf die triplehelicale Tertiärstruktur im Allgemeinen hat. Allerdings kann auch die Primärstruktur Einfluss auf die Wirkung haben. Deshalb ist die beobachtete Degradation problematisch. Durch die enzymatische Extraktion sollte diese Degradation unterbunden werden.

4.4.1.2 Charakterisierung der enzymatisch extrahierten Glucane

Auch hier wurden Referenzspektren, Literaturdaten und zweidimensionale NMR-Experimente zur Charakterisierung und Signalzuordnung genutzt.

Es wurden erneut α -1,3-, α -1,4-, α -1,6-, β -1,3- und β -1,6-glykosidische Bindungen identifiziert. In Tabelle 24 sind die Ergebnisse der $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie dargestellt.

Tab. 24: Charakterisierung der glykosidischen Bindungen und Zuordnung der Signale der $^1\text{H-NMR}$ -Spektren der enzymatisch extrahierten Glucane.

	δ H1[ppm]	δ H2[ppm]	δ H3[ppm]	δ H4[ppm]	δ H5[ppm]	δ H6a/H6b ^{*a} [ppm]
<i>Lentinula edodes</i>						
(α 1 \rightarrow 4)	5,20	3,78	3,80	3,82	3,58	3,93/3,78
(α 1 \rightarrow 6)	4,85	3,78	3,80	* ^b	3,58	4,26/4,02
(β 1 \rightarrow 3)	4,34	3,27; 3,22	4,10	3,46	3,58	3,93/3,78
(β 1 \rightarrow 6)	4,34	3,27; 3,22	3,35	3,46	3,58	4,26/4,02
<i>Pleurotus pulmonarius</i>						
(α 1 \rightarrow 3)	5,06	3,74	4,07	3,57	3,66	3,98/3,92
(α 1 \rightarrow 4)	5,20	3,74	3,87	3,78	3,66	3,98/3,92
(α 1 \rightarrow 6)	4,90	3,74	3,87	3,57	3,66	4,17/* ^b
(β 1 \rightarrow 3)	4,46	3,29	4,11	3,48	3,66	3,98/3,92
(β 1 \rightarrow 6)	4,46	3,29	3,34	3,48	3,66	4,17/* ^b
<i>Trametes versicolor</i>						
(α 1 \rightarrow 4)	5,19	3,79	3,86	3,84	3,67	3,98/3,95
(α 1 \rightarrow 6)	4,96	3,79	3,86	3,56	3,67	4,22/4,02
(β 1 \rightarrow 3)	4,40	3,29; 3,23	4,10	3,56	3,67	3,98/3,95
(β 1 \rightarrow 6)	4,40	3,29; 3,23	3,47	3,56	3,67	4,22/4,02
<i>Hypsizygus tessulatus</i>						
(α 1 \rightarrow 4)	5,13	3,79	3,98	3,79	3,63	* ^b
(α 1 \rightarrow 6)	4,91	3,79	3,42	3,42	3,63	4,21/3,98
(β 1 \rightarrow 3)	4,34	3,29; 3,21	4,05	3,49	3,72	* ^b
(β 1 \rightarrow 6)	4,31	3,29; 3,21	3,42	3,49	3,72	4,21/3,98

*^a Signale untereinander austauschbar

*^b Signal nicht eindeutig zu identifizieren

Neben den ^1H -NMR-Experimenten wurden ^{13}C -NMR-Spektren aufgenommen, um die glykosidischen Bindungen genau zu charakterisieren. In Abbildung 40 ist beispielhaft ein ^{13}C -NMR-Spektrum eines enzymatisch extrahierten Glucans dargestellt.

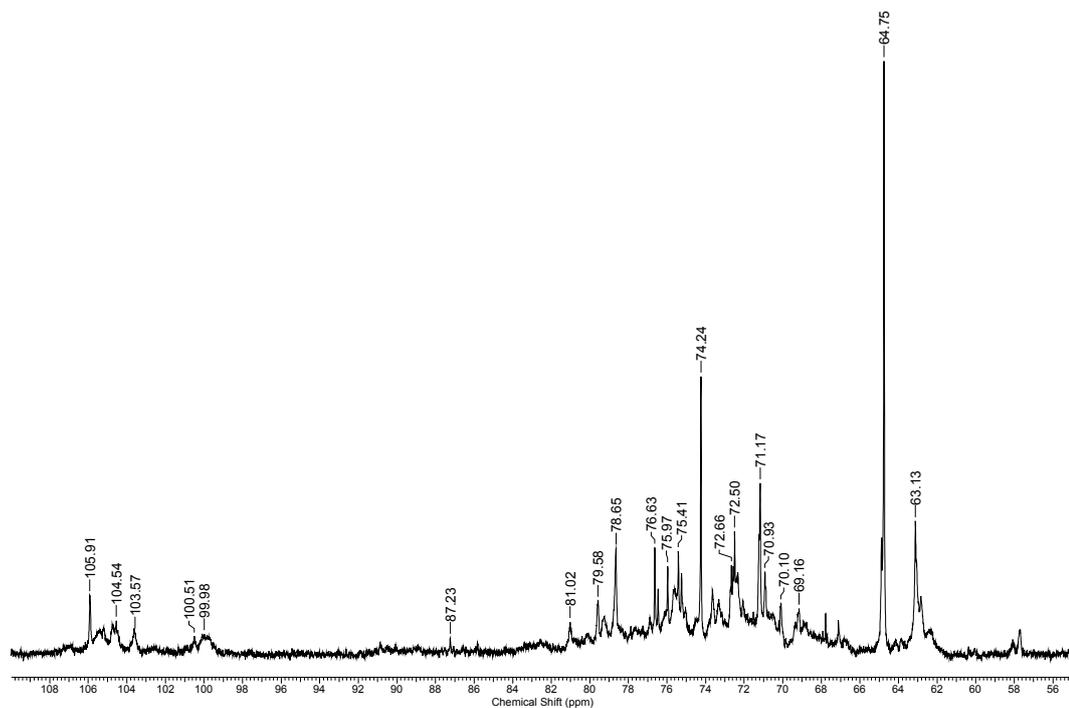


Abb. 40: ^{13}C -NMR-Spektrum des enzymatisch extrahierten Glucans aus dem Mycel von *Pleurotus pulmonarius* in D_2O .

Wie in der Abbildung 40 zu erkennen ist, weisen die enzymatisch extrahierten Glucane mitunter mehrere unterschiedliche Bindungen in α - und β -Konfiguration auf. Das hier dargestellte Spektrum des enzymatisch extrahierten Glucans aus *Pleurotus pulmonarius* zeigt die charakteristischen C1-Signale eines β -1,3- und β -1,6-Glucan (δ 105,91 ppm bzw. δ 104,54 ppm) sowie die typischen Signale einer α -1,3-, α -1,4- und α -1,6-Bindung (δ 99,98 ppm, δ 103,57 ppm und δ 100,51 ppm). Die Ergebnisse der ^{13}C -NMR sind in Tabelle 25 dargestellt.

Tab. 25: Charakterisierung der glykosidischen Bindungen und Zuordnung der Signale der ^{13}C -NMR Spektren der enzymatische extrahierten Glucane.

	δ C1[ppm]	δ C2[ppm]	δ C3[ppm]	δ C4[ppm]	δ C5[ppm]	Δ C6[ppm]
<i>Lentinula edodes</i>						
(α 1 \rightarrow 4)	103,53	75,45	72,83	80,02	72,32	65,05; 63,29
(α 1 \rightarrow 6)	100,03	75,45	72,83	69,35	72,32	71,25
(β 1 \rightarrow 3)	104,54	74,53	90,62	70,02	77,92	65,05; 63,29
(β 1 \rightarrow 6)	105,78	70,05	79,92	70,02	77,92	71,25
<i>Pleurotus pulmonarius</i>						
(α 1 \rightarrow 3)	99,98	75,97	81,02	69,16	72,66	64,75; 63,13
(α 1 \rightarrow 4)	103,57	75,41	72,50	79,58	72,66	64,75; 63,13
(α 1 \rightarrow 6)	100,51	75,41	72,50	69,16	72,66	70,93
(β 1 \rightarrow 3)	105,91	74,24	87,23	71,17	76,65	64,75; 63,13
(β 1 \rightarrow 6)	104,54	70,10	78,65	71,17	76,65	70,93
<i>Trametes versicolor</i>						
(α 1 \rightarrow 4)	103,53	75,42	73,21	80,16	71,87	64,95; 63,19
(α 1 \rightarrow 6)	100,80	75,42	73,21	69,94	71,87	71,33
(β 1 \rightarrow 3)	105,15	74,43	89,96	70,91	76,09	64,95; 63,19
(β 1 \rightarrow 6)	104,90	70,37	79,03	70,91	76,09	71,33
<i>Hypsizygus tessulatus</i>						
(α 1 \rightarrow 4)	103,83	75,47	72,69	80,42	71,90	64,19; 62,41
(α 1 \rightarrow 6)	99,8	75,47	72,69	69,46	71,90	70,46
(β 1 \rightarrow 3)	105,20	74,93	88,72;	70,88	75,47	64,19; 62,41
(β 1 \rightarrow 6)	104,56	69,89	78,95	70,88	75,47	70,46

Vergleicht man die Glucane der Literaturmethode mit denen der neuartigen enzymatischen Extraktionmethode, so fällt auf, dass mit der KOH-Fraktion der Literaturmethode hinsichtlich der Bindungsarten ähnliche Glucane isoliert wurden wie mit dem enzymatischen Extraktionsverfahren. Bei den Glucanen aus *Lentinula edodes* und *Pleurotus pulmonarius* konnte zusätzlich noch eine α -1,6- bzw. α -1,3-Bindung identifiziert werden, während bei *Trametes versicolor* das enzymatisch extrahierte Glucan keine α -1,3-Bindung aufwies. Die Ergebnisse sprechen dafür, dass mit dem enzymatischen Verfahren Glucane unter Erhalt der Primärstruktur extrahiert werden können.

Des Weiteren zeigen die Ergebnisse, dass eine Extraktion mit alkalischen Reagenzien (Literaturmethode) zu einer Degradation der Glucane führen kann (siehe 4.4.1.1). Die Degradation der Seitenketten scheint bei einer kurzen Extraktion mit KOH eher gering zu sein. Wie in Abschnitt 5 diskutiert wird,

können mit KOH im Vergleich zur enzymatischen Extraktion ähnliche Gehalte an β -Glucanen extrahiert werden. Die Ergebnisse bestätigen somit, dass die enzymatische Extraktion geeignet ist, um gleichwertige Glucane wie sie von anderen Methoden bekannt sind zu isolieren

Die in dieser Arbeit ermittelten Bindungstypen sind für die jeweilige Spezies bereits teilweise beschrieben. So wurden aus dem Fruchtkörper von *Lentinula edodes* sowohl Glucane mit β -1,3-1,6- (Chihara et al. 1970, Zhang et al. 2011) als auch mit α -1,3-1,4-Verknüpfungen beschrieben (Shida et al. 1978, Zhang et al. 1999). Außer der α -1,3-Bindung wurden alle diese Bindungstypen sowohl bei den durch die Literaturmethode isolierten Glucanen des Fruchtkörpers und Mycels als auch bei dem enzymatisch extrahierten Glucan des Mycels gefunden. Die ebenfalls nachgewiesene α -1,6-Bindung ist bei Glucanen anderer Pilze wie *Agaricus brasiliensis* (Mizuno et al. 1998, Gonzaga et al. 2005) und *Fomitella fraxinea* (Bull.) beschrieben worden. Die für *Pleurotus pulmonarius* gefundenen α -1,3-, α -1,4-, α -1,6-, β -1,3- und β -1,6-Bindungen wurden ebenfalls in verschiedenen Arbeiten beschrieben (Pramanik et al. 2005 und 2007, Roy et al. 2008, Smiderle et al. 2008). Für *Pleurotus ostreatus* und *Pleurotus eryngii* wurden β -1,3-1,6-Glucane beschrieben (Caborero et al. 2006). Aber auch ein eher ungewöhnlich verknüpftes β -1,4-Glucan, das Pleuran, konnte isoliert werden (Karácsonyi und Kuniak 1994). Aufgrund der verwandtschaftlichen Verbindung zu weiteren Pleurotacean, bei denen α -Glucane beschrieben worden sind, ist es nicht unwahrscheinlich, dass die α -konfigurierten Verknüpfungen auch in *Pleurotus ostreatus* und *Pleurotus eryngii* zu finden sind (Rout et al. 2004 und 2005, Pramanik et al. 2005 und 2007, Roy et al. 2008, Smiderle et al. 2008). Das bekannteste Glucan von *Trametes versicolor*, das Krestin (PSK), ist ein Proteoglycan mit β -1,3-1,6-glykosidischen Bindungen (Tsukagoshi et al. 1984, Chen und Seviour 2007). α -verknüpfte Glucane wurden für diesen Pilz noch nicht beschrieben. Auch das Glucan aus *Hypsizygus tessulatus* wurde bisher noch nicht identifiziert. Außerdem konnte gezeigt werden, dass aus Mycelien ähnliche Glucane isoliert werden können wie aus Fruchtkörpern. Die Nutzung von Mycelien als Rohstoff zur Glucangewinnung ist aufgrund der einfachen Kultivierung daher besser als die Nutzung der Fruchtkörper. Ob Glucane aus Mycelien allerdings ähnlich wirken, müsste in weiteren Arbeiten gezeigt werden (siehe 6.).

4.4.3 Bestimmung der Molekularmasse

4.4.3.1 Bestimmung der Molekularmassen der durch die Literaturmethode extrahierten Glucane

Die Wirkung der Glucane wird ebenfalls von der Molekularmasse beeinflusst. So konnte gezeigt werden, dass Glucane mit hoher Molekularmasse eine höhere antikarzenogene Wirkung besitzen als niedermolekulare. Allerdings werden Glucane mit geringerer Molekularmasse besser durch den menschlichen Organismus aufgenommen (siehe 2.1). Dieser Konflikt unterstreicht die Wichtigkeit der Molekularmassenbestimmung. Diese ist auch in anderer Hinsicht interessant. Niedermolekulare Glucane sind besser löslich. Dies könnte daher bedeuten, dass durch die schonenden Bedingungen der enzymatischen Extraktion eher diese niedermolekularen Glucane isoliert werden. Andererseits könnte eine strukturelle Hydrolyse bei der Literaturmethode ebenfalls zu niedermolekularen Glucanen führen. Um diese Zusammenhänge zu klären, wurden die Molekularmassen der Glucane bestimmt.

Mit Hilfe der Gelpermeationschromatographie wurde die zahlenmittlere Molekularmasse \overline{M}_n , die gewichtsmittlere Molekularmasse \overline{M}_w , die Molekularmasse am Peakmaximum \overline{M}_p und die Polydispersität Q bestimmt. Mit den gewonnenen Kenndaten lassen sich die isolierten Glucane weiter charakterisieren und vergleichen. Für die Kalibrierung wurden Dextran Standards in einem Bereich von 20-270 kDa verwendet. In Abbildung 41 ist ein GPC-Chromatogramm dargestellt.

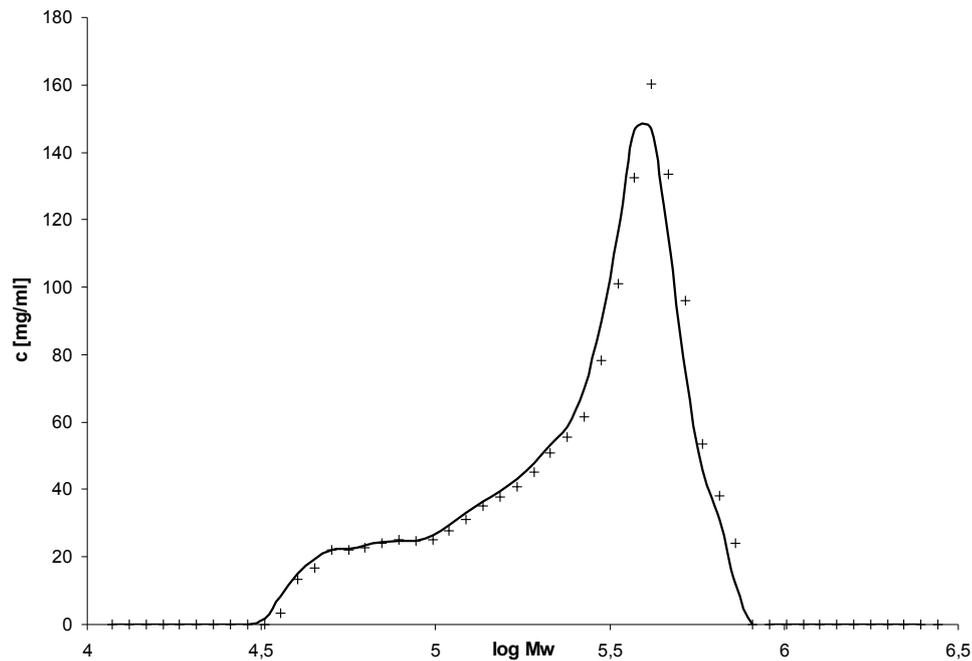


Abb. 41: Chromatogramm des Glucans aus der NaOH-Fraktion von *Hypsizygus tessulatus*.

Wie man an der Abbildung 41 erkennt, besitzt das Chromatogramm ein einzelnes Peakmaximum. Es ist durchaus denkbar, dass durch die gewählte Extraktionsmethode verschiedene Glucane isoliert werden können. In dem gezeigten Beispiel ist dies nicht der Fall, allerdings konnten bei anderen Messungen auch Chromatogramme mit mehreren Peakmaxima aufgenommen werden wie z.B. bei der KOH-Fraktion des Fruchtkörpers von *Lentinula edodes*. Bei dieser Probe wurden zwei Glucane mit einem Extraktionsschritt isoliert.

Die Polydispersität des gezeigten Glucans ist vergleichsweise gering, es wurden jedoch auch weit größere Polydispersitäten bestimmt (siehe Tab. 26). Treten mehrere Peakmaxima auf, sind diese jeweils in der Tabelle aufgeführt.

Tab. 26: Kenndaten der Molekularmassenbestimmung der durch die Literaturmethode extrahierten Glucane.

Fruchtkörper (Fraktion)	M_n [Da]	M_w [Da]	M_p [Da]	Q
<i>Lentinula edodes</i> (KOH)	14493±959	76376±4102	184364±11622 5421±330	5,3±0,1
<i>Lentinula edodes</i> (NaOH)	24344±3761	137745±9801	299494±33290	5,7±0,5
<i>Pleurotus ostreatus</i> (KOH)	62107±3120	154859±19150	321676±20278 101820±6661 20703±2301	2,5±0,3
<i>Pleurotus ostreatus</i> (NaOH)	33022±3014	156014±19751	309968±20278	4,7±0,2
Mycel (Fraktion)	M_n [Da]	M_w [Da]	M_p [Da]	Q
<i>Hypsizygus tessulatus</i> (KOH)	24612±2476	149516±5266	362476±59784	6,1±0,8
<i>Hypsizygus tessulatus</i> (NaOH)	190292±9064	317845±1524	401897±25335	1,7±0,1
<i>Lentinula edodes</i> (KOH)	48218±2542	92138±3151	70447±7830	1,9±0,2
<i>Lentinula edodes</i> (NaOH)	110583±19689	252310±22309	401897±25335	2,3±0,3
<i>Pleurotus pulmonarius</i> (KOH)	26591±3311	179233±7155	346470±22666	6,8±0,6
<i>Pleurotus pulmonarius</i> (NaOH)	22940±1179	150082±4798	334762±37210	6,6±0,6
<i>Trametes versicolor</i> (KOH)	22318±737	120868±10363	267941±29783	5,4±0,5
<i>Trametes versicolor</i> (NaOH)	25387±1357	176286±7458	432874±28319	6,9±0,1

Das Glucan mit der größten gewichtsmittleren Molekularmasse ist das Glucan der NaOH-Fraktion von *Hypsizygus tessulatus* mit ~317 kDa. Die anderen Glucane haben geringere gewichtsmittlere Molekularmassen, unter anderem bedingt durch die hohe Polydispersität der Glucane. Die Molekularmassen am Peakmaximum sind bei allen Proben mit 267-432 kDa recht groß. Ausnahme ist hier das Glucan der KOH-Fraktion des Mycels von *Lentinula edodes* mit einem \overline{M}_p -Wert von nur 70 kDa.

Die mittlere Molekularmasse ist ein von der Molekularmassenverteilung abhängiger Faktor, weshalb die Polydispersität ein wichtiges Charakteristikum ist. Hier könnte eine Degradation aufgrund einer ungeordneten strukturellen Veränderung zu einer Zunahme der Polydispersität führen. Dies konnte nicht bei allen Proben festgestellt werden. So nimmt die Polydispersität bei den Glucanen

aus dem Mycel von *Hypsizygyus tessulatus* zwischen der KOH- und NaOH-Fraktion ab.

Es ist zu beachten, dass eine strukturelle Degradation nicht zwangsläufig zu einer Veränderung der Kenndaten führen muss. So ist es wahrscheinlich, dass durch die weitere Extraktion mit HCl und NaOH unlösliche Glucane abgebaut und extrahiert werden. Dies würde erklären, warum die Glucane der NaOH-Fraktion einiger Spezies deutlich höhere \overline{M}_w -Werte besitzen als die der KOH-Fraktion. Rückschlüsse auf den strukturellen Abbau der Glucane während der Extraktion sind aus diesem Grund schwierig. Interessanter ist vielmehr der direkte Vergleich mit den enzymatisch extrahierten Glucanen.

4.4.3.1 Bestimmung der Molekularmasse der enzymatisch extrahierten Glucane

Die Bestimmung der mittleren Molekularmassen und der Polydispersität wurde ebenfalls für die enzymatisch extrahierten Glucane durchgeführt (siehe 3.2.8.3). Ein entsprechendes Chromatogramm ist in Abbildung 42 dargestellt.

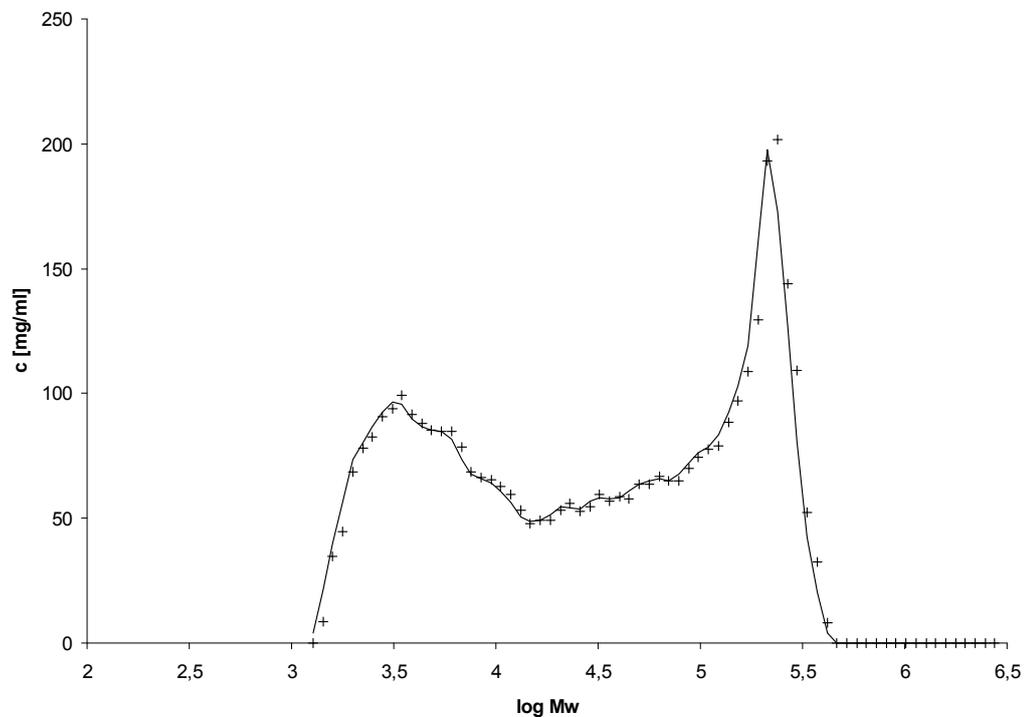


Abb. 42: GPC-Chromatogramm des enzymatisch extrahierten Glucans aus dem Mycel von *Hypsizygyus tessulatus*.

Bei *Hypsizygos tessulatus* treten zwei Peakmaxima auf (siehe Abb. 42). Bei den enzymatisch extrahierten Glucanen konnten meist mehrere Peakmaxima gemessen werden. Ein möglicher Grund ist die Inkubation mit Glucanase und die nachfolgende Extraktion mit NaOH, wobei beim ersten Extraktionsschritt wahrscheinlich Glucane mit größerer Molekularmasse extrahiert wurden. Die Glucanase baut anschließend Glucanketten unspezifisch ab, so dass die Molekularmasse abnimmt. Die in dieser Fraktion gewonnenen Glucane sind demnach kleiner. Dadurch treten mehrere Peakmaxima auf.

Die Ergebnisse der Molekularmassenbestimmung sind in Tabelle 27 dargestellt.

Tab. 27: Kenndaten der Molekularmassenbestimmung der durch die enzymatisch gewonnenen Glucane.

Probe	M_n [Da]	M_w [Da]	M_p [Da]	Q
<i>Hypsizygos tessulatus</i>	9139±685	87685±3919	221959±14521 3120±347	9,6±0,8
<i>Lentinula edodes</i>	10520±527	93913±6033	267941±29783	8,9±0,7
<i>Pleurotus pulmonarius</i>	9258±472	91072±8928	277312±18142 3351±211	9,8±0,5
<i>Trametes versicolor</i>	11531±692	111638±8736	221959±14521 70447±7830 8868±1542	9,7±0,8

Die Polydispersität ist bei den enzymatisch gewonnenen Glucanen höher als bei jenen, die durch die Literaturmethode isoliert wurden. Des Weiteren ist \overline{M}_n , \overline{M}_w und \overline{M}_p in der Regel niedriger als bei den durch die Literaturmethode gewonnenen Glucanen der jeweiligen Spezies. Allerdings ähneln manche der ermittelten gewichtsmittleren Molekulargewichte den Werten, die für die Glucane der KOH-Fraktion bestimmt wurden. So betragen die \overline{M}_w -Werte der jeweiligen Glucane aus *Lentinula edodes* 92 bzw. 93 kDa. Die höhere Polydispersität, die Abnahme der Molekularmasse sowie das Auftreten mehrerer Peakmaxima könnten aus der Inkubation mit Glucanase resultieren, weil durch die katalysierte Hydrolyse ein Abbau der Glucankette eintritt und dies zu der angesprochenen höheren Polydispersität und der Abnahme der Molekularmasse führt. Ein weiterer Grund, dass Glucane mit geringerer Molekularmasse isoliert worden sind, ist, dass die Extraktionsbedingungen milder sind. Es ist wahrscheinlich, dass kleinere Glucane

aufgrund ihrer Masse besser löslich sind und deshalb auch durch die milden Extraktionsbedingungen isoliert werden können.

Obwohl manche Arbeiten zeigen, dass Glucane mit größerer Molekularmasse wirksamer sind (Zhang et al. 2007, Mantovani et al. 2007, Wasser 2010), ist der Zusammenhang zwischen Molekularmasse und Wirkung wie bereits diskutiert nicht ausreichend geklärt. Durch eine geringere Molekularmasse kann allerdings die Aufnahme der Glucane in den menschlichen Organismus erleichtert oder die Wechselwirkung mit bestimmten Zellrezeptoren begünstigt sein (Zhang et al. 2007, Mantovani et al. 2007, Wasser 2010). Deshalb muss die geringere Molekularmasse der enzymatisch gewonnenen Glucane kein Nachteil sein.

Die in der Literatur beschriebenen Molekularmassen variieren abhängig von der gewählten Extraktions- und Aufreinigungsmethode. Für Glucane aus *Pleurotus tuber-regium* konnten Molekulargewichte \overline{M}_w von 30-40 kDa ermittelt werden (Zhang et al. 2004). Allerdings konnten bei verwandten Spezies wie *Pleurotus florida* (Mont.) höhere Massen (\overline{M}_w) von 126 kDa bestimmt werden (Oihya et al. 2010). Bei der in dieser Arbeit ebenfalls analysierten *Pleurotus pulmonarius* Art konnte sogar eine mittlere Molekularmasse von 240 kDa bestimmt werden (Pramanik et al. 2007). Auch die Ergebnisse von Zhang et al. (2003) verdeutlichen, dass die Molekularmasse von der Extraktionsart abhängig ist. Diese Arbeitsgruppe konnte Glucane aus *Pleurotus pulmonarius* isolieren, die deutlich geringere Molekularmassen von 14-34 kDa aufwiesen. Für das Lentinan aus *Lentinula edodes* konnten deutlich höhere Molekularmassen von \overline{M}_w 300-800 kDa bestimmt werden (Zhang et al. 2011).

Die in dieser Arbeit durch die Literaturmethode isolierten Glucane wiesen eine gewichtsmittlere Molekularmasse von ~76-190 kDa auf. Die Ergebnisse verdeutlichen zudem, dass die Molekularmassen der einzelnen Spezies und Fraktionen stark variieren können. Üblich ist ein \overline{M}_w von < 120 kDa. Nur wenige Glucane besitzen eine geringere Masse. Die enzymatisch isolierten Glucane besitzen mit einer gewichtsmittleren Molekularmasse von ~87-111 kDa etwas geringere Massen. Allerdings sind die Molekularmassen am Peakmaximum mit ~220-270 kDa durchaus vergleichbar mit den Werten der Literaturmethode. Die hohe Polydispersität führt zu einer Verringerung der mittleren Molekularmassen. Weitere Vergleiche zwischen Literaturmethode und der neuartigen enzymatischen

Extraktionsmethode werden auch unter Berücksichtigung der weiteren strukturanalytischen Ergebnisse in Abschnitt 5 durchgeführt.

4.4.4 Bestimmung der Monosaccharidzusammensetzung

4.4.4.1 Bestimmung Monosaccharidzusammensetzung der durch die Literaturmethode extrahierten Glucane

Um die isolierten Glucane vollständig zu charakterisieren, wurden ebenfalls die Monosaccharidbausteine der Glucane bestimmt. In Kombination mit den anderen strukturanalytischen Daten können die Glucane hinreichend identifiziert und verglichen werden.

Die Monosaccharidbestimmung wurde nach der in Abschnitt 3.2.8.4 beschriebenen Methode durchgeführt. Hierfür wurde die Summe der Peakflächen aller enthaltenen Monosaccharide bestimmt (siehe 3.2.8.4). Für jedes Monosaccharid wurde anschließend der prozentuale Anteil der Peakfläche an der Gesamtfläche berechnet. Die nachfolgende Abbildung 43 zeigt ein beispielhaftes Chromatogramm einer Bestimmung.

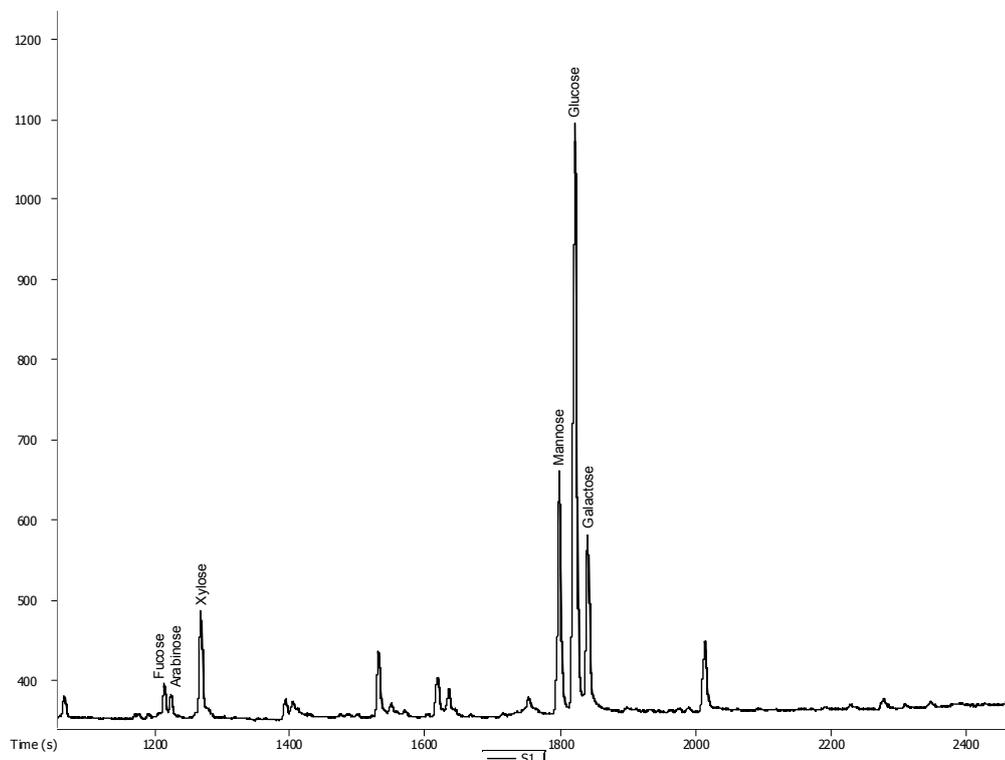


Abb. 43: Chromatogramm des mit KOH isolierten Glucans aus dem Mycel von *Hypsizygus tessulatus*.

Das häufigste Monosaccharid der alkalisch isolierten Glucane der verschiedenen Fruchtkörper und Mycelien ist die Glucose. Ihr Anteil macht über 50% aus.

Als weitere Monosaccharide konnten Mannose und Galactose sowie in geringeren Anteilen Xylose, Rhamnose, Arabinose, Ribose und Fucose identifiziert werden. Somit handelt es sich bei den analysierten Glucanen um Heteroglucane mit einem Grundgerüst aus Glucose und weiteren in geringeren Anteil gebundene Hexosen, Pentosen oder Desoxyhexosen (siehe Tab. 28).

Tab. 28: Bestimmung der Monosaccharidzusammensetzung der Glucane.

Fruchtkörper (Fraktion)	Rha [%]	Rib [%]	Fuc [%]	Ara [%]	Xyl [%]	Man [%]	Glc [%]	Gal [%]
<i>L. edodes</i> (KOH)	0	0	0	0	0	9,0 ±1,0	72,5 ±0,5	18,5 ±0,8
<i>L. edodes</i> (NaOH)	0	0	0	0	0	1,8 ±0,6	94,0 ±0,8	4,2 ±0,9
<i>P. ostreatus</i> (KOH)	1,0 ±0,3	2,0 ±0,4	0	0	0	6,0 ±0,9	64,0 ±1,4	27,0 ±1,5
<i>P. ostreatus</i> (NaOH)	0	0	0	0	0	1,0 ±0,2	91,0 ±0,8	8,0 ±0,9
Mycel (Fraktion)	Rha [%]	Rib [%]	Fuc [%]	Ara [%]	Xyl [%]	Man [%]	Glc [%]	Gal [%]
<i>H. tessulatus</i> (KOH)	0	0	1,9 ±0,4	1,4 ±0,3	17,4 ±2,0	13,5 ±1,7	50,8 ±3,5	15,0 ±1,4
<i>H. tessulatus</i> (NaOH)	0	0	0	0	1,3 ±0,2	1,2 ±0,3	97,5 ±0,2	0
<i>L. edodes</i> (KOH)	0	0	0	0	0	17,8 ±3,2	49,9 ±2,0	32,3 ±3,3
<i>L. edodes</i> (NaOH)	0	0	0	0	0	4,1 ±0,7	89,0 ±1,6	6,9 ±1,8
<i>P. pulmonarius</i> (KOH)	0	0	0	0	0	11,8 ±2,0	71,9 ±1,6	16,3 ±3,1
<i>P. pulmonarius</i> (NaOH)	0	0	0	0	0	0,8 ±0,2	99,2 ±0,2	0
<i>T. versicolor</i> (KOH)	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>T. versicolor</i> (NaOH)	0	0	0	0	0	5,1 ±0,9	85,9 ±1,9	9,0 ±2,7

Die Gehalte der KOH-Fraktion des Mycels von *Trametes versicolor* konnten nicht bestimmt werden. Mit der durchgeführten Methode konnten auch nach mehrmalige Aufarbeitungen keine zufriedenstellenden Ergebnisse ermittelt werden.

Die Ergebnisse der Bestimmung der Monosaccharidzusammensetzung zeigen, dass in der NaOH-Fraktion höhere prozentuale Gehalte an Glucose ermittelt wurden als in der KOH-Fraktion. Die mit NaOH extrahierten Glucane besitzen einen Glucoseanteil von über 86%, während die Glucane der KOH-Fraktionen nur einen maximalen Glucoseanteil von 73% besitzen. Des Weiteren nimmt der Anteil an Nebenkomponenten wie Mannose, Galactose, Xylose, Rhamnose, Arabinose, Ribose und Fucose deutlich von der KOH- zur NaOH-Fraktion ab. Die unterschiedliche Zusammensetzung der KOH- und NaOH-Fraktionen bestätigen die partielle Hydrolyse durch Anwendung der alkalischen und sauren Extraktionsmittel. Ein Vergleich zwischen KOH- und NaOH-Fraktion ist in Abbildung 44 dargestellt.

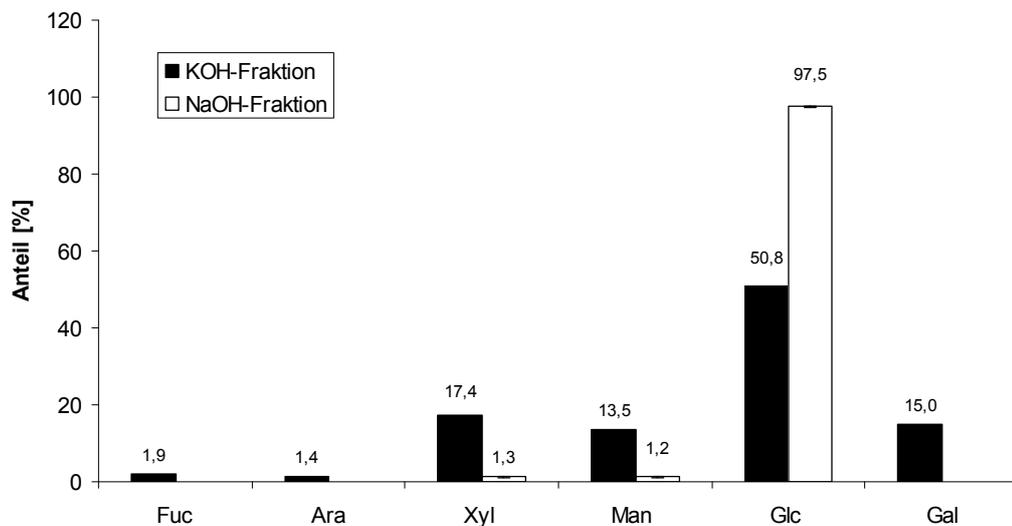


Abb. 44: Verteilung der Monosaccharide in den jeweiligen Fraktionen anhand des Mycels von *Hypsizygyus tessulatus*.

Das Glucan der KOH-Fraktion aus dem Mycel von *Hypsizygyus tessulatus* weist als einziges sechs verschiedene Monosaccharide auf: Arabinose, Fucose, Xylose, Mannose, Glucose und Galactose. *Hypsizygyus tessulatus* unterscheidet sich durch diese auffällige Zusammensetzung von den anderen untersuchten Pilzen.

In Abschnitt 4.4.2 wurde ebenfalls anhand der NMR-Ergebnisse gezeigt, dass verschiedene glykosidische Verknüpfungen, die in der KOH-Fraktion bestimmt wurden, in der NaOH-Fraktion nicht mehr vorhanden sind.

Dies bedeutet zwangsläufig, dass durch die ablaufende Hydrolyse während der Extraktion Seitenketten hydrolysiert werden. Es ist wahrscheinlich, dass die Heteromonosaccharide in diesen Seitenketten gebunden sind. Das erklärt, warum in den NaOH-Fractionen der Anteil an Heteromonosacchariden abnimmt. Somit bestätigen die hier vorgestellten Ergebnisse die Hydrolyse und Degradation während der alkalischen Extraktionsschritte.

4.4.4.2 Bestimmung der Monosaccharidzusammensetzung der enzymatisch extrahierten Glucane

Die Monosaccharidzusammensetzung wurde analog wie in 4.4.4.1 bei den enzymatisch extrahierten Glucanen bestimmt. Als Beispiel ist das Chromatogramm des Glucans aus dem Mycel von *Hypsizygos tessulatus* dargestellt (siehe Abb. 45).

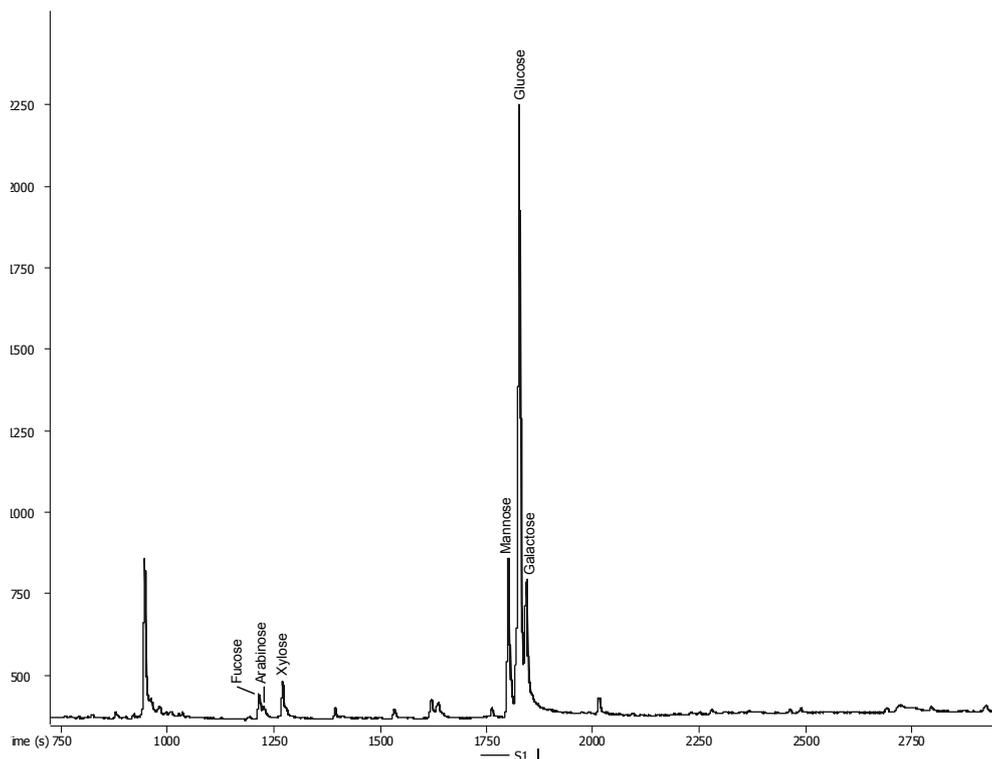


Abb. 45: Chromatogramm des enzymatisch isolierten Glucans aus dem Mycel von *Hypsizygos tessulatus*.

Bei dieser Extraktionsmethode unterscheidet sich ebenfalls das Monosaccharidmuster des Glucans aus *Hypsizygos tessulatus* von den Glucanen aus den anderen Mycelien. Auch bei dem enzymatisch isolierten Glucan wurde Arabinose, Fucose, Xylose, Galactose und Mannose als Heteromonosaccharide nachgewiesen. Dieses

breite Spektrum an Monosacchariden ist nur in dieser Spezies zu finden (siehe Tab. 29).

Tab. 29: Monosaccharidzusammensetzung der enzymatisch extrahierten Glucane.

Probe	Rha [%]	Rib [%]	Fuc [%]	Ara [%]	Xyl [%]	Man [%]	Glc [%]	Gal [%]
<i>Hypsizygyus tessulatus</i>	0	0	1,8 ±0,5	0,8 ±0,3	3,5 ±1,0	12,8 ±2,8	66,1 ±3,3	15,0 ±1,7
<i>Lentinula edodes</i>	0	0	0	0	0	9,7 ±1,2	75,1 ±1,6	15,2 ±0,7
<i>Pleurotus pulmonarius</i>	0	0	0	0	0	14,0 ±1,3	61,8 ±0,7	24,2 ±1,3
<i>Trametes versicolor</i>	0	0	0	0	0	12,3 ±1,4	76,6 ±0,8	11,1 ±1,6

Bei einem Vergleich des Monosaccharidspektrums fällt auf, dass die Glucane aus *Lentinula edodes* und *Trametes versicolor* sehr ähnliche Gehalte an Mannose, Glucose und Galactose aufweisen. Im Vergleich dazu unterscheiden sich *Pleurotus pulmonarius* und *Hypsizygyus tessulatus* durch einen höheren Gehalt an Galactose und den niedrigsten Gehalt an Glucose. Bei den durch die Literaturmethode extrahierten Glucane besitzt das Glucan aus dem Mycel von *Pleurotus pulmonarius* hingegen den höchsten Glucoseanteil.

Vergleicht man die hier ermittelten Ergebnisse (Tab. 29) mit der Monosaccharidzusammensetzung der durch die KOH-Extraktion gewonnenen Glucane der Literaturmethode (Tab. 28) fällt auf, dass die Glucane der KOH-Fraktion der Literaturmethode eine ähnliche Zusammensetzung haben wie die enzymatisch extrahierten Glucane. So weist z.B. das Glucan der KOH-Fraktion aus *Pleurotus pulmonarius* eine Zusammensetzung von 11,8% Mannose, 71,9% Glucose und 16,3% Galactose auf, während das entsprechende enzymatisch extrahierte Glucan eine Zusammensetzung von 14,0% Mannose, 61,8% Glucose und 24,2% Galactose besitzt. Es wurden somit ähnliche Produkte wie bei einem der alkalischen Extraktionsschritte (KOH-Extraktion der Literaturmethode) gewonnen. Dies wird weiter unter Berücksichtigung sämtlicher strukturanalytischer Ergebnisse in Abschnitt 5 diskutiert.

Die gefundenen Monosaccharide sind bereits in zahlreichen Arbeiten in verschiedenen Kombinationen beschrieben worden. So wurde zum Beispiel ein Glucan aus dem Mycel von *Trametes versicolor* isoliert, welches Glucose (74.6%), Mannose (15.5%), Xylose (4.8%), Galactose (2.7%) und Fucose (2.4%) enthält

(Ramberg et al. 2010). Mizuno et al. (1990) konnten größere Anteile Fucose und Spuren von Xylose, Galactose und Mannose in einem Glucan aus *Agaricus brasiliensis* nachweisen. Aus *Pleurotus pulmonarius* konnten unter anderem ein Xyloglucan (Zhuang et al. 1993) und ein Mannogalactoglucan (Gutierrez et al. 1996) isoliert werden. Die in dieser Arbeit isolierten Glucane aus *Pleurotus pulmonarius* sind ebenfalls Mannogalactoglucane. Des Weiteren sind Arabinoglucane aus *Grifola frondosa* (Zhang et al. 1994 a, b) und ein Riboglucan aus *Agaricus brasiliensis* isoliert worden (Cho et al. 1999). Zahlreiche weitere Glucane verschiedener Spezies enthalten diese Monosaccharide in unterschiedlicher Kombination (Wasser 2002, Cho et al. 2011). Diese auch in dieser Arbeit gefundenen Monosaccharide sind somit die typischen Komponenten der Glucane aus Echten Pilzen.

5. Schlussfolgerung

In dieser Arbeit wurde erstmals eine enzymatische Extraktionsmethode für β -Glucane aus Basidiomycetes und Ascomycetes entwickelt. Durch die Kombination von enzymatischen und milden alkalischen Extraktionsschritten konnten aus ausgewählten Zellmaterialien Glucane isoliert werden.

Das Extraktionsverfahren wurde besonders für β -Glucane aus dem vegetativen Mycelien ausgewählter Pilzzellkulturen entwickelt. Damit unterscheidet sich das Verfahren von Literaturmethoden die mehrheitlich Glucane aus Fruchtkörpern isolieren.

Das Extraktionsprinzip der enzymatischen Hydrolyse der Zellwand durch Chitinasen und β -Glucanasen führt nur bei einigen Mycelien effektiv zu einer Freisetzung von β -Glucanen. Durch den Abbau des Chitins und durch die zusätzliche Inkubation mit β -Glucanase lassen sich demnach enzymatisch β -Glucane extrahieren. Die enzymatische Extraktion unterscheidet sich somit maßgeblich von herkömmlichen Extraktionsmethoden, die durch den Einsatz von Säuren und Laugen Glucane extrahieren.

Für die enzymatische Extraktionsmethode wurde eine Abfolge von Extraktionsschritten konzipiert, die es ermöglichen, Glucane aus einigen Mycelien unter Erhalt ihrer Struktur zu extrahieren.

Ein effizienter Abbau des Chitins konnte nur durch Zugabe externer Chitinase realisiert werden. So konnte im Rahmen des Entwicklungsprozesses gezeigt werden, dass die pilzeigenen Enzyme trotz der vorhandenen Aktivität die Extraktion nicht maßgeblich beeinflussen. Mögliche Gründe sind unter anderem eine geringe Substratspezifität für das pilzeigene Chitin (siehe 4.1.2.1). Somit ist eine externe Zugabe von Chitinase zwingend notwendig. Es ist allerdings denkbar, dass ein synergetischer Effekt durch pilzeigene Enzyme die Extraktion durchaus positiv beeinflusst. Durch die Zugabe von Glucanase in einem weiteren Extraktionsschritt konnte die Effizienz der Methode weiter erhöht werden.

Mit Hilfe der Bestimmungsmethode für Chitin konnte dieses in den Proben bestimmt werden (siehe 4.1.4). Da die Extraktionsmethode maßgeblich auf den Abbau von Chitin basiert, sind Kenntnisse über den Chitingehalt der einzelnen

Proben immens wichtig. Weil keine adäquate Methode zur Chitinbestimmung zu Verfügung steht, wurde speziell hierfür eine Methode entwickelt. Diese Methode konnte nach einer entsprechenden Validierung zur Chitinbestimmung in den Zellmaterialien benutzt werden. Hierdurch ließ sich anschließend die Menge an nötiger Chitinase bestimmen und die nötige Inkubationsdauer für den ersten Schritt der enzymatischen Extraktion abschätzen.

Des Weiteren wurde im Rahmen dieser Arbeit erstmals eine Bestimmungsmethode für triplehelicale β -Glucane entwickelt und erfolgreich an verschiedenen Proben angewandt. Wie die Ergebnisse und Validierungen zeigen, lassen sich mit dieser Methode spezifisch triplehelicale Glucane in den Proben quantifizieren. In Verbindung mit der optimierten Methode zur Bestimmung des Gesamt- β -Glucangehaltes lässt sich erstmals der Anteil an Glucanen mit dieser wichtigen Tertiärstruktur ermitteln. Die entwickelten Bestimmungsmethoden wurden anschließend für den Vergleich der erzielten Ausbeuten herangezogen (siehe 4.2 und 4.3). Dieser Vergleich ist insbesondere aufgrund der hohen Wirksamkeit triplehelicaler Glucane besonders interessant und wird im späteren Verlauf dieses Abschnittes noch ausführlich diskutiert.

Ein anderer wichtiger Teil dieser Arbeit ist aufgrund der strukturellen Degradation der Glucane bei der Literaturmethode der strukturelle Vergleich der isolierten Polysaccharide. In Tabelle 30 sind die Ergebnisse der Strukturanalyse der Literaturmethode (Lit.) und enzymatischen Methode (enzym.) zusammengefasst.

Tab. 30: Zusammenfassung der strukturanalytischen Charakterisierung der aus den Mycelien isolierten Glucane.

Probe (Extraktionsart)	Typ	Monosaccharide	\overline{M}_w [kDa]	Q	Triple- helix [%]
<i>H. tessulatus</i> (enzym.)	α -1,4-1,6- β -1,3-1,6-Glucan	Fuc, Ara, Xyl, Man, Glc, Gal	87	9,6	13
<i>H. tessulatus</i> (Lit. KOH)	α -1,4-1,6- β -1,3-1,6-Glucan	Fuc, Ara, Xyl, Man, Glc, Gal	149	6,1	36
<i>H. tessulatus</i> (Lit. NaOH)	α -1,4-1,6- β -1,3-1,6-Glucan	Xyl, Man, Glc, Gal	317	1,7	100
<i>L. edodes</i> (enzym.)	α -1,4-1,6- β -1,3-1,6-Glucan	Man, Glc, Gal	93	8,9	20
<i>L. edodes</i> (Lit. KOH)	α -1,4- β -1,3-1,6-Glucan	Man, Glc, Gal	92	1,9	57
<i>L. edodes</i> (Lit. NaOH)	β -1,3-1,6-Glucan	Man, Glc, Gal	252	2,3	89
<i>P. pulmonarius</i> (enzym.)	α -1,3-1,4-1,6- β -1,3-1,6-Glucan	Man, Glc, Gal	91	9,8	19
<i>P. pulmonarius</i> (Lit. KOH)	α -1,3-1,4- β -1,3-1,6-Glucan	Man, Glc, Gal	179	6,8	7
<i>P. pulmonarius</i> (Lit. NaOH)	α -1,4- β -1,3-Glucan	Man, Glc	150	6,6	60
<i>T. versicolor</i> (enzym.)	α -1,4-1,6- β -1,3-1,6-Glucan	Man, Glc, Gal	111	9,7	40
<i>T. versicolor</i> (Lit. KOH)	α -1,3-1,4-1,6- β -1,3-1,6-Glucan	nicht bestimmt	120	5,4	43
<i>T. versicolor</i> (Lit. NaOH)	α -1,3-1,4- β -1,3-1,6-Glucan	Man, Glc, Gal	176	6,9	100

Die aus der NaOH-Fraktion isolierten Glucane weisen oftmals eine geringere Anzahl an glykosidischen Bindungen auf. So ist das Glucan der NaOH-Fraktion von *Lentinula edodes* im Gegensatz zum Glucan aus der KOH-Fraktion auf das β -1,3-1,6-Glucangerüst reduziert. Dies bedeutet zwangsläufig, dass die weitere Extraktion mit HCl und NaOH zu einem Abbau der Seitenketten führt. Dies wiederum bestätigt, dass diese und ähnliche Extraktionsmethoden, die Struktur maßgeblich verändern können. Betrachtet man die jeweiligen Glucane der NaOH-Fraktion so scheinen besonders die Seitenketten abgebaut zu werden. Bei den Glucanen der NaOH-Fraktion, bei denen dieselben glykosidischen Bindungen gefunden wurden wie bei der jeweiligen KOH-Fraktion, sind die Signalintensitäten der korrespondierenden Signale im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum im Verhältnis deutlich geringer. Betrachtet man die Monosaccharidzusammensetzung der NaOH-Fraktion, ist ebenfalls zu beobachten, dass die Hetero-

glucane im Verhältnis zur Glucose von der KOH- zur NaOH-Fraktion deutlich abnehmen. Mit hoher Wahrscheinlichkeit sind diese Monosaccharide an die Seitenketten gebunden. Ein Abbau an Seitenketten führt automatisch zu einer Abnahme der Anteile dieser Zucker. Diese Degradation, die bei vielen Extraktionsmethoden dieser Art auftritt, macht die enzymatische Extraktion zu einer interessanten Alternative. Gerade das Vorhandensein von Seitenketten scheint besonders für die Wirkung der Glucane wichtig zu sein (Steinbüchel et al. 2002, Wasser 2010, Wasser 2011). Mit der entwickelten enzymatischen Extraktionsmethode bleiben diese Seitenketten anders als bei der Literaturmethode nach Sietsma und Wessels (1977) erhalten.

Die enzymatisch extrahierten Produkte sind mit den Glucanen vergleichbar, die in der KOH-Fraktion der Literaturmethode zu finden sind. Neben der Determinierung der glykosidischen Bindungen wird dies auch durch die Monosaccharidzusammensetzung deutlich. Hier konnten bei den enzymatischen und mit KOH isolierten Glucanen vergleichbare Monosaccharidverteilungen erfasst werden. Dies wird in Abbildung 46 anhand der Glucane aus *Hypsizygos tessulatus* verdeutlicht.

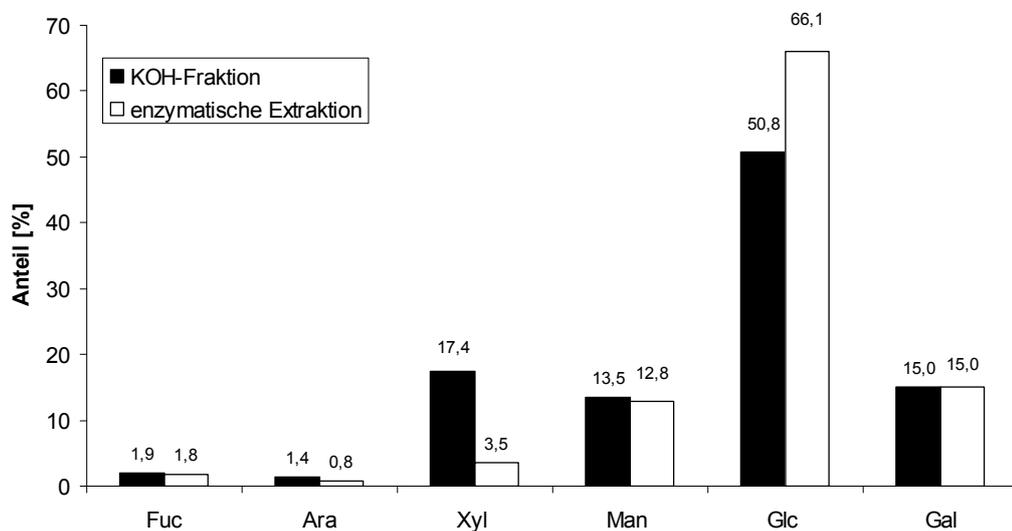


Abb. 46: Vergleich der Monosaccharidzusammensetzung am Beispiel von *Hypsizygos tessulatus*.

Wie zu erkennen ist, konnte eine nahezu identische Monosaccharidverteilung bestimmt werden. Die Glucane unterscheiden sich nur geringfügig. Einzig der Xylose-Anteil ist im enzymatisch extrahierten Polysaccharid niedriger, dafür der Glucosegehalt höher. Übereinstimmungen zwischen den Glucanen der KOH-Fraktion und den enzymatisch isolierten Glucanen wurden für die anderen

Glucane ebenfalls beobachtet (siehe 4.4 ff.). Vergleicht man zusätzlich die gewichtsmittleren Molekularmassen, so sind hier ebenfalls Übereinstimmungen zu finden. Allerdings treten auch charakteristische Abweichungen auf. So sind die Molekularmassen der Glucane der KOH-Fraktion von *Hypsizygyus tessulatus* und *Pleurotus pulmonarius* größer als die der enzymatisch extrahierten Glucane (siehe Abb. 47).

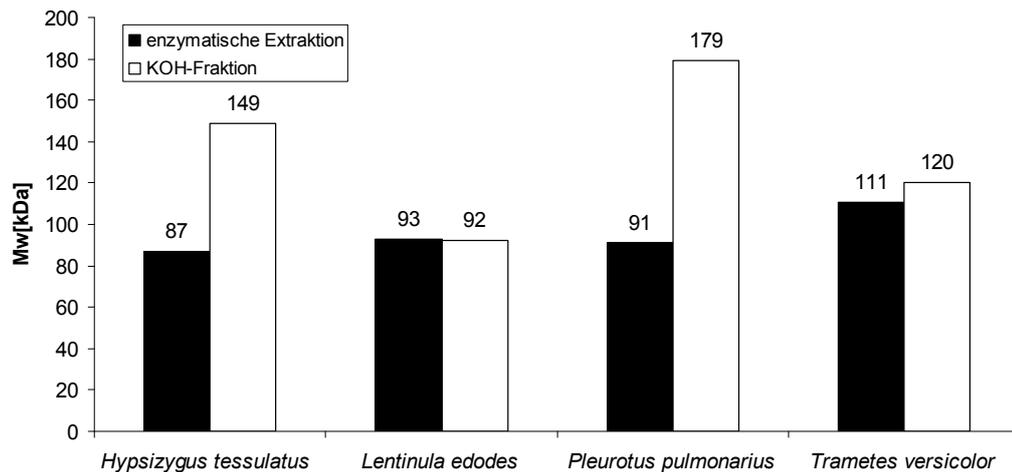


Abb. 47: Vergleich der gewichtsmittleren Molekularmassen.

Die Werte für *Lentinula edodes* und *Trametes versicolor* sind nahezu identisch. Des Weiteren stimmen die Molekularmassen am Peakmaximum überein (siehe 4.4.3). Die enzymatisch extrahierten Glucane weisen eine höhere Polydispersität auf. Dies liegt wahrscheinlich an der Inkubation mit Glucanase, wodurch auch kleinere Moleküle entstehen und isoliert wurden. Bei *Hypsizygyus tessulatus* und *Pleurotus pulmonarius* resultiert dies in niedrigeren Werten für die gewichtsmittlere Molekularmasse. Die Aufnahme der Glucane durch den menschlichen Organismus ist durch die geringe Molekularmasse der enzymatisch gewonnenen Glucane begünstigt. Obwohl hochmolekulare Glucane *in vitro* wirksamer sind, kann dies ein entscheidender Vorteil gegenüber den herkömmlich extrahierten Glucanen sein (Steinbüchel et al. 2002).

Ein weiterer Aspekt im Vergleich der gewonnenen Glucane ist der Anteil der triplehelicalen Glucane. Der genaue Zusammenhang zwischen der ausgebildeten Tertiärstruktur und der Primärstruktur ist zwar nicht ausreichend geklärt (Bohn und BeMiller 1995, Wasser 2002), es wird aber angenommen, dass Seitenketten maßgeblich Einfluss hierauf nehmen (siehe 2.1). Ein Vergleich der Glucane der einzelnen Fraktionen der Literaturmethode mit den enzymatisch isolierten Glucanen ist hier sinnvoll. Insbesondere ist der Vergleich mit den Glucanen der

KOH-Fraktion interessant, da diese eine ähnliche Struktur haben wie die enzymatisch isolierten Glucane. Ein solcher Vergleich ist in Abbildung 48 dargestellt.

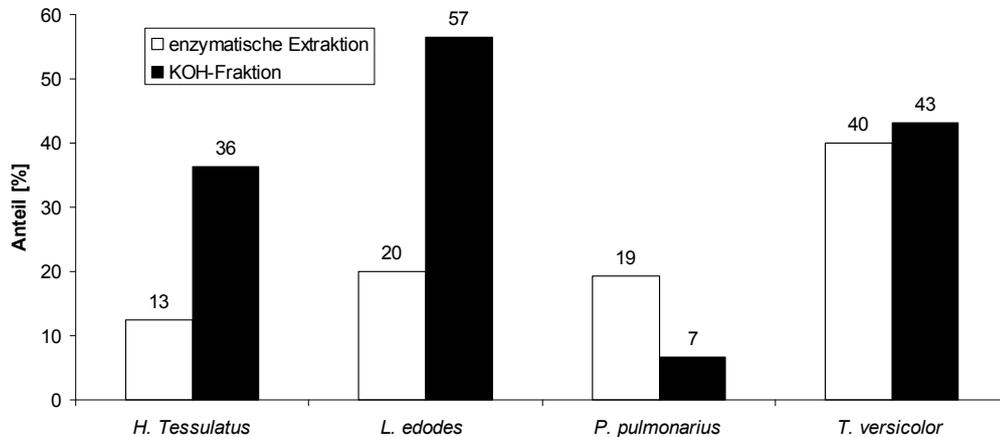


Abb. 48: Vergleich der Anteile an triplehelicalen Glucanen.

Wie in der Abbildung 48 zu erkennen ist, besitzt das enzymatisch extrahierte Glucan aus *Pleurotus pulmonarius* einen höheren Anteil an triplehelicalen Glucanen, während *Trametes versicolor* einen nahezu identischen Anteil wie das entsprechende Glucan der KOH-Fraktion hat. Die Glucane der KOH-Fraktion von *Lentinula edodes* und *Hypsizygyus tessulatus* weisen allerdings deutlich höhere Anteile an Glucanen mit einer Triplehelix auf als die enzymatisch extrahierten Glucane. Somit kann nicht eindeutig gesagt werden, mit welcher Methode ein höherer Anteil an triplehelicalen Glucanen gewonnen werden kann. Die enzymatisch extrahierten Glucane aus *Trametes versicolor* und *Pleurotus pulmonarius* nehmen somit eine besondere Rolle ein. Sie besitzen nicht nur eine ähnliche Primärstruktur wie die Glucane der KOH-Fraktion, sondern auch einen ähnlichen oder höheren Anteil an triplehelicalen Glucanen.

Die Anteile an triplehelicalen Glucanen liegen mit 60-100% in der NaOH-Fraktion allerdings deutlich höher. Es ist wahrscheinlich, dass durch den erwähnten Abbau an Seitenketten, die Ausbildung der Triplehelix als Tertiärstruktur nicht mehr sterisch gehindert ist. Dies führt zu diesen besonders hohen Anteilen an triplehelicalen Glucanen. Bohn und BeMiller (1995) beschreiben, dass erst durch β -1,6-glykosidische Seitenketten ein Glucan eine Triplehelix ausbildet. Somit ist es wahrscheinlich, dass der Abbau der von der Hydrolyse besonders betroffenen α -glykosidisch verknüpften Seitenketten zu einer Zunahme des Anteils an triplehelicalen Glucanen führt.

Der geringe Anteil an triplehelicalen Glucanen bei den enzymatisch extrahierten Glucanen im Vergleich zu den Glucanen aus der NaOH-Fraktion ist möglicherweise ein negatives Qualitätsmerkmal für diese Glucane. Allerdings können andere strukturelle Merkmale möglicherweise sogar einen größeren Einfluss auf die Wirkung als Antikancerogen und Immunstimulanz haben als die triplehelicale Tertiärstruktur. So kann nicht nur das vielfältigere Spektrum an glykosidischen Verknüpfungen und verschiedenen Monosacchariden im Vergleich zu den Glucanen der NaOH-Fraktion eine Rolle spielen, sondern auch der Anteil an gebundenen Proteinen sowie deren Art. Der Proteinanteil ist bei den enzymatisch extrahierten Glucanen etwas höher. Allerdings ist der Zusammenhang zwischen Struktur und Wirkung, besonders in Hinblick auf gebundene Proteine, noch nicht eindeutig geklärt. Hierfür müssten die enzymatisch extrahierten Glucane auf ihre Wirksamkeit getestet werden (siehe 6.). Die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse bestätigen aber, dass die enzymatische Extraktion schonend isoliert. Durch den hohen Anteil an Proteoglycanen konnten interessante Produkte gewonnen werden, die in dieser Form nicht durch herkömmliche Extraktionsmethoden gewonnen werden können (siehe 4.4.1).

Es ist wahrscheinlich, dass eine Hydrolyse, besonders während der Inkubation mit Salzsäure zu strukturellen Veränderungen führt. Die Glucane der NaOH-Fraktion weisen meist eine höhere mittlere Molekularmasse als die anderen Glucane auf (siehe Tab. 30). Hierfür gibt es mehrere mögliche Erklärungen. Zum einen kann die Molekularmasse aufgrund des höheren Anteils an triplehelicalen Glucanen höher sein. Hier lagern sich mehrere Glucane zu einer Triplehelix zusammen, was zu der hohen Molekularmasse führt. Zum anderen kann durch die geringere Seitenverknüpfung die Löslichkeit der Glucane mit hoher Molekularmasse gesteigert sein. Leider ist der Zusammenhang zwischen Struktur und Löslichkeit der Glucane ebenfalls noch nicht ausreichend geklärt. Es ist allerdings bekannt, dass Glucane mit geringerer Molekularmasse besser löslich sind (Zhang et al. 2005, Wasser 2010). Auch diese bessere Löslichkeit der Glucane, besonders unter physiologischen Bedingungen, spielt eine Rolle bei der Bewertung der enzymatisch extrahierten Glucane.

Vergleichend wurden zusätzlich zwei Glucane analysiert, die aus Fruchtkörpern mittels der Literaturmethode extrahiert wurden. Die Ergebnisse der Strukturanalyse dieser Glucane sind in Tabelle 31 zusammengefasst.

Tab. 31: Zusammenfassung der strukturanalytischen Charakterisierung der aus den Fruchtkörpern isolierten Glucane.

Probe (Extraktionsart)	Typ	Monosaccharid-zusammensetzung	Mw [kDa]	Q	Triple-helix [%]
<i>Lentinula edodes</i> (Lit. KOH)	α -1,4-1,6- β -1,6-Glucan	Man, Glc, Gal	76	5,3	96
<i>Lentinula edodes</i> (Lit. NaOH)	α -1,4- β -1,3-1,6-Glucan	Man, Glc, Gal	137	5,7	100
<i>Pleurotus ostreatus</i> (Lit. KOH)	α -1,4-1,6- β -1,3-1,6-Glucan	Rha, Rib, Man, Glc, Gal	154	2,5	96
<i>Pleurotus ostreatus</i> (Lit. NaOH)	β -1,6-Glucan	Man, Glc, Gal	156	4,7	100

Aus den Fruchtkörpern konnten hinsichtlich der glykosidischen Bindungen, Monosaccharidzusammensetzungen und Molekularmassen ähnliche Glucane wie aus den Mycelien isoliert werden. Im Monosaccharidspektrum des Glucans der KOH-Fraktion von *Pleurotus ostreatus* konnte allerdings in Spuren Rhamnose und Ribose nachgewiesen werden. Diese Monosaccharide konnten in anderen Proben nicht gefunden werden. Auffällig ist außerdem der hohe Anteil an triplehelicalen Glucanen. Der Anteil dieser Tertiärstruktur beträgt auch bei den Glucanen, die durch KOH extrahiert wurden, > 96%. Das bedeutet, dass im Fruchtkörper nahezu ausschließlich triplehelicale Glucane zu finden sind. Der Fruchtkörper ist wie erwähnt zahlreichen Umweltfaktoren ausgesetzt. Ein höherer Anteil triplehelicaler Glucane führt zu einer zusätzlichen Stabilisierung der Zellwand. Die enzymatische Extraktion konnte bei den verwendeten Fruchtkörpern nicht durchgeführt werden. Es ist davon auszugehen, dass triplehelicale Glucane für die β -Glucanase schwerer zugänglich sind. Des Weiteren könnte ein stärkeres „Cross-Linking“ mit der Chitinmatrix die enzymatische Extraktion auch behindern. Das Mycel stellt aufgrund der einfachen Kultivierung einen interessanteren Rohstoff zur Glucangewinnung dar. Auch wenn höhere Anteile triplehelicaler Glucane aus Fruchtkörpern gewonnen werden konnten, sind die Glucane aus Mycelien strukturell sehr ähnlich. Das Mycel wird in der Regel nicht zur Gewinnung von Glucanen genutzt (siehe 2.1 ff.). Nahezu alle Literaturmethoden beschreiben die Extraktion aus Fruchtkörpern. Die enzymatische Extraktion ist speziell für die Gewinnung von Glucanen aus Mycelien entwickelt worden. Die vorgestellte Methode nutzt also erstmals vorrangig diese als

Ressource zur Glucanextraktion. Damit stellen das Extraktionsverfahren und die Nutzung des Mycels eine Besonderheit dieses Verfahrens dar.

Die Limitierung der enzymatischen Extraktion auf wenige Mycelien beschränkt das Spektrum potentieller Glucanprodukte allerdings stark. In dieser Arbeit konnten nur aus den Mycelien von *Trametes versicolor*, *Lentinula edodes*, *Pleurotus pulmonarius* und *Hypsizygus tessulatus* Glucane isoliert werden. Dies kann zahlreiche Ursachen haben wie zum Beispiel eine zu geringe Substratspezifität der verwendeten Enzyme zu den im Zellmaterial vorliegenden Substraten. Der Grund hierfür könnte sein, dass bestimmte Proteine am Substrat gebunden sind und die enzymatische Katalyse inhibieren. Zum anderen könnte die Verknüpfung der Glucane innerhalb der Zellwandmatrix diese für die Extraktion schwer zugänglich machen.

Wie bereits diskutiert, konnten mit der neuartigen enzymatischen Extraktionsmethode nicht ganz die Ausbeuten der Literaturmethode erzielt werden. Allerdings konnten strukturell ähnliche Glucane wie sie auch mit dem ersten Extraktionsschritt der Literaturmethode (KOH-Fraktion) isoliert wurden, durch die enzymatische Extraktion gewonnen werden. Hier übersteigen die Ausbeuten sogar die des KOH-Extraktionsschrittes der Literaturmethode. Die Ergebnisse der Strukturanalytik zeigten des Weiteren, dass durch die alleinige Extraktion mit Kalilauge hochverzweigte Glucane isoliert werden. Somit ist dieser Schritt ähnlich schonend für die Glucanstruktur wie die enzymatische Extraktion. Da die Ausbeuten der enzymatischen Extraktion höher sind, ist dieses Verfahren in Bezug auf eine schonende Extraktion effektiver. Es ließ sich demnach mit der enzymatischen Extraktionsmethode erstmals eine schonende und effektive Extraktionsmethode entwickeln. Neben dem Vergleich der Primärstruktur ist zur Bewertung der enzymatischen Extraktionsmethode auch ein Vergleich der Tertiärstrukturen wichtig. Hierzu wurden wie beschrieben die Anteile an triplehelicalen Glucanen in den Proben beider Methoden bestimmt. Der Vergleich der Ausbeuten an triplehelicalen Glucanen ist in Abbildung 49 dargestellt.

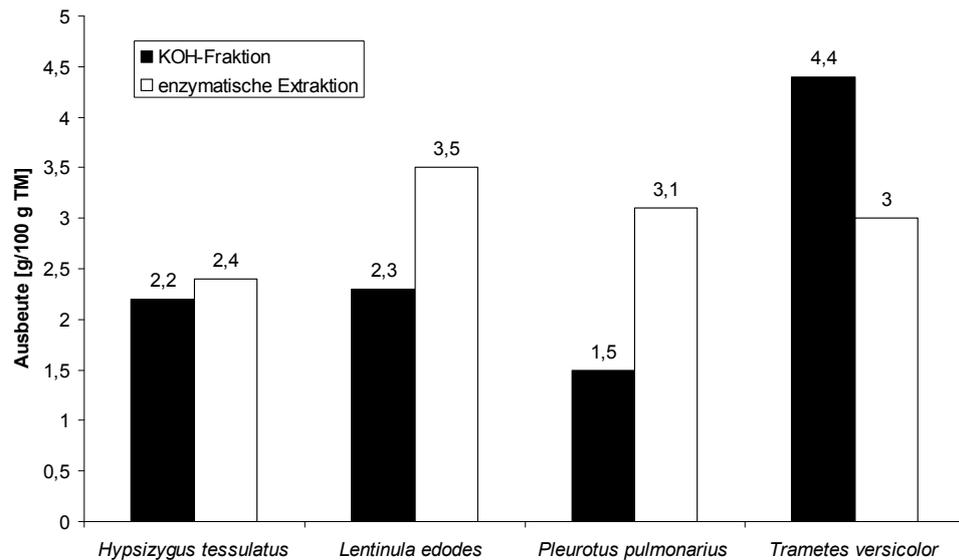


Abb. 49: Vergleich der Ausbeuten der enzymatischen Extraktion mit den Gehalten der KOH-Fraktion der Literaturmethode.

Die Ausbeuten der enzymatischen Extraktion sind mit Ausnahme von *Trametes versicolor* höher als bei der KOH-Fraktion der Literaturmethode. Es konnten somit durch die innovative enzymatische Methode strukturell vergleichbare Glucane in akzeptablen Ausbeuten isoliert werden. Hierbei handelt es sich ausschließlich um Glucane aus den schnell nachwachsenden Mycelien. Diese sind eine interessante Quelle für β -Glucane. Bezieht man zu den oben diskutierten Ergebnissen zusätzlich die Wachstumseigenschaften mit ein, kann auch das Potential der jeweiligen Mycelien als Rohstoff abgeschätzt werden. Hinsichtlich der Wachstumseigenschaften und Ausbeuten scheinen besonders die Mycelien von *Trametes versicolor* und *Pleurotus pulmonarius* geeignet zu sein. Hier konnten größere Mengen Glucane enzymatisch isoliert werden. Zudem zeigen diese Spezies auf dem gewählten Nährmedium die besten Wachstumseigenschaften. Aber auch *Hypsizygos tessulatus* ist als Ressource denkbar. Die Wachstumseigenschaften sind zwar nicht so gut wie bei *Trametes versicolor* und *Pleurotus pulmonarius*, allerdings kann aus dieser Spezies ein Glucan isoliert werden, das sich im Hinblick auf seine Monosaccharidzusammensetzung deutlich von den anderen Glucanen unterscheidet. Das Mycel von *Lentinula edodes* besitzt sehr schlechte Wachstumseigenschaften auf dem gewählten Nährmedium. Um es zur effizienten Extraktion von Glucanen zu nutzen, müsste das Medium maßgeblich optimiert werden. Aufgrund der hohen Bekanntheit des Pilzes ist dies ein interessanter Ansatz für weitere Arbeiten (siehe 6.). Die Mycelien stellen wie

die Ergebnisse zeigen für die Glucanextraktion eine Alternative zu den Fruchtkörpern dar. Diese Alternative konnte in der vorliegenden Arbeit durch die Entwicklung der speziell für Mycelien angepassten enzymatischen Extraktionsmethode genutzt werden. Damit steht die enzymatische Methode im Gegensatz zu den meisten Literaturverfahren, die Fruchtkörper nutzen.

Abschließend ist zu sagen, dass mit der neuen enzymatischen Extraktion eine Alternative zu den konventionellen Methoden entwickelt wurde. Allerdings ist, wie die Ergebnisse zeigen, die Auswahl geeigneter Zellmaterialien zum jetzigen Zeitpunkt beschränkt.

Der Vergleich mit einer ausgewählten Literaturmethode zeigt deutlich das Potential der neuartigen Extraktionsmethode. Die Ergebnisse, die bei der Untersuchung der Literaturmethode erhalten wurden, zeigen außerdem, dass diese Art von Extraktion zu einer Degradation der Produkte führt. Die durch die Inkubation mit Salzsäure und Natronlauge induzierte Hydrolyse verändert die erhaltenen Produkte maßgeblich. Nur durch die alleinige Extraktion mit KOH können vergleichbare Glucane wie bei der enzymatischen Extraktion gewonnen werden. Die Ausbeuten der enzymatischen Extraktion übertrafen meist die Ausbeuten der KOH-Fraktion. Somit steht mit der in dieser Arbeit entwickelten Methode eine Alternative zu herkömmlichen Extraktionsmethoden zu Verfügung, mit deren Hilfe Glucane unter Erhalt ihrer Struktur weitestgehend extrahiert werden können.

6. Ausblick

In dieser Arbeit wurde eine enzymatische Extraktionsmethode zur Isolierung von β -Glucanen aus verschiedenen Zellmaterialien im Labormaßstab konzipiert und realisiert. Zum jetzigen Zeitpunkt können mit dieser Methode β -Glucane aus wenigen Mycelien isoliert werden. Die Extraktion aus weiteren Mycelien oder aus Fruchtkörpern ist bis zum jetzigen Zeitpunkt nicht möglich. Aufbauend auf der vorliegende Arbeit könnten weitere Spezies analysiert und erprobt werden und womöglich zu neuen interessanten Glucanprodukten führen. Durch Modifikationen der hier vorgestellten Methode könnten ebenfalls Glucane aus den Zellmaterialien isoliert werden, bei denen eine enzymatische Extraktion zurzeit nicht möglich ist. Es ist denkbar, dass aus diesen Zellmaterialien durch die Veränderung der Extraktionsbedingungen aber auch durch eine Vorbehandlung der Probe Glucane isoliert werden können. Die verschiedenen in dieser Arbeit erprobten Vorbehandlungen, wie zum Beispiel eine Proteasebehandlung konnten keine positiven Effekte hinsichtlich der Ausbeuten erzielen. Allerdings könnten andere Vorbehandlungen wie eine Inkubation mit speziellen Lyasen oder ähnlichen Enzymen die Ausbeuten steigern oder die enzymatische Extraktion überhaupt möglich machen. Auch eine chemische Vorbehandlung mit milden Reagenzien ist denkbar.

Neben den hier genannten Optimierungen und Modifizierungen ist die Umsetzung der enzymatischen Extraktionsmethode in größeren Maßstab ein wichtiger Schritt zur Etablierung der enzymatisch extrahierten Glucane. Die Entwicklung eines entsprechenden Prozesses kann mitunter erhebliche Modifikationen nötig machen, die weitere Analysen benötigen. Durch die Umsetzung der Methode in größeren Versuchsreaktoren könnten die so gewonnenen Glucane auch durch die in dieser Arbeit bestätigten Vorteile, wirtschaftlich durchaus interessant sein.

Die Verwendung von Mycelien hat wie bereits erläutert einige Vorteile gegenüber der Verwendung von Fruchtkörpern. Allerdings wachsen einige Mycelien nur sehr langsam auf den untersuchten Nährböden. So wies zum Beispiel das Mycelium des bekannten Speisepilzes *Leninula edodes* ein sehr geringes Wachstum auf.

Da aus diesem Pilz enzymatisch ein Glucan isoliert werden konnte, ist die Erprobung anderer Nährmedien beziehungsweise die Optimierung dieser von besonderem Interesse.

In der hier vorgestellten Arbeit wurden erstmals enzymatisch isolierte Glucane hinsichtlich ihrer Struktur charakterisiert. Auf diese Ergebnisse aufbauend sind weitere strukturelle Analysen denkbar, die die gewonnenen Daten verifizieren und weiteren Aufschluss über die Struktur geben können. Mit Hilfe einer Methylierungsanalyse können die mittels NMR-Spektroskopie charakterisierten glykosidischen Verknüpfungen bestätigt werden. Des Weiteren ist es mit dieser Analyse möglich, die Verhältnisse der einzelnen Bindungen zueinander und den Grad der Verknüpfung zu bestimmen (Sasaki und Takasuka 1975, Rout et al. 2005, Cabanero et al. 2006, Rhee et al. 2008). Unterstützend zu dieser Methode kann wie in der Literatur beschrieben ein gezielter Smith-Abbau durchgeführt werden. Die durch den Smith-Abbau entstandenen Produkte können anschließend gaschromatographisch erfasst werden (Sasaki und Takasuka 1975, Rout et al. 2005, Cabanero et al. 2006, Rhee et al. 2008). Allerdings sind auch Untersuchungen mit Verfahren wie der MALDI-TOF-MS (Matrix-assisted laser desorption/ionization-time of fly-Massenspektroskopie) möglich, die zum jetzigen Zeitpunkt für β -Glucane adaptiert werden (Gosch et al. 2008, Jiang und Vasanthan 2011). Diese Methode müsste allerdings für die entsprechend zu untersuchenden Proben angepasst werden. Die weiteren strukturanalytischen Daten ermöglichen in Verbindung mit den in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnissen eine nahezu vollständige Charakterisierung der Struktur.

Die Strukturaufklärung ist nur ein erster Schritt bei der Beurteilung der in dieser Arbeit isolierten Glucane. Aufbauend auf den hier gewonnenen Erkenntnissen ist eine empirische Untersuchung der Wirkung der Glucane von außerordentlicher Bedeutung, da die mögliche Wirkung aufgrund der Struktur nur abgeschätzt werden kann. Durch wirkungsspezifische Tests lässt sich das Potential der enzymatisch gewonnenen Glucane im Vergleich zu anderen Glucanen zum Beispiel jenen, die mit der Literaturmethode gewonnen wurden, beurteilen. Hierbei stehen verschiedenste *in vivo* und *in vitro* Tests zur Verfügung (Wasser 1999, Kidd et al. 2000, Daba und Enzeronye 2003, Zhang et al. 2007). Dies ist aber eine andere Thematik und benötigt zeitaufwendige Untersuchungen.

7. Zusammenfassung

β -Glucane aus Basidiomycetes und Ascomycetes sind bekannt für ihre Wirkung als „Biological Response Modifier“. Aktuell angewandte Extraktionsmethoden führen zu einer partiellen Degradation der nativen Struktur. Ein alternativer Extraktionsprozess für diese Glucane ist deswegen von besonderem Interesse. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde eine enzymatische Extraktionsmethode entwickelt. Dabei konnte ein Prozess realisiert werden, der in Kombination von enzymatischen und milden alkalischen Extraktionsschritten, β -Glucane aus dem Zellmaterial zu isolieren gestattet. Hierbei erfolgt die schrittweise Extraktion durch Inkubation mit Chitinase und β -Glucanase, jeweils gefolgt von einer milden Extraktion mit verdünnter Natronlauge. Durch eine speziell entwickelte Bestimmungsmethode für Chitin konnte die eingesetzte Substratmenge für die Chitinase genau kontrolliert und gesteuert werden.

Zum jetzigen Zeitpunkt ist die enzymatische Extraktion von Glucanen nur aus wenigen ausgewählten Mycelien möglich. Aus Fruchtkörpern konnten mit dieser Methode keine Glucane isoliert werden. Allerdings besitzen Mycelien aufgrund ihres schnellen Wachstums ein großes Potential als Ressource für β -Glucane, da sie einfacher als die jeweiligen Fruchtkörper kultiviert werden können.

Die entwickelte enzymatische Methode wurde mit einer in der Literatur beschriebenen Extraktionsmethode hinsichtlich ihrer Ausbeuten und der Struktur der erhaltenen Glucanprodukte verglichen. Dies ermöglicht eine genaue Beurteilung, ob die neue Extraktionsmethode ähnlich effektiv ist.

Mit Hilfe der in dieser Arbeit speziell entwickelten bzw. optimierten analytischen Bestimmungsmethoden konnten die Ausbeuten an Gesamt- β -Glucanen und der Anteil der wichtigen triplehelicalen Glucane ermittelt werden. Es konnten für die enzymatische Extraktionsmethode Gesamt- β -Glucan ausbeuten in Höhe von 1,4-3,5 g/100 g Trockenmasse bestimmt werden. Der Anteil an Glucanen mit einer Triplehelix liegt bei 13-43% des Gesamt- β -Glucangehaltes. Im Vergleich sind die erzielten Ausbeuten etwas geringer als bei der Literaturmethode, wo Ausbeuten von 2,5-6,8 g/100 g Trockenmasse erzielt wurden. In Verbindung mit den bestimmten Wachstumsraten kann zusätzlich die Nutzungsmöglichkeit verschiedener Mycelien als Ressource zur β -Glucangewinnung abgeschätzt

werden. Hier scheinen besonders *Trametes versicolor*, *Pleurotus pulmonarius* und *Hypsizygos tessulatus* großes Potential zu besitzen.

Mithilfe der durchgeführten strukturanalytischen Bestimmungen (NMR, Bestimmung der Monosaccharidzusammensetzung und GPC) konnten die durch die enzymatische Extraktion isolierten typischen β -1,3-1,6-verknüpften Glucane identifiziert werden. Darüber hinaus wurden verschiedene weitere α - und β -glykosidische Bindungen charakterisiert. Neben dem Hauptmonosaccharid Glucose konnten in größeren Mengen Galactose, Mannose und in Spuren Fucose, Ribose, Rhamnose, Arabinose und Xylose als Bausteine der Glucane identifiziert werden. Die gewichtsmittleren Molekularmassen der enzymatisch isolierten Glucane liegen zwischen 87-111 kDa. Vergleichende Untersuchungen der Glucane, die mit der Literaturmethode extrahiert wurden, haben gezeigt, dass im Rahmen der dort angewandten Extraktionsschritte eine strukturelle Degradation abläuft. Durch den ersten Extraktionsschritt der Literaturmethode, einer Inkubation mit Kalilauge, konnten strukturell den enzymatisch extrahierten Glucanen ähnliche Produkte isoliert werden. Offensichtlich werden Seitenketten bei dem darauf folgenden sauren Extraktionsschritt hydrolysiert. Die durch die enzymatische Extraktion gewonnenen Glucane sind somit eine sehr gute Alternative zu den herkömmlich gewonnenen Glucanen.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die für diese Arbeit formulierten Ziele mit der Entwicklung einer schonenden enzymatischen Extraktionsmethode realisiert werden konnten.

8. Summary

Mushroom β -glucans are known for their activity as 'biological response modifiers' and anticarcinogenic agents. β -1,3-1,6 branched glucans with a triple helix as their tertiary structure are the most potent glucans. Current methods for the extraction of these polysaccharides are based on a combination of alkaline and acid treatment under high temperature conditions. This treatment leads to a partial degradation and denaturation of the primary and tertiary structure of the glucans. In the present work a new enzymatic extraction method for β -glucans was developed. It is based on various enzymatic extractions with chitinase, β -glucanase and furthermore with mild alkaline extractions. Primarily, this method was developed for the extraction of mushroom mycelia. The use of the fast growing mushroom mycelia as a resource for glucan isolation is newish and seems to be efficient. Until now, glucans were mainly isolated from the mushroom fruiting bodies. The growth kinetics from different mycelia show that especially species like *Trametes versicolor*, *Pleurotus pulmonarius* and *Hypsizygus tessulatus* have great potential as a fast growing resource for β -glucans.

Furthermore, it was of interest to quantify the chitin content in the various mushrooms and especially in the mycels. Therefore, a new method for the quantification of this cell substance was developed. With a specific method for chitin extraction and determination the ratio of chitin and chitinase could accurately be detected.

For further evaluation, the new enzymatic extraction was compared to the method of Sietsma and Wessels (1977). This method is a common process to isolate β -glucans. Therefore, the comparison of the glucan yields and glucan structures is essential to validate the new enzymatic extraction method. With two new and optimized quantification methods the yields of the total- β -glucans and the glucans with a triple helix tertiary structure were determined. The results showed that 1.4-3.5 g total- β -glucans per 100 g dry mass could be isolated from the mushroom mycelia by the new enzymatic method. The amount of triple helical glucans was 13-43%. The yield of total- β -glucans isolated with the method of Sietsma and Wessels (1977) was a little bit higher (2.5-6.8 g/100 g).

The structural analysis with GPC, GC and NMR of the enzymatic isolated glucans revealed the typical β -1,3-1,6-glycosidic linkages. However, other α - and β -glykosidic linkages were determined, too. The main monosaccharide was glucose, followed by galactose, mannose and traces of fucose, ribose, rhamnose, arabinose und xylose. The average molecular mass was 87-111 kDa. In contrary, the structural analysis of the glucans isolated by the method of Sietsma and Wessels (1977) showed that a structural degradation occurs during the extraction process.

The method of Sietsma and Wessels (1977) is based on a combination of isolation steps with potassium hydroxide, chloric acid and sodium hydroxide. Especially the heat extraction of the cell walls with chloric acid and sodium hydroxide leads to a hydrolysis of polysaccharide side chains. This hydrolysis may affect the medical potential of the glucans.

But this hydrolysis was not observed, when using the new enzymatic extraction method. Thus, the glucans were isolated under preservation of their structure with a potential positive effect on their therapeutic activity.

All results of these experiments give essential support for the effective isolation of glucans based on the new enzymatic extraction method. This may have impact on the various applications of glucans.

9. Literatur

1. Blakeney, A.B., Harris, P.J., Henry, R.J., Stone, B.A. A simple and rapid preparation of alditol acetates for monosaccharide analysis. *Carbohydrate Research* **113**, 291-299 (1983).
2. Bohn, J.A., BeMiller, J.N. (1→3)-β-Glucans as biological response modifiers: a review of structure-functional activity relationships. *Carbohydrate Polymers* **28**, 3-14 (1995).
3. Boyle, D. Nutritional factors limiting the growth of *Lentinula edodes* and other white-rot fungi in wood. *Soil Biology and Biochemistry* **30**, 817-823 (1998).
4. Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**, 248-254 (1976).
5. Brauer, D., Kimmons, T., Phillips, M. Comparison of Two Methods for the Quantitation of β-Glucans from Shiitake Mushrooms. *Journal of Herbs, Spices, Medicinal Plants* **13**, 15-26 (2007).
6. Busch, E., Rekowski, R., Mölleken, H. Speisepilze mit medizinisch wirksamen Inhaltsstoffen. *Zeitschrift für Phytotherapie* **28**, 115-123 (2007) (a).
7. Busch, E., Wantoch von Rekowski, R., Mölleken, H. Aktuelle Inhaltstoffe aus höheren Pilzen in der wissenschaftlichen Forschung zu Immunsystem und Stoffwechsel. *Zeitschrift für Phytotherapie* **28**, 223-229 (2007) (b).
8. Carbonero, E.R., Gracher, A.H.P., Smiderle, F.R., Rosado, F.R., Sasaki, G.L., Gorin, P.A.J., Iacomini, M. A β-glucan from the fruit bodies of edible mushrooms *Pleurotus eryngii* and *Pleurotus ostreatoroseus*. *Carbohydrate Polymers* **66**, 252-257 (2006).
9. Chakraborty, I., Mondal, S., Rout, D., Islam, S.S. A water-insoluble (1→3)-β-D-glucan from the alkaline extract of an edible mushroom *Termitomyces eurhizus*. *Carbohydrate Research* **341**, 2990-2993 (2006).
10. Chen, J., Seviour, R. Medicinal importance of fungal β-(1→3), (1→6)-glucans. *Mycological Research* **111**, 635-652 (2007).

11. Chen, K., Lee, K., Chen, H. A rapid method for detection of N-acetylglucosaminidase-type chitinase activity in crossed immunoelectrophoresis and sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis gels using 4-methylumbelliferyl-N-acetyl-D-glucosaminide as substrate. *Electrophoresis* **15**, 662-665 (1994).
12. Chenghua, D., Xiangliang, Y., Xiaoman, G., Yan, W., Jingyan, Z., Huibi, X. A β -glucan from the sclerotia of *Pleurotus tuber-regium* (Fr.) Sing. *Carbohydrate Research* **328**, 629-633 (2000).
13. Cheung, P.C. Dietary Fiber Content and Composition of Some Cultivated Edible Mushroom Fruiting Bodies and Mycelia. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **44**, 468-471 (1996).
14. Chihara, G., Hamuro, J., Maeda, Y.Y., Arai, Y., Fukuoka, F. Fractionation and Purification of the Polysaccharides with Marked Antitumor Activity, Especially Lentinan, from *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. (an Edible Mushroom). *Cancer Research* **30**, 2776-2781 (1970).
15. Chihara, G., Maeda, Y., Hamuro, J., Sasaki, T., Fukuoka, F. Inhibition of Mouse Sarcoma 180 by Polysaccharides from *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. *Nature* **222**, 687-688 (1969).
16. Cho, S.M., Park, J.S., Kim, K.P., Cha, D.Y., Kim, H.M., Yoo, I.D. Chemical features and purification of immunostimulating polysaccharides from the fruit bodies of *Agaricus blazei*. *The Korean Journal of Mycology* **27**, 170-174 (1999).
17. Cho, S.M., Yun, B.S., Yoo, I.D., Koshino, H. Structure of fomitellan A, a mannofucogalactan from the fruiting bodies of *Fomitella fraxinea*. *Bioorganic, Medicinal Chemistry Letters* **21**, 204-206 (2011).
18. Cleary, J.A., Kelly, G.E., Husband, A.J. The effect of molecular weight and β -1,6-linkages on priming of macrophage function in mice by (1,3)- β -D-glucan. *Immunology and Cell Biology* **77**, 395-403 (1999).
19. Cui, J., Chisti, Y. Polysaccharopeptides of *Coriolus versicolor*: physiological activity, uses, and production. *Biotechnology Advances* **21**, 109-122 (2003).
20. Daba, A.S., Ezeronye, O.U. Minireview: Anti-cancer effect of polysaccharides isolated from higher basidiomycetes mushrooms. *African Journal of Biotechnology* **2**, 12 (2003).
21. Dijkstra, F.I., Scheffers, W.A., Wikén, T.O. Submerged growth of the cultivated mushroom, *Agaricus bisporus*. *Antonie van Leeuwenhoek* **38**, 329-340 (1972).
22. Dikeman, C.L., Bauer, L.L., Flickinger, E.A., Fahey, G.C. Effects of Stage of Maturity and Cooking on the Chemical Composition of Select Mushroom Varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53**, 1130-1138 (2005).

23. Freimund, S., Sauter, M., Käppeli, O., Dutler, H. A new non-degrading isolation process for 1,3- β -glucan of high purity from baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Carbohydrate Polymers* **54**, 159-171 (2003).
24. Ghosh, K., Chandra, K., Ojha, A.K., Islam, S.S. NMR and MALDI-TOF analysis of a water-soluble glucan from an edible mushroom, *Volvariella diplasia*. *Carbohydrate Research* **343**, 2834-2840 (2008).
25. Gonzaga, M.L., Ricardo, N., Heatley, F., Soares, S. Isolation and characterization of polysaccharides from *Agaricus blazei* Murill. *Carbohydrate Polymers* **60**, 43-49 (2005).
26. Guthrie, J.L., Khalif, S., Castle, A.J. An improved method for detection and quantification of chitinase activities. *Canadian Journal of Microbiology* **51**, 491-495 (2005).
27. Gutiérrez, A., Prieto, A., Martínez, A.T. Structural characterization of extracellular polysaccharides produced by fungi from the genus *Pleurotus*. *Carbohydrate Research* **281**, 143-154 (1996).
28. Hara, C., Kiho, T., Tanaka, Y., Ukai, S. Anti-inflammatory activity and conformational behavior of a branched (1 \rightarrow 3)- β -D-glucan from an alkaline extract of *Dictyophora indusiata* fisch. *Carbohydrate Research* **110**, 77-87 (1982).
29. Huber, W. Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze nach DIN 32 645. *Vom Wasser* **80**, 7-13 (1993).
30. Iino, K., Ohno, N., Suzuki, I., Miyazaki, T., Yadomae, T., Oikawa, S., Sato, K. Structural characterisation of a neutral antitumour β -D-glucan extracted with hot sodium hydroxide from cultured fruit bodies of *Grifola frondosa*. *Carbohydrate Research* **141**, 111-119 (1985).
31. Jiang, G., Vasanthan, T. MALDI-MS and HPLC Quantification of Oligosaccharides of Lichenase-Hydrolyzed Water-Soluble β -Glucan from Ten Barley Varieties. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* **48**, 3305-3310 (2011).
32. Johnson, B.R., Chen, G.C. Occurrence and Inhibition of Chitin in Cell Walls of Wood-Decay Fungi. *Holzforschung* **37**, 255-259 (1983).
33. Kannan, M., Nesakumari, M., Rajarathinam, K., Singh, A.J.A. Production and Characterization of Mushroom Chitosan under Solid-State Fermentation Conditions. *Advances in Biological Research* **4**, 10-13 (2010).
34. Karácsonyi, S., Kuniak, L. Polysaccharides of *Pleurotus ostreatus*: Isolation and structure of pleuran, an alkali-insoluble β -D-glucan. *Carbohydrate Polymers* **24**, 107-111 (1994).
35. Kidd, P.M. The use of mushroom glucans and proteoglycans in cancer treatment. *Alternative Medicine Review* **5**, 4-27 (2000).

36. Kiho, T., Tanaka, Y., Ukai, S., Hara, C. Anti-inflammatory activity and conformational behavior of a branched (1→3)- β -D-glucan from an alkaline extract of *Dictyophora indusiata* Fisch. *Carbohydrate Research* **110**, 77-87 (1982).
37. Kiho, T., Katsurawaga, M., Nagai, K., Ukai, S., Haga, M. Structure and antitumor activity of a branched (1→3)- β -D-glucan from the alkaline extract of *Amanita muscaria*. *Carbohydrate Research* **224**, 237-243 (1992).
38. Kim, S.W., Hwang, H.J., Park, J.P., Cho, Y.J., Song, C.H., Yun, J.W. Mycelial growth and exo-biopolymer production by submerged culture of various edible mushrooms under different media. *Letters in Applied Microbiology* **34**, 56-61 (2002).
39. Kim, Y.T., Kim, E.H., Cheong, C., Williams, D.L., Kim, C.W., Lim, S.T. Structural characterization of β -D-(1→3, 1→6)-linked glucans using NMR spectroscopy. *Carbohydrate Research* **328**, 331-341 (2000).
40. Ko, Y.T., Lin, Y.L. 1,3- β -Glucan Quantification by a Fluorescence Microassay and Analysis of Its Distribution in Foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **52**, 3313-3318 (2004).
41. Kromidas, S. *Validierung in der Analytik*. (Wiley-VCH: 1999).
42. Kulicke, W.M., Lettau, A.I., Thielking, H. Correlation between immunological activity, molar mass, and molecular structure of different (1→3)- β -glucans. *Carbohydrate Research* **297**, 135-143 (1997).
43. Larionova, N.I., Zubaerova, D.K., Guranda, D.T., Pechyonkin, M.A., Balabushevich, N.G. Colorimetric assay of chitosan in presence of proteins and polyelectrolytes by using o-phthalaldehyde. *Carbohydrate Polymers* **75**, 724-727 (2009).
44. Laroche, C., Michaud, P. New Developments and Prospective Applications for β -(1,3) Glucans. *Recent Patents on Biotechnology* **1**, 1872-2083 (2007).
45. Leung, M.Y.K., Fung, K.P., Choy, Y.M. The isolation and characterization of an immunomodulatory and anti-tumor polysaccharide preparation from *Flammulina velutipes*. *Immunopharmacology* **35**, 255-263 (1997).
46. Liu, G.Q., Han, W.J., Zhang, H.Y., Jin, X.C. Polysaccharides extraction from submerged-cultured mycelium of *Grifola frondosa*. *Bioinformatics and Biomedical Technology (ICBBT), 2010 International Conference*, 111-114 (2010).
47. Liu, X.Y., Wang, Q., Cui, S.W., Liu, H.Z. A new isolation method of β -D-glucans from spent yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Hydrocolloids* **22**, 239-247 (2008).

48. Lo, T.C., Tsao, H.H., Wang, A.Y., Chang, C.A. Pressurized Water Extraction of Polysaccharides as Secondary Metabolites from *Lentinula edodes*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **55**, 4196-4201 (2007).
49. Ma, Y., Mizuno, T., Ito, H. Antitumor Activity of Some Polysaccharides Isolated from a Chinese Mushroom, „Huangmo“, the Fruiting Body of *Hohenbuehelia serotina*. *Agricultural and biological chemistry* **55**, 2701-2710 (1991).
50. Maeda, Y.Y., Watanabe, S.T., Chihara, C., Rokutanda, M. Denaturation and Renaturation of a β -1,6;1,3-Glucan, Lentinan, Associated with Expression of T-Cell-mediated Responses. *Cancer Research* **48**, 671 -675 (1988).
51. Maity, K.K., Patra, S., Dey, B., Bhunia, S.K., Mandal, S., Das, D., Majumdar, D.K., Maiti, S., Maiti, T.K., Islam, S.S. A heteropolysaccharide from aqueous extract of an edible mushroom, *Pleurotus ostreatus* cultivar: structural and biological studies. *Carbohydrate Research* **346**, 366-372 (2011).
52. Mandel, J. *The statistical analysis of experimental data*. (Courier Dover Publications: 1984).
53. Mantovani, M.S., Bellini, M.F., Angeli, J.P.F., Oliveira, R.J., Silva, A.F., Ribeiro, L.R. β -Glucans in promoting health: Prevention against mutation and cancer. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* **658**, 154-161 (2008).
54. Manzi, P., Aguzzi, A., Pizzoferrato, L. Nutritional value of mushrooms widely consumed in Italy. *Food Chemistry* **73**, 321-325 (2001).
55. Manzi, P., Pizzoferrato, L. β -glucans in edible mushrooms. *Food Chemistry* **68**, 315-318 (2000).
56. Mizuno, M., Morimoto, M., Minato, K., Tsuchida, H. Polysaccharides from *Agaricus blazei* stimulate lymphocyte T-cell subsets in mice. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **62**, 434-437 (1998).
57. Mizuno, M., Minato, K.I., Kawakami, S., Tatsuoka, S., Denpo, Y., Tsuchida, H. Contents of anti-tumor polysaccharides in certain mushrooms and their immunomodulating activities. *Food Science and Technology Research* **7**, 31-34 (2001).
58. Mizuno, T. The extraction and development of antitumor-active polysaccharides from medicinal mushrooms in Japan. *International Journal of Medicinal Mushrooms* **1**, 9-29 (1999).
59. Mizuno, T., Hagiwara, T., Nakamura T., Tro, H., Shimura, K., Sumiya, T., Asakura, A. Antitumor Activity and Some Properties of Water-soluble Polysaccharides from „Himematsutake“, the Fruiting Body of *Agaricus blazei* Murill. *Agricultural and biological chemistry* **54**, 2889-2896 (1990).

60. Mondal, S., Chakraborty, I., Rout, D., Islam, S.S., Pramanik, M. Structural investigation of a polysaccharide (Fr. II) isolated from the aqueous extract of an edible mushroom, *Pleurotus sajor-caju*. *Carbohydrate Research* **340**, 629-636
61. Monteiro, M.A., Slavic, D., St. Michael, F., Brisson, J.R., MacInnes, J.I., Perry, M.B. The first description of a (1→6)-β-D-glucan in prokaryotes: (1→6)-β-D-glucan is a common component of *actinobacillus suis* and is the basis for a serotyping system. *Carbohydrate Research* **329**, 121-130 (2000).
62. Montini, R.M. C., Passos, J.R. S., Eira, A.F. Digital monitoring of mycelium growth kinetics and vigor of shiitake (*Lentinula edodes* (Berk.) Pegler) on agar medium. *Brazilian Journal of Microbiology* **37**, 90-95 (2006).
63. Ng, T.B. A review of research on the protein-bound polysaccharide (polysaccharopeptide, PSP) from the mushroom *Coriolus versicolor* (basidiomycetes: Polyporaceae). *General Pharmacology: The Vascular System* **30**, 1-4 (1998).
64. Nitschke, J., Altenbach, H.J., Malolepszy, T., Mölleken, H. A new method for the quantification of chitin and chitosan in edible mushrooms. *Carbohydrate Research* **346**, 1307-1310 (2011).
65. Nitschke, J., Modick, H., Busch, E., von Rekowski, R.W., Altenbach, H.J., Mölleken, H. A new colorimetric method to quantify β-1,3-1,6-glucans in comparison with total β-1,3-glucans in edible mushrooms. *Food Chemistry* **127**, 791-796 (2011).
66. Novak, M., Vetvicka, V. β-glucans, history, and the present: immunomodulatory aspects and mechanisms of action. *Journal of Immunotoxicology* **5**, 47-57 (2008).
67. Novotná, Z., Fliegerová, K., Šimůnek, J. Characterization of chitinases of polycentric anaerobic rumen fungi. *Folia Microbiologica* **53**, 241-245 (2008).
68. Ofenbeher-Miletić, I., Stanimirović, D., Stanimirović, S. On determination of chitin content in mushrooms. *Qualitas Plantarum Plant Foods for Human Nutrition* **34**, 197-201 (1984).
69. Ogawa, K., Tsurugi, J., Watanabe, T. Complex of gel-forming β-1,3-D-glucan with congored in alkaline solution. *Chemistry Letters* 689-692 (1972).
70. Ojha, A.K., Chandra, K., Ghosh, K., Islam, S.S. Glucans from the alkaline extract of an edible mushroom, *Pleurotus florida*, cv Assam Florida: isolation, purification, and characterization. *Carbohydrate Research* **345**, 2157-2163 (2010).
71. Park, H.G., Shim, Y.Y., Choi, S.O., Park, W.M. New Method Development for Nanoparticle Extraction of Water-Soluble β-(1→3)-D-Glucan from Edible Mushrooms, *Sparassis crispa* and *Phellinus linteus*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **57**, 2147-2154 (2009).

72. Park, Y.K., Ikegaki, M., Alencar, S.M., Aguiar, C.L. Determination of β -glucan concentration in *Agaricus blazei* Murill mushroom by enzymatic method. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* **23**, 312-316 (2003).
73. Pramanik, M., Chakraborty, I., Mondal, S., Islam, S.S. Structural analysis of a water-soluble glucan (Fr.I) of an edible mushroom, *Pleurotus sajor-caju*. *Carbohydrate Research* **342**, 2670-2675 (2007).
74. Prochazkova, S., Vårum, K.M., Ostgaard, K. Quantitative determination of chitosans by ninhydrin. *Carbohydrate Polymers* **38**, 115-122 (1999).
75. Ramberg, J.E., Nelson E.D., Sinnott R.A. Immunomodulatory dietary polysaccharides: a systematic review of the literature. *Nutrition Journal* **9**, 30- 54
76. Rau, U. Production of schizophyllan. *Methods in Biotechnology* **10**, 43-57 (1999).
77. Ravindra, R., Krovvidi, K.R., Khan, A.A. Solubility parameter of chitin and chitosan. *Carbohydrate Polymers* **36**, 121-127 (1998).
78. Ren, Y., Wee, K.E., Chang, F.N. Deficiency of Current Methods in Assaying Endochitinase Activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **268**, 302-305 (2000).
79. Rhee, S.J., Cho, S.Y., Kim, K.M., Cha, D.S., Park, H.J. A comparative study of analytical methods for alkali-soluble β -glucan in medicinal mushroom, Chaga (*Inonotus obliquus*). *LWT - Food Science and Technology* **41**, 545-549 (2008).
80. Ride, J.P., Drysdale, R.B. A rapid method for the chemical estimation of filamentous fungi in plant tissue. *Physiological Plant Pathology* **2**, 7-15 (1972).
81. Rout, D., Mondal, S., Chakraborty, I., Pramanik, M., Islam, S.S. Structural characterisation of an immunomodulating polysaccharide isolated from aqueous extract of *Pleurotus florida* fruitbodies. *Medicinal Chemistry Research* **13**, 509-517 (2004).
82. Rout, D., Mondal, S., Chakraborty, I., Pramanik, M., Islam, S.S. Chemical analysis of a new (1 \rightarrow 3)-, (1 \rightarrow 6)-branched glucan from an edible mushroom, *Pleurotus florida*. *Carbohydrate Research* **340**, 2533-2539 (2005).
83. Roy, S.K., Maiti, D., Mondal, S., Das, D., Islam, S.S. Structural analysis of a polysaccharide isolated from the aqueous extract of an edible mushroom, *Pleurotus sajor-caju*, cultivar Black Japan. *Carbohydrate Research* **343**, 1108-1113 (2008).
84. Roy, S.K., Das, D., Mondal, S., Maiti, D., Bhunia, B., Maiti, T.K., Islam, S.S. Structural studies of an immunoenhancing water-soluble glucan isolated from hot water extract of an edible mushroom, *Pleurotus florida*, cultivar Assam Florida. *Carbohydrate Research* **344**, 2596-2601 (2009).

85. Saha, S.K., Brewer, C.F. Determination of the concentrations of oligosaccharides, complex type carbohydrates, and glycoproteins using the phenol-sulfuric acid method. *Carbohydrate Research* **254**, 157-167 (1994).
86. Sahai, A.S., Manocha, M.S. Chitinases of fungi and plants: their involvement in morphogenesis and host-parasite interaction. *FEMS Microbiology Reviews* **11**, 317-338 (1993).
87. Saitô, H., Ohki, T., Takasuka, N., Sasaki, T. A ^{13}C -N.M.R.-Spectral study of a gel-forming, branched (1 \rightarrow 3)- β -glucan, (lentinan) from *Lentinus edodes*, and its acid-degraded fractions. Structure, and dependence of conformation on the molecular weight. *Carbohydrate Research* **58**, 293-305 (1977).
88. Sasaki, T., Takasuka, N. Further study of the structure of lentinan, an anti-tumor polysaccharide from *Lentinus edodes*. *Carbohydrate Research* **47**, 99-104 (1976).
89. Sesse, K., Cramer, F. Über Einschlußverbindungen, XXI. Die Optische Rotationsdispersion von Komplexen der Cyclodextrine und der Amylose mit einigen Azofarbstoffen in wäßriger Lösung. *Chemische Berichte* **102**, 509-521 (1969).
90. Shida, M., Uchida, T., Matsuda, K. A (1 \rightarrow 3)- α -D-glucan isolated from the fruit bodies of *Lentinus edodes*. *Carbohydrate Research* **60**, 117-127 (1978).
91. Siebert, K.J., Stenroos, L.E., Reid, D.S. Characterization of amorphous-particle haze. *Journal of the American Society of Brewing Chemists* **39**, 1-11 (1981).
92. Sietsma, J.H., Wessels, J.G. Evidence for Covalent Linkages between Chitin and β -Glucan in a Fungal Wall. *Journal of General Microbiology* **114**, 99-108 (1979).
93. Sietsma, J.H., Wessels, J.G. Solubility of (1-3)- β -D-(1-6)- β -D-Glucan in Fungal Walls: Importance of Presumed Linkage between Glucan and Chitin. *Journal of General Microbiology* **125**, 209-212 (1981).
94. Sietsma, J.H., Wessels, J.G. Chemical analysis of the hyphal walls of *Schizophyllum commune*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) General Subjects* **496**, 225-239 (1977).
95. Smiderle, F.R., Olsen, L.M., Carbonero, E.R., Baggio, C.H., Freitas, C.S., Marcon, R., Santos, A.R., Gorin, P.A., Iacomini, M. Anti-inflammatory and analgesic properties in a rodent model of a (1 \rightarrow 3),(1 \rightarrow 6)-linked β -glucan isolated from *Pleurotus pulmonarius*. *European Journal of Pharmacology* **597**, 86-91 (2008).
96. Smith, J.E., Neil, R.J., Sullivan, R. Medicinal mushrooms: a rapidly developing area of biotechnology for cancer therapy and other bioactivities. *Biotechnology Letters* **24**, 1839-1845 (2002)

97. Smith, R.L., Gilkerson, E. Quantitation of glycosaminoglycan hexosamine using 3-methyl-2-benzothiazolone hydrazone hydrochloride. *Analytical Biochemistry* **98**, 478-480 (1979).
98. Steinbüchel, A., Vandamme, E., De Beats, S. *Biopolymers Volume 6, Polysaccharides I: Polysaccharides from Prokaryotes*. (Wiley-VCH: Weinheim, 2002).
99. Sullivan, R., Smith, J.E., Rowan, N.J. Medicinal Mushrooms and Cancer Therapy: translating a traditional practice into Western medicine. *Perspectives in Biology and Medicine* **49**, 159-170 (2006).
100. Svennerholm, L. The determination of hexosamines with special reference to nervous tissue. *Acta Societatis Medicorum Upsaliensis* **61**, 287-306 (1957).
101. Synytsya, A., Mícková, K., Jablonský, I., Siuková, M. Mushrooms of genus *Pleurotus* as a source of dietary fibres and glucans for food supplements. *Czech Journal of Food Science* **26**, 441-446 (2008)
102. Synytsya, A., Mícková, K., Synytsya, A., Jablonský, I., Speváček, J., Erban, V., Kováříková, E., Copíková, J. Glucans from fruit bodies of cultivated mushrooms *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus eryngii*: Structure and potential prebiotic activity. *Carbohydrate Polymers* **76**, 548-556 (2009).
103. Taylor, K.A. A modification of the phenol/sulfuric acid assay for total carbohydrates giving more comparable absorbances. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **53**, 207-214 (1995).
104. Trnovec, T., Hrmová, M. Immunomodulator polysaccharides: Chemistry, disposition and metabolism. *Biopharmaceutics, Drug Disposition* **14**, 187-198 (1993).
105. Tsukagoshi, S., Hashimoto, Y., Fujii, G., Kobayashi, H., Nomoto, K., Orita, K. Krestin (PSK). *Cancer Treatment Reviews* **11**, 131-155 (1984).
106. Vetter, J., Siller, I. Chitingehalt von höheren Pilzen. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -Forschung A* **193**, 36-38 (1991).
107. Vetter, J. Chitin content of cultivated mushrooms *Agaricus bisporus*, *Pleurotus ostreatus* and *Lentinula edodes*. *Food Chemistry* **102**, 6-9 (2007).
108. Wang, J., Zhang, J., Zhao, B., Wang, X., Wu, Y., Yao, J. A comparison study on microwave-assisted extraction of *Potentilla anserina* L. polysaccharides with conventional method: Molecule weight and antioxidant activities evaluation. *Carbohydrate Polymers* **80**, 84-93 (2010).
109. Wasser, S.P. Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. *Applied Microbiology and Biotechnology* **60**, 258-274 (2002).

110. Wasser, S.P., Weis, A.L. Therapeutic effects of substances occurring in higher Basidiomycetes mushrooms: a modern perspective. *Critical Reviews in Immunology* **19**, 65-96 (1999).
111. Wasser, S.P., Weis, A.L. Medicinal properties of substances occurring in higher basidiomycetes mushrooms: current perspectives (review). *International Journal of Medicinal Mushrooms* **1**, (1999).
112. Wasser, S.P. Current findings, future trends, and unsolved problems in studies of medicinal mushrooms. *Applied Microbiology and Biotechnology* **89**, 1323-1332 (2010).
113. Wessels, J.G. Tansley Review No. 45. Wall Growth, Protein Excretion and Morphogenesis in Fungi. *New Phytologist* **123**, 397-413 (1993).
114. Wong, K.H., Cheung, P.C. Dietary fibers from mushroom sclerotia: 1. Preparation and physicochemical and functional properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53**, 9395-9400 (2005).
115. Wong, K.H., Cheung, P.C. Enzymatic preparation of mushroom dietary fibre: A comparison between analytical and industrial enzymes. *Food Chemistry* **115**, 795-800 (2009).
116. Yang, L., Zhang, L.M. Chemical structural and chain conformational characterization of some bioactive polysaccharides isolated from natural sources. *Carbohydrate Polymers* **76**, 349-361 (2009).
117. Ye, L., Zhang, J., Yang, Y., Zhou, S., Liu, Y., Tang, Q., Du, X., Chen, H., Pan, Y. Structural characterisation of a heteropolysaccharide by NMR spectra. *Food Chemistry* **112**, 962-966 (2009).
118. Ying, L., Fubao, Z. The Study on Microwave-assisted Extraction Polysaccharides from Brown Mushroom [J]. *Academic Periodical of Farm Products Processing* **1**, 235-242 (2009).
119. Yoshioka, Y., Tabeta, R., Saitô, H., Uehara, N., Fukuoka, F. Antitumor polysaccharides from *P. ostreatus* (Fr.) quél.: Isolation and structure of a β -glucan. *Carbohydrate Research* **140**, 93-100 (1985).
120. Young, S.H., Jacobs, R.R. Sodium hydroxide-induced conformational change in schizophyllan detected by the fluorescence dye, aniline blue. *Carbohydrate Research* **310**, 91-99 (1998).
121. Zhang, L., Li, X., Xu, X., Zeng, F. Correlation between antitumor activity, molecular weight, and conformation of lentinan. *Carbohydrate Research* **340**, 1515-1521 (2005).
122. Zhang, M., Cui, S.W., Cheung, P.C., Wang, Q. Antitumor polysaccharides from mushrooms: a review on their isolation process, structural characteristics and antitumor activity. *Trends in Food Science and Technology* **18**, 4-19 (2007).

123. Zhang, M., Zhang, L., Cheung, P.C., Dong, J. Fractionation and characterization of a Polysaccharide from the sclerotia of *Pleurotus tuber-regium* by preparative size-exclusion chromatography. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* **56**, 281-289 (2003).
124. Zhang, M., Zhang, L., Cheung, P.C., Ooi, V.E. Molecular weight and anti-tumor activity of the water-soluble polysaccharides isolated by hot water and ultrasonic treatment from the sclerotia and mycelia of *Pleurotus tuber-regium*. *Carbohydrate Polymers* **56**, 123-128 (2004).
125. Zhang, P., Zhang, I., Cheng, S. Chemical Structure and Molecular Weights of α -(1 \rightarrow 3)-D-Glucans from *Lentinus Edodes*. *Bioscience Biotechnology Biochemistry* **63**, 1197-1202 (1999).
126. Zhang, Y., Li, S., Wang, X., Zhang, L., Cheung, P.C. Advances in lentinan: Isolation, structure, chain conformation and bioactivities. *Food Hydrocolloids* **25**, 196-206 (2011).
127. Zhuang, C., Mizuno, T., Ito, H., Shimura, K. Chemical modification and antitumor activity of polysaccharides from the mycelium of liquid-cultured *Grifola frondosa*. *Journal of the Japanese Society for Food Science and Technology* 733-740 (1994) (a).
128. Zhuang, C., Mizuno, T., Ito, H., Shimura, K., Sumiya, T., Kawade, M. Antitumor activity and immunological property of polysaccharides from the mycelium of liquid-cultured *Grifola frondosa*. *Journal of the Japanese Society for Food Science and Technology* **41**, 724-732 (1994) (b).
129. Zhuang, C., Mizuno, T., Shimada, A., Ito, H., Suzuki, C., Mayuzumi, Y., Okamoto, H., Ma, Y., Li, J. Antitumor protein-containing polysaccharides from a Chinese mushroom Fengweigu or Houbitake, *Pleurotus sajor-caju* (Fr.) Sing. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* **57**, 901-906 (1993).

A. Anhang: Abkürzungsverzeichnis

4-MU	4-Methylumbelliferon
4-MU-(GlcNAc)	4-Methylumbelliferyl-N-acetylglucosamin
4-MU-(GlcNAc) ₃	4-Methylumbelliferylchitotriosid
Abb.	Abbildung
COSY	Correlation spectroscopy
DIN	Deutsche Institut für Normung
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
enzym.	enzymatische Extraktionsmethode
FID	Flammenionisationsdetektor
GC	Gaschromatographie
GlcAse	Glucanase
GPC	Gelpermeationschromatographie
HMBC	Heteronuclear multiple bond correlation
HSQC	Heteronuclear single quantum coherence
ID	Innendurchmesser
Lit.	Literaturmethode
MALDI	Matrix-assisted laser desorption/ionization
MALLS	Multi angle laser light scattering
MBTH	3-Methyl-2-benzothiazolon-Hydrazon-Hydrochlorid
MS	Massenspektroskopie
MWCO	Molecular Weight Cut Off

NMR	Nuclear magnetic resonance (Kernspinresonanz)
NOE	Kern-Overhauser-Effekt
NOESY	Nuclear overhauser enhancement spectroscopy
OD	optische Dichte
PSK	Polysaccharid-K
rpm	Umdrehungen pro Minute
Tab.	Tabelle
TCM	Traditionelle Chinesische Medizin
TLC	Thin layer chromatography (Dünnschichtchromatographie)
TM	Trockenmasse
TMS	Trimethylsilan
TOCSY	Total correlated spectroscopy
TOF	Time of fly
veg.	vegetativ

B. Anhang: Formelverzeichnis

Allgemeine Definitionen und Formeln

c	Konzentration
x	Gehaltsgröße
y	Messwert
\hat{y}	Geschätzter Funktionswert berechnet durch die Kalibrierfunktion
i	Laufzahl der Messungen
n	Anzahl der Messungen
m	Anzahl der Parallelmessungen
f	Freiheitsgrade
α	Wahrscheinlichkeit für den Fehler 1. Art
β	Wahrscheinlichkeit für den Fehler 2. Art
$t_{\alpha;f}$	Quantil der t-Verteilung
$F_{\alpha;f_1;f_2}$	Wert der F-Verteilung
$\bar{x} = \sum_i^n x_i$	Mittelwert
$Var(x) = \frac{\sum_i^n (x_i - \bar{x})^2}{n}$	Varianz
$s_x = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x}_i)^2}{n-1}}$	Standardabweichung des Mittelwertes
$a = \frac{Q_{xy}}{Q_{xx}}$	Steigung der Kalibriergraden
$b = \frac{1}{n} \cdot \sum_i^n y_i - \frac{a}{n} x_i$	Achsenabschnitt der Kalibriergraden

$$y = ax + b$$

Geradengleichung der
Kalibrierfunktion 1. Grades

$$R = \frac{\left(n \cdot \sum_i^n x_i y_i - \sum_i^n x_i \cdot \sum_i^n y_i \right)^2}{\left(n \cdot \sum_i^n x_i^2 - \left(\sum_i^n x_i \right)^2 \right) \cdot \left(n \cdot \sum_i^n y_i^2 - \left(\sum_i^n y_i \right)^2 \right)}$$

Korrelationskoeffizient

Quadratsummen

$$Q_x = \sum_i^n (x_i - \bar{x})^2$$

$$Q_{xx} = \sum_i^n x_i^2 - \left(\frac{\left(\sum_i^n x_i \right)^2}{n} \right)$$

$$Q_{xy} = \sum_i^n (x_i y_i) - \left(\frac{\left(\sum_i^n x_i \right) \cdot \left(\sum_i^n y_i \right)}{n} \right)$$

$$Q_{x^3} = \sum_i^n x_i^3 - \left(\frac{\left(\sum_i^n x_i \right) \cdot \left(\sum_i^n x_i^2 \right)}{n} \right)$$

$$Q_{x^4} = \sum_i^n x_i^4 - \left(\frac{\left(\sum_i^n x_i^2 \right)^2}{n} \right)$$

$$Q_{x^2 y} = \sum_i^n (x_i^2 y_i) - \left(\frac{\left(\sum_i^n y_i \right) \cdot \left(\sum_i^n x_i^2 \right)}{n} \right)$$

Kenngrößen der Methodenvalidierung

$$s_y = \sqrt{\frac{\sum (y_i - \bar{y}_i)^2}{n - 2}}$$

Reststandardabweichung der Messwerte

$$s_{x0} = \frac{s_y}{\alpha}$$

Verfahrensstandardabweichung

$$V_{x0} = \frac{s_{x0}}{\bar{x}_i} \cdot 100$$

Rel. Verfahrensvariationskoeffizient

$$PF_{Var} = \frac{Var_1(x)}{Var_2(x)}$$

Prüfgröße der Varianzenhomogenität
Varianzenhomogenität ist gegeben,
wenn: $PF_{Var} \leq F_{(\alpha; f_1=f_2=n-1)}$

$$rel. M = \frac{c_{Messwert}}{c_{theoretische\ Konzentration}} \cdot 100$$

Rel. Messpräzision

$$rel. W = \frac{c_{Aufgestockt} - c_{Probe}}{c_{Standard}} \cdot 100$$

Rel. Wiederfindung

Linearitätstest nach Mandel

$$y = a + bx + cx^2$$

Gleichung der Kalibrierfunktion 2. Grades

mit

$$a = \frac{1}{n} \cdot \left(\sum_i^n y_i - b \cdot \sum_i^n x_i - c \cdot \sum_i^n x_i^2 \right)$$

$$b = \frac{Q_{xy} - c \cdot Q_{x^3}}{Q_{xx}}$$

$$b = \frac{Q_{xy} \cdot Q_{x^3} - Q_{x^2y} \cdot Q_{xx}}{(Q_{x^3})^2 - Q_{xx} \cdot Q_x^4}$$

$$PF_{Mandel} = \frac{s_y^2 \text{ 1.Ordnung} - (n - 3) \cdot s_y^2 \text{ 2.Ordnung}}{s_y^2 \text{ 2.Ordnung}}$$

Prüfgröße des Mandel-Tests

Linearität ist gegeben, wenn:

$$PF_{Mandel} \leq F_{(\alpha; f_1=m; f_2=n-3)}$$

**Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze nach DIN 32 645
(Kalibriergradenmethode)**

$$X_{NG} = s_{x0} \cdot t_{\alpha, f=n-2} \cdot \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{n} + \frac{\bar{x}^2}{Q_x}}$$

Nachweisgrenze

$$X_{EG} = 2 \cdot X_{NG}$$

Erfassungsgrenze

$$X_{BG} = n \cdot X_{NG}$$

Bestimmungsgrenze (mit $k = 3$)**Sonstige** $J(A/B) = \Delta$ Signal A und Signal B in MHz

Kopplungskonstante zwischen zwei Signalen (NMR)

C. Anhang: Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Struktur eines β -1,3-1,6-Glucans.	14
Abb. 2: Schematische Übersicht des Aufbaus der Pilzzellwand Echter Pilze.	16
Abb. 3: Formelschema eines β -1,3-1,6-Glucans (rot), kovalent und über Wasserstoffbrückenbindungen (grün) verknüpft mit der Chitinmatrix (blau).	16
Abb. 4: Formelschema eines Proteoglucans verknüpft mit Asparaginsäure (rot), Asparagin (blau) und Serin (grün).	17
Abb. 5: Mögliche Tertiärstrukturen der β -Glucane (Bohn und BeMiller 1995).	18
Abb. 6: Antikanzero gene Wirkung von β -Glucanen nach Mizuno et al. (1999).	19
Abb. 7: Darstellung der enzymatischen Extraktion.	22
Abb. 8: ^1H -NMR- (oben) und ^{13}C -NMR-Spektrum (unten) eines α -1,4- β -1,6-Glucans aus <i>Agaricus brasiliensis</i> (Peck.) (Gonzaga et al. 2004).	28
Abb. 9: Formelschema des Farbstoffes Anilinblau.	31
Abb. 10: Formelschema des Farbstoffes Kongorot.	32
Abb. 11: Lichtmikroskopische Aufnahme des vegetativen Mycels von <i>Lentinula edodes</i> in 200-facher Vergrößerung. Das Präparat wurde mit 2%iger (w/v) Kongorotlösung angefärbt.	32
Abb. 12: Strukturformel von Chitin.	34
Abb. 13: Skizze der Anionen/Kationen-Austauschchromatographie.	49
Abb. 14: Wachstumskurve des Mycels von <i>Morchella esculenta</i> auf Malz-Hefeextrakt Nährboden.	54
Abb. 15: Vergleich der Wachstumskurven auf den verschiedenen Nährmedien am Beispiel des Mycels von <i>Morchella esculenta</i> .	57
Abb. 16: Bestimmung der pH-Optima der Chitinasen aus <i>Lentinula edodes</i> .	58
Abb. 17: Bestimmung der Endochitinaseaktivität des Fruchtkörpers von <i>Pleurotus eryngii</i> .	59
Abb. 18: Zusammenhang zwischen relativer Fluoreszenz und Konzentration: a) einfache Darstellung, b) logarithmische Darstellung.	64

Abb. 19: Absorptionsspektren einer [1] Blindlösung, der [2] NaOH-Fraktion von <i>Pleurotus ostreatus</i> Mycel, einer [3] 100 µg/ml Schizophyllanlösung und einer [4] 200 µg/ml Schizophyllanlösung.	66
Abb. 20: Empfindlichkeit (Steigung der Kalibriergeraden) der Methode bei verschiedenen Farbstoffkonzentrationen.	67
Abb. 21 Kalibriergrade der Methode in einem Konzentrationsbereich von 30-150 µg/ml Schizophyllan.	67
Abb. 22: Beispiel der densitometrischen Bestimmung.	70
Abb. 23: Kalibriergerade in einem Konzentrationsbereich von 0,5-5 mg/ml Chitosan.	71
Abb. 24: Verteilung der Ausbeuten an Gesamt-β-Glucanen auf die verschiedenen Fraktionen der Literaturmethode.	77
Abb. 25: Relativer Anteil an triplehelicalen Glucanen in den verschiedenen Fraktionen.	80
Abb. 26: Relative Anteile triplehelicaler Glucane am Gesamt-β-Glucangehalt.	81
Abb. 27: Prozentual umgesetztes Chitin durch die Inkubation mit 0,04 U Chitinase für 72 h bei 25°C.	84
Abb. 28: Bestimmung der optimalen Inkubationsdauer mit β-Glucanase durch Quantifizierung der Ausbeuten an a) Gesamt-β-Glucanen und b) triplehelicalen Glucanen.	85
Abb. 29: Darstellung der enzymatischen Extraktionsmethode.	86
Abb. 30: Vergleich der Gesamt-β-Glucan Ausbeuten der verschiedenen Spezies.	88
Abb. 31: Verteilung der Ausbeuten an Gesamt-β-Glucanen auf die einzelnen Fraktionen der Extraktion am Beispiel des Mycels von <i>Pleurotus pulmonarius</i> .	89
Abb. 32: Verteilung der Ausbeuten an triplehelicalen β-Glucanen auf die einzelnen Fraktionen der Extraktion am Beispiel des Mycels von <i>Pleurotus pulmonarius</i> .	91
Abb. 33: Anteile an triplehelicalen Glucanen an der Gesamt-β-Glucanausbeute der verschiedenen Spezies.	92
Abb. 34: Protokoll der Aufreinigung mittels Ionenaustauschchromatographie (Extrakt: KOH-Fraktion des Fruchtkörpers von <i>Pleurotus ostreatus</i>).	95

Abb. 35: ^1H -NMR-Spektrum (mit Unterdrückung des H_2O -Signals) des Glucans aus der NaOH-Fraktion des Fruchtkörpers von <i>Lentinula edodes</i> in D_2O .	97
Abb. 36: ^3J - ^1H , ^1H -COSY-Spektrum des Glucans aus der NaOH-Fraktion des Mycels von <i>Lentinula edodes</i> in D_2O .	98
Abb. 37: ^{13}C -NMR-Spektrum des Glucans aus der NaOH-Fraktion des Mycels von <i>Hypsizygyus tessulatus</i> in D_2O .	101
Abb. 38: DEPT135-Spektrum des Glucans aus der NaOH-Fraktion des Fruchtkörpers von <i>Pleurotus ostreatus</i> in D_2O .	102
Abb. 39: Ausschnitt aus dem NOESY-Spektrum des Glucans der NaOH-Fraktion des Fruchtkörpers von <i>Pleurotus ostreatus</i> in D_2O .	105
Abb. 40: ^{13}C -NMR-Spektrum des enzymatisch extrahierten Glucans aus dem Mycel von <i>Pleurotus pulmonarius</i> in D_2O .	107
Abb. 41: Chromatogramm des Glucans aus der NaOH-Fraktion von <i>Hypsizygyus tessulatus</i> .	111
Abb. 42: GPC-Chromatogramm des enzymatisch extrahierten Glucans aus dem Mycel von <i>Hypsizygyus tessulatus</i> .	113
Abb. 43: Chromatogramm des mit KOH isolierten Glucans aus dem Mycel von <i>Hypsizygyus tessulatus</i> .	116
Abb. 44: Verteilung der Monosaccharide in den jeweiligen Fraktionen anhand des Mycels von <i>Hypsizygyus tessulatus</i> .	118
Abb. 45: Chromatogramm des enzymatisch isolierten Glucans aus dem Mycel von <i>Hypsizygyus tessulatus</i> .	119
Abb. 46: Vergleich der Monosaccharidzusammensetzung am Beispiel von <i>Hypsizygyus tessulatus</i> .	125
Abb. 47: Vergleich der gewichtsmittleren Molekularmassen.	126
Abb. 48: Vergleich der Anteile an triplehelicalen Glucanen.	127
Abb. 49: Vergleich der Ausbeuten der enzymatischen Extraktion mit den Gehalten der KOH-Fraktion der Literaturmethode.	131

D. Anhang: Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Beispiele verschiedener Glucane aus Pilzextrakten.	25
Tab. 2: Rezepturen der verwendeten Nährmedien.	38
Tab. 3: Übersicht über die verwendeten Spezies.	39
Tab. 4: ¹ H-Kernresonanzspektroskopie (mit Wasserunterdrückung).	50
Tab. 5: ¹³ C-Kernresonanzspektroskopie.	50
Tab. 6: DEPT135-Kernresonanzexperiment.	50
Tab. 7: Correlation Spectroscopy (H,H-COSY-NMR-Spektroskopie).	50
Tab. 8: Total Correlated Spectroscopy (H,H-TOCSY-NMR-Spektroskopie).	51
Tab. 9: Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy (H,H-NOESY-NMR-Spektroskopie).	51
Tab. 10: Heteronuclear Single Quantum Coherence (HSQC-NMR-Spektroskopie).	51
Tab. 11: Heteronuclear Multiple Bond Coherence (HMBC-NMR-Spektroskopie).	51
Tab. 12: Wachstumscharakteristiken der verschiedenen Pilzmycelien auf den getesteten Nährböden.	55
Tab. 13: Exo- und Endochitinaseaktivität der analysierten Proben.	60
Tab. 14: Glucanaseaktivität der Proben unter Verwendung verschiedener Substrate.	62
Tab. 15: Zusammenfassung der ermittelten Validierungsparameter.	68
Tab. 16: Validierungsparameter der Bestimmungsmethode für Chitin.	71
Tab. 17: Chitingehalte der verschiedenen Spezies.	73
Tab. 18: Gesamt-β-Glucanausbeuten der Literaturmethode in der Trockenmasse.	76
Tab. 19: Ausbeuten an triplehelicalen Glucanen in der Trockenmasse unter Verwendung der Literaturmethode.	79
Tab. 20: Ausbeuten an Gesamt-β-Glucanen der verschiedenen Spezies.	87
Tab. 21: Ausbeuten an triplehelicalen Glucanen der verschiedenen Spezies.	90

Tab. 22: Charakterisierung der glykosidischen Bindungen und Zuordnung der Signale der ^1H -NMR-Spektren der Glucane.	99
Tab. 23: Charakterisierung der glykosidischen Bindungen und Zuordnung der Signale der ^{13}C -NMR Spektren der Glucane aus den jeweiligen a) Fruchtkörpern und b) Mycelien der verschiedenen Pilze.	103
Tab. 24: Charakterisierung der glykosidischen Bindungen und Zuordnung der Signale der ^1H -NMR-Spektren der enzymatisch extrahierten Glucane.	106
Tab. 25: Charakterisierung der glykosidischen Bindungen und Zuordnung der Signale der ^{13}C -NMR Spektren der enzymatische extrahierten Glucane.	108
Tab. 26: Kenndaten der Molekularmassenbestimmung der durch die Literaturmethode extrahierten Glucane.	112
Tab. 27: Kenndaten der Molekularmassenbestimmung der durch die enzymatisch gewonnenen Glucane.	114
Tab. 28: Bestimmung der Monosaccharidzusammensetzung der Glucane.	117
Tab. 29: Monosaccharidzusammensetzung der enzymatisch extrahierten Glucane.	120
Tab. 30: Zusammenfassung der strukturanalytischen Charakterisierung der aus den Mycelien isolierten Glucane.	124
Tab. 31: Zusammenfassung der strukturanalytischen Charakterisierung der aus den Fruchtkörpern isolierten Glucane.	129

E. Anhang: schriftliche Versicherung

Ich versichere, die Arbeit selbständig verfasst zu haben, nur die in der Dissertation angegebenen Hilfsmittel benutzt und alle wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen als solche gekennzeichnet zu haben, und dass die Dissertation in der gegenwärtigen oder einer anderen Fassung noch keinem anderen Fachbereich, keiner Gesamthochschule und keiner anderen wissenschaftlichen Hochschule vorgelegen hat.

Sprockhövel, den

Unterschrift