



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 699 27 498 T2** 2006.07.13

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 086 141 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **699 27 498.2**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US99/10335**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **99 921 889.4**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 1999/058575**

(86) PCT-Anmeldetag: **12.05.1999**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **18.11.1999**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **28.03.2001**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **28.09.2005**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **13.07.2006**

(51) Int Cl.⁸: **C08B 37/06** (2006.01)
A61K 47/48 (2006.01)

(30) Unionspriorität:
78204 13.05.1998 US

(73) Patentinhaber:
Carrington Laboratories, Inc., Irving, Tex., US

(74) Vertreter:
Flügel Preissner Kastel Schober, 80335 München

(84) Benannte Vertragsstaaten:
BE, DE, FR, GB, IT, SE

(72) Erfinder:
**NI, Yawei, College Station, US; YATES, M.,
Kenneth, Grand Prairie, US; ZARZYCKI, Ryszard,
Dallas, US**

(54) Bezeichnung: **PEKTINE AUS ALOE**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

[0001] Die Erfindung betrifft Pektine. Insbesondere betrifft die Erfindung Aloe-Pektine, ein Isolierverfahren und ihre Verwendung.

[0002] Die folgenden Abkürzungen werden verwendet:

Ab, Antikörper; AG, Arabinogalactan; APase, alkalische Phosphatase; CDTA, trans-1,2-Diaminocyclohexan-N,N,N',N'-tetraessigsäure; Da, Dalton; DAc, Acetylierungsgrad; DM, Methylierungsgrad; EDTA, Ethylendiamintetraessigsäure; Gal, Galactose; Gal A, Galacturonsäure; GalNAc, N-acetyliertes Galactosamin; Glc, Glucose; Glc A, Glucuronsäure; HM, High Methoxyl; HMW, hochmolekular; HPSEC, Hochleistungsgrößenausschlusschromatographie; HR, haarige Region; HT, Erhitzen; kDa, Kilodalton; LM, Low Methoxyl; LMW, niedermolekular; Man, Mannose; MWCO, Molekulargewichtsausschluss; PBS, Phosphat-gepufferte Salzlösung (10 mM Natriumphosphat, 150 mM NaCl, pH 7,4); RG, Rhamnogalacturonan; RT, Raumtemperatur; SEC, Größenausschlusschromatographie; SF, superkritisches Fluid; SR, glatte Region; TMS, Trimethylsilyl; TN-Puffer, 25 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,4.

[0003] Pektin ist eine pflanzliche Zellwandkomponente. Die Zellwand ist in drei Schichten aufgeteilt, die Mittellamelle, die erste Zellwand und die zweite Zellwand. Die Mittellamelle ist am pektinreichsten. Pektine werden während des Zellwachstums produziert und abgelagert. Besonders reichlich sind Pektine in weichen Pflanzengewebe, unter den Bedingungen eines schnellen Wachstums und eines hohen Feuchtigkeitsgehalts vorhanden. In den Zellwänden liegen die Pektine in Form eines Calciumkomplexes vor. Die Beteiligung einer Calciumvernetzung wird durch die Tatsache untermauert, dass Chelatbildner die Freisetzung von Pektin aus den Zellwänden erleichtern.

[0004] Pektin ist ein komplexes Polysaccharid, das mit den pflanzlichen Zellwänden assoziiert ist. Es besteht aus einer 1,4- α -verknüpften Polygalacturonsäure-Hauptkette, mit Rhamnoseresten dazwischen und modifiziert mit Neutralzucker-Seitenketten und Nichtzucker-Komponenten, wie Acetyl-, Methyl- und Ferulasäuregruppen. In [Fig. 1](#) ist die allgemeine Struktur von Pektinen oder pektischen Substanzen auf der Basis des derzeitigen Verständnisses gezeigt. Die Gesamtstruktur ist oben gezeigt, während die ausführliche Struktur unten gezeigt ist. Die Neutralzucker-Seitenketten, die Arabinan- und Arabinogalactane (Typen I und II) einschließen, sind an die Rhamnosereste in der Hauptkette in der O-3- oder O-4-Position gebunden. Die Rhamnosereste neigen an der Hauptkette zur Clusterbildung. Angesichts der angeknüpften Seitenketten wird diese Region als haarige Region bezeichnet, und der Rest der Hauptkette wird daher als glatte Region bezeichnet. Die Rhamnosereste sind mit den Gal-A-Resten in der Hauptkette 1,2-verknüpft, und die Konfiguration dieser Verknüpfung wurde nun als α bestimmt.

[0005] Pektine werden seit jeher als Nahrungszusatzstoffe eingesetzt. Allerdings hat sich ihre Verwendung auch in pharmazeutische Bereiche ausgedehnt. Seit langem werden Pektine als Abführmittel verwendet und können die Darmfunktionen verbessern. Es wird davon ausgegangen, dass die abführende Wirkung zum Teil auf der antimikrobiellen Wirkung des Pektins beruht.

[0006] Pektine sind auch gegen Magen-Darm-Ulzera und Enterokolitis wirksam. Pektine beeinflussen auch die Zellproliferation in den Eingeweiden. Sie besitzen auch eine Blutcholesterin-senkende Wirkung und zeigen eine Hemmung der Atherosklerose. Diese Wirkung ist das Ergebnis von Wechselwirkungen zwischen Pektinen und Gallensalzen. Es wurde auch gezeigt, dass Pektine das Fibrinnetzwerk bei hypercholesterinämischen Individuen beeinflusst.

[0007] Die Fähigkeit zur Wechselwirkung mit vielen zweiwertigen Metallionen macht Pektine zu einem starken Entgiftungsmittel. Es wurde gezeigt, dass Pektine bei der Entfernung von Blei und Quecksilber aus dem Verdauungstrakt und aus den Atemwegen wirksam sind. Neuerdings wurde festgestellt, dass Pektine zur Behandlung des durch einen sauren Ösophagusreflux verursachten Sodbrennens wirksam sind.

[0008] Unlängst wurde festgestellt, dass die so genannten modifizierten Citrus-Pektine, die kleine Moleküle (ca. 10 kDa) sind, die durch einen alkalischen Abbau erhalten werden, bei Labortieren bei der Prävention von Krebszellenmetastasen wirksam sind.

[0009] Aufgrund der Gegenwart von Neutralzucker-Seitenketten und einigen anderen Nichtzuckerkomponenten ist die Struktur von Pektinen sehr komplex; im Wesentlichen haben keine zwei Moleküle identische Strukturen, was der Grund dafür ist, warum Pektin oft unter Verwendung des Begriffs "pektische Substanzen" beschrieben wird. Pektische Substanzen werden im Allgemeinen verwendet, um Pektin, Pektinsäure und ihre

Salze (Pektate) und bestimmte neutrale Polysaccharide (Arabinan, Arabinogalactan und Galactan) einzuschließen. Pektinsäuren oder Pektate sind entesterte Pektine.

[0010] Rhamnose, Galactose, Arabinose und Xylose sind die häufigsten Neutralzuckerkomponenten der Pektine. Die weniger häufigen sind Glucose, Mannose und Fucose. Einige der Xylosereste sind vereinzelt mit Gal-A-Resten in der O-3-Position verknüpft. In Pektinen wurden drei Typen von Neutralzucker-Seitenketten identifiziert. Arabinan besteht aus 1,5- α -verknüpfter Arabinose. Arabinogalactan I besteht aus 1,4- β -verknüpfter Galactose mit kurzen Arabinanketten, die an O-3 gebunden sind. In Arabinogalactan II ist Galactose in der 1,3&6- β -Verknüpfung mit Arabinose verknüpft.

[0011] Die Methylierung erfolgt an den Carboxylgruppen der Gal-A-Reste. Der Methyl-Veresterungsgrad ist als der Prozentsatz von Carboxylgruppen (Gal-A-Reste) definiert, die mit Methanol verestert sind. Ein Pektin mit einem Methylierungsgrad ("DM") von über 50% wird als High Methoxyl ("HM")-Pektin betrachtet, und eines mit einem DM von < 50% wird als Low Methoxyl ("LM")-Pektin bezeichnet. Die meisten natürlichen Pektine sind HM, mit einigen Ausnahmen, wie Sonnenblumen-Pektin. Der Acetylierungsgrad (DAc) ist als der Prozentsatz von Gal-A-Resten definiert, die mit einer Acetylgruppe verestert sind. Es wird angenommen, dass nur die Hydroxylgruppen acetyliert sind. Da jeder Gal-A-Rest mehr als eine Hydroxylgruppe aufweist, kann der DAc über 100% liegen. Der DAc ist im Allgemeinen in nativen Pektinen, mit Ausnahme von einigen, wie Zuckerrüben-Pektin, gering.

[0012] Pektin kann einige Nichtzuckerkomponenten enthalten. In Zuckerrüben-Pektin wurden Ferulasäureester festgestellt. Sie sind mit den Arabinose- und Galactoseresten in der Neutralzucker-Seitenkette verknüpft.

[0013] Pektine sind in Wasser löslich und in den meisten organischen Lösungsmitteln unlöslich. Pektine mit einem sehr geringen Methyl-Veresterungsgrad und Pektinsäuren sind nur als Kalium- oder Natriumsalz löslich. Bezüglich anderer Polymere besteht für Pektine keine Sättigungsgrenze, allerdings ist es schwierig, eine echte Lösung mit Konzentrationen von höher als 3–4% zu erhalten. Handelsübliche Pektine weisen einen Größenbereich von 7–14 $\times 10^4$ Da auf. Citrus-Pektine sind größer als Apfel-Pektine. Die Viskosität von Pektinlösungen ist im Allgemeinen gering, und so werden Pektine selten als Verdickungsmittel eingesetzt. Die Viskosität hängt direkt mit der Größe, dem pH-Wert und auch mit der Gegenwart von Gegenionen zusammen. Die Zugabe von einwertigen Kationen vermindert die Viskosität.

[0014] Pektine können mit mehreren zweiwertigen Metallionen wechselwirken. Die Reihenfolge der Selektivität ist Cu ca. Pb >> Zn > Cd ca. Ni \geq Ca. Diese Aktivität ist die Grundlage für die entgiftende Wirkung des Pektins.

[0015] Die Gal-A-Reste in der Pektinhauptkette sind 1,4- α -verknüpft. Beide Hydroxylgruppen von D-Gal A an den Kohlenstoffatomen 1 und 4 befinden sich in der axialen Position. Darum ist die resultierende Verknüpfung trans-1-4. Dieser Typ von Verknüpfung führt zu einer erhöhten Kettensteifigkeit des Polymers. So sind Pektine mit einem Flexibilitätsparameter B zwischen 0,072–0,017 starre Moleküle. Es wurde vorgeschlagen, dass der Einbau von Rhamnoseresten in die Hauptkette zu einem T-förmigen Knick in der Hauptkette führt. Eine Zunahme im Rhamnosegehalt führt zu biegsameren Molekülen. Pektine können als Zickzackpolymer mit langen, starren und glatten Regionen und biegsamen haarigen Regionen (Rhamnosereich), die als rotierende Gelenke dienen, betrachtet werden. Der DM hat auch bestimmte Auswirkungen auf die Kettenflexibilität. In Lösung hat sich gezeigt, dass Pektinmoleküle eine rechtshändige Helix-Struktur einnehmen.

[0016] Pektine sind bei pH 3–4 am stabilsten. Unterhalb von pH 3 werden die Methoxyl- und Acetylgruppen und die Neutralzucker-Seitenketten entfernt. Bei erhöhten Temperaturen werden diese Reaktionen beschleunigt, und die Spaltung der glycosidischen Bindungen in der Galacturonan-Hauptkette erfolgt. Unter neutralen und alkalischen Bedingungen werden die Methylestergruppen verseift, und die Polygalacturonan-Hauptkette bricht über die β -Eliminierung-Spaltung von glycosidischen Bindungen an den nicht reduzierenden Enden der methoxylierten Galacturonsäurereste auseinander. Diese Reaktionen laufen mit zunehmender Temperatur auch schneller ab. Pektinsäuren und LM-Pektine sind gegenüber neutralen und alkalischen Bedingungen resistent, da keine oder nur eine begrenzte Anzahl von Methylestergruppen vorhanden ist.

[0017] Es gibt viele Enzyme, die die Pektinmoleküle spezifisch modifizieren und abbauen können. Diese Enzyme umfassen endo- und exo-Polygalacturonase (EC 3.2.1.15 und EC 3.2.1.67), Pektatlyase (EC 4.2.2.10), Pektinmethylesterase (EC 3.1.1.11), Pektinacetylerase und Rhamnogalacturonase. Endo-Polygalacturonase ist auf die nicht veresterten 1,4- α -verknüpften Gal-A-Reste spezifisch und erfordert zur Funktion vier nebeneinander liegende nicht veresterte Gal-A-Reste. Dieses Enzym kann von Pflanzen, Fungi und Bakterien pro-

duziert werden.

[0018] Sowohl HM- als auch LM-Pektine können Gele bilden, allerdings durch vollkommen verschiedene Mechanismen. HM-Pektine bilden die Gele in Gegenwart von hohen Konzentrationen mitgelöster Stoffe (Saccharose) bei niedrigem pH. LM-Pektine bilden die Gele in Gegenwart von Calcium. Zusätzlich kann das Zuckerrüben-Pektin über Vernetzung der ferulierten Gruppen Gele bilden.

[0019] Das Calcium-LM-Pektin-Gelnetzwerk wird durch die Bildung der "egg box"-Verknüpfungszonen aufgebaut, in denen Ca^{++} -Ionen die Vernetzung der beiden Strecken von Polygalacturonsäuren bewirken. In Apfel- und Citrus-Pektin wurden die Strecken der Polygalacturonsäuren ohne die Rhamnose-Insertion auf eine Länge von bis zu 72–100 Resten geschätzt. Die Zone wird durch den Rhamnoseresest in der Hauptkette terminiert. Das Calcium-LM-Pektingel ist thermoreversibel. Darum kann das Calcium am Siedepunkt zugesetzt werden, und die Gelbildung tritt beim Abkühlen ein. Es ist möglich, mit 0,5% Pektin und 30–60 mg/g Ca^{++} ein festes elastisches Gel zu erhalten. Ein hoher Pektingehalt mit wenig Calcium ergibt ein elastisches Gel, wohingegen eine hohe Calciumkonzentration mit möglichst wenig Pektin zu einem spröden Gel führt.

[0020] Die Zugabe von einwertigen Gegenionen verstärkt die Calcium-LM-Pektin-Gelbildung, d.h. zur Gelbildung ist weniger Calcium erforderlich.

[0021] Die im Handel erhältlichen Pektine werden hauptsächlich aus Apfeltrester oder Orangenschalen unter heißen, sauren Bedingungen und durch anschließende alkoholische Fällung extrahiert. Zuerst werden die Rohmaterialien blanchiert, anschließend zur Inaktivierung von endogenen Enzymen, die in der Lage sind, Pektine abzubauen, und zur Entfernung von Pigmenten gewaschen. Ein übliches Verfahren zur Enzym-Inaktivierung ist die Alkoholbehandlung, d.h. die Zellwandfasern werden als so genannte Alkohol-unlösliche Reste ("AIR") oder Alkohol-unlösliche Feststoffe ("AIS") präpariert.

[0022] Zur Isolierung von Pektinen aus pflanzlichen Zellwänden wurden verschiedene Extraktionsbedingungen eingesetzt. Diese umfassen die Verwendung von Chelatbildnern, wie EDTA, CDTA, Natriumhexameta-phosphat und Ammoniumoxalat, bei pH 3–6,5, heiße verdünnte Säure (HCl, pH 1,5–3) und kalte verdünnte Base (NaOH und Na_2CO_3 ; pH 10). Die Extraktion wird zur Ausbeutenerhöhung oft bei erhöhten Temperaturen (60–100°C) durchgeführt. Im Handel erhältliche Citrus- und Apfel-Pektine werden mit heißer verdünnter Säure extrahiert. Da Pektine bei einem pH von < 3 leicht abgebaut werden, dauert das Extraktionsverfahren üblicherweise je nach angewandter Temperatur nur kurz. Der pH von 3–6,5, bei dem die Chelatbildner verwendet werden, liegt unterhalb des für ihre optimale Chelatbildungswirkung benötigten pH-Werts, er wird jedoch angewandt, um den Pektinabbau über β -Eliminierung zu minimieren. Wie die heiße verdünnte Säureextraktion kann die alkalische Extraktion einen ausgiebigen Abbau hervorrufen. Er wird nur bei 0–4°C durchgeführt, um den Abbau über β -Eliminierung möglichst gering zu halten. Die kalte alkalische Extraktion wird oft als letzte Stufe einer sequenziellen Extraktion zur Entfernung derjenigen Pektine, die fest an die Zellwände gebunden sind, eingesetzt.

[0023] Auch Enzyme wurden zur Pektinextraktion überprüft. Sie umfassen Arabinase, Galactanase, Polygalacturonase und Rhamnogalacturonase. Die Polygalacturonase produzierenden Hefezellen wurden ebenfalls schon direkt zur Pektinextraktion eingesetzt.

[0024] Die Merkmale von unter verschiedenen Bedingungen extrahierten Pektinen können variieren. Pektine, die bei erhöhten Temperaturen extrahiert wurden, sind kleiner als diejenigen, die bei Raumtemperatur erhalten wurden, und reicher an Neutralzuckern. Die kleinere Größe ist das Ergebnis des Abbaus unter rigideren Bedingungen. Die Ausbeute ist allerdings bei erhöhter Temperatur viel höher. Diejenigen Pektine, die mit einem Chelatbildner erhalten wurden, weisen im Allgemeinen einen höheren Gal-A-Gehalt auf. Die unter den kalten alkalischen Bedingungen erhaltenen Pektine weisen im Allgemeinen einen verminderten Gal-A- und einen höheren Neutralzuckergehalt auf.

[0025] Industrielle Pektine, entweder HM oder LM, werden hauptsächlich aus Apfel und Citrus durch Säure-Extraktion und alkoholische Fällung erhalten. LM-Pektine werden aus den HM-Pektinen durch chemische Entesterung erhalten. Als Lebensmittelzusatzstoffe besitzen Pektine einen günstigen regulatorischen Status. Sie werden als Generally Recognized As Safe ("GRAS") in den USA und als Acceptable Daily Intake ("ADI") in Europa klassifiziert. Das heißt, ihre Verwendung wird nur durch die current Good Manufacturing Practice ("cGMP")-Anforderungen eingeschränkt, um bestimmte Spezifikationen zu erfüllen. Diese Spezifikationen umfassen einen minimalen Gal-A-Gehalt von 65% (Gew./Gew.).

[0026] HM-Pektin kann in einen unterschiedlichen Typ von LM-Pektin, d.h. amidiertes Pektin, umgewandelt werden. Dies wird durch Behandeln von HM-Pektin mit Ammoniak unter alkalischer Bedingung in alkoholischen Suspensionen erreicht. Die Methylestergruppen werden durch Amidgruppen ersetzt. Das amidierte Pektin besitzt in Gegenwart von Calcium im Vergleich zu regulärem LM-Pektin ein besseres Gelbildungsvermögen.

[0027] Viele andere pflanzliche Quellen wurden ebenfalls bereits auf die Pektinproduktion überprüft. Zwei von ihnen, Zuckerrübenpulp und Sonnenblumenblüten, werden bereits ausgiebig studiert. Beide sind als Rohmaterialien reichlich vorhanden. Allerdings besitzt Zuckerrüben-Pektin ein schlechtes Gelbildungsvermögen, weitgehend aufgrund seines hohen Acetylgruppengehalts und seiner geringen Molekülgröße (ca. 5×10^4 Da). Die Sonnenblumenpektine sind von Natur aus LM und können mit Chelatbildnern wirksam extrahiert werden. Sie besitzen oft den Nachteil qualitativ schlechter Rohmaterialien und schlechter Farbqualität (im Allgemeinen hellbraun) der Pektin-Endprodukte.

[0028] Pektine aus verschiedenen pflanzlichen Quellen besitzen verschiedene Merkmale. Im Allgemeinen weisen sämtliche im Handel erhältliche Pektine, einschließlich derjenigen, die eine Weiterverarbeitung erfahren haben, als Endprodukt einen bestimmten Verfärbungsgrad auf. Die Färbung reicht von hellgelb/braun (Citrus-Pektin) bis dunkelbraun (Apfel- und Sonnenblumenpektine). Die Färbung beruht auf der Kombination zweier Faktoren: natürliche Farbe (Pigmentierung) der Rohmaterialien und ihr Gehalt an Polyphenolen. Chemisch gesehen weist Sonnenblumenblüten-Pektin einen sehr hohen Gal-A-Gehalt auf und ist von Natur aus ein LM-Pektin, wohingegen Zuckerrüben-Pektin einen relativ geringen Gal-A-Gehalt und einen sehr hohen Gehalt an Acetyl- und Ferulasäuregruppen aufweist. Die Strukturen von Apfel- und Citrus-Pektin sind einander sehr ähnlich.

[0029] Für die Pektinanalyse wurde eine Reihe von Techniken entwickelt. Der Gal-A-Gehalt wird durch das Verfahren unter Verwendung von m-Hydroxyldiphenyl zur Farbbildung bestimmt. Dieser Test ist einfacher als die bisherigen Tests mit minimaler Beeinträchtigung durch Neutralzucker auf. Andere Tests für die Gal-A-Bestimmung wurden ebenfalls bereits beschrieben. Die Zuckerzusammensetzungen werden durch GLC oder GC-MS unter Verwendung von Alditolacetat- oder Trimethylsilylether ("TMS")-Derivatisierung analysiert. Am häufigsten werden GLC-Verfahren zur Bestimmung des Methylestergehalts angewandt, die die Verseifung mit Base (0,5 N) und die Messung des Methanols durch GLC auf einer Poropak-Q-Säule bei 120°C oder einer Carbowax 1500-Säule bei 125°C umfassen. Auch ein Kapillarelektrophoreseverfahren wurde bereits zur Bestimmung von DE von Pektinen überprüft. Zur Messung der Acetylgruppen wird ein schneller und empfindlicher kolorimetrischer Test angewandt.

[0030] Die Größenbestimmung wird durch verschiedene Mittel erreicht, die Viskosität, HPSEC, und Gelpermeationschromatographie umfassen. Neuerdings wurde die Lichtstreuung als exakteres Verfahren vorgeschlagen. Die intrinsische Viskosität von Pektinen wird oft unter Verwendung des Ubbelohde-Viskosimeters bestimmt. Dies erfolgt aufgrund der elektrolytischen Natur der Pektinmoleküle in Gegenwart von 0,1–0,15 M NaCl.

[0031] Die Aufreinigung von Pektinen wird meistens durch Ionenaustauscherchromatographie und Kupfer(II)-Fällung erreicht. Für die Ionenaustauscherchromatographie werden am breitesten die DEAE-Sepharose CL-6B-Matrix und Acetatpuffer (pH 4,8) eingesetzt. Der Neutralzuckergehalt von Pektinen wird nach der Reinigung mit diesen Verfahren bestimmt.

ZUSAMMENFASSUNG

[0032] Ein Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft im weiten Sinn eine pektische Substanz aus Aloe Vera mit einem 3-O-Methylrhamnosegehalt von etwa 0,1 bis etwa 5 Mol-%, die in der Lage ist, in Gegenwart einer Lösung eines Calciumsalzes ein Gel zu bilden, und gegebenenfalls mindestens eine der folgenden Eigenschaften aufweist: Methylierungsgrad von weniger als etwa 50 Mol-%; Rhamnosegehalt von etwa 2 bis etwa 15 Mol-%; wobei die pektische Substanz aus dem Blatt von Aloe Vera durch Extraktion erhältlich ist, wobei die Extraktion mit einem superkritischen Fluid, einem wasserlöslichen organischen Lösungsmittel, einer Säure, einem Alkali, einem Chelatbildner, einem Bakterium, einem Enzym oder einer Kombination davon erreicht wird.

[0033] Erfindungsgemäß werden Pektine aus Gel- und Rindenzellwandfasern von Aloe Vera extrahiert, isoliert und identifiziert. Die serielle Behandlung von Aloe-Fasern mit einem Chelatbildner, wie EDTA, bei einem pH von etwa 7 bis etwa 8,5, ist das wirksamste Extraktionsverfahren. Durch eine weitere Behandlung des Aloe-Pektins mit einem Ionenaustauscherharz werden die aufgereinigten Aloe-Pektine erhalten. Aloe-Pektine enthalten Galacturonsäure, einen ungewöhnlich hohen Gehalt an Rhamnose, und 3-OMe-Rhamnose. Zwei

Klassen von Aloe-Pektin, die durch die Größe unterschieden werden, werden erhalten: ein hochmolekulares (HMW)-Pektin, das durch die Raumtemperatur-Extraktion erzeugt wurde, wohingegen die Extraktion unter Erhitzen ein niedermolekulares (LMW)-Pektin erzeugte. Aloe-Pektine besitzen von Natur aus einen geringen Methoxyl-(LM)-Gehalt. Sowohl HMW- als auch LMW-Pektine sind zur Gelbildung in Gegenwart von Calcium in der Lage. Zusätzlich bilden Aloe-Pektine, insbesondere das HMW-Pektin, bei niedrigen Temperaturen Gele auf der Basis einwertiger Kationen, die sich wieder in eine Lösung verwandeln, wenn sie auf Raumtemperatur gebracht werden. Das HMW-Aloe-Pektin-Calciumgel ist ein äußerst wirksames Verkapselungsmittel, das zur kontrollierten Freisetzung von pharmakologischen Substanzen, wie Proteine, Antikörper und Impfstoffe, geeignet ist. Aloe-Pektine bilden eine Matrix für Antigen-Antikörper-Fällungsreaktionen. Andere Aloe-Pektine bilden eine Speichermatrix für pharmakologische Substanzen. Aloe-Pektine aus Pulpe weisen eine schmutzige weiße Pulverfarbe auf und erzeugten beim Auflösen in Wasser klare Lösungen.

KURZE BESCHREIBUNG DER ZEICHNUNGEN

[0034] [Fig. 1](#) zeigt eine allgemeine Struktur der Pektine oder pektischen Substanzen, wobei "HR" für haarige Region steht, "SR" für glatte Region steht, "AG" für Arabinogalactan steht und "RG" für Rhamnogalacturonan steht.

[0035] [Fig. 2](#) ist eine schematische Querschnittsdarstellung der Aloe-Vera-Blattstruktur.

[0036] [Fig. 3](#) zeigt die strukturellen Komponenten von Aloe-Vera-Pulpe-Mesophyllzellen.

[0037] [Fig. 4](#) ist ein Flussdiagramm der sequenziellen Aloe-Pektinextraktion (bei Raumtemperatur und hoher Temperatur) unter Verwendung von EDTA als Chelatbildner.

[0038] [Fig. 5](#) zeigt die Verwendung von Aloe-Pektin als Verkapselungsmittel zur kontrollierten Freisetzung. Die relativen Mengen des aus den Pektinperlen freigesetzten Enzyms wurden mit dem Substrat PNPP gemessen:

- (a) spontane Freisetzung in Wasser in Relation zu den Pektinkonzentrationen, gezeigt mit APase-Ab-Konjugatperlen;
- (b) spontane Freisetzung in Wasser in Relation zu den Größen der Aloe-Pektine, gezeigt mit APase-Ab-Konjugatperlen, hergestellt mit 10 mg/ml Aloe-Pektinen; und
- (c) Wirkung von pH und NaCl (150 mM) bei der Auslösung der Freisetzung, gezeigt mit APase-Perlen, hergestellt mit 15 mg/ml Aloe-Pektin ($1,36 \times 10^6$ Da). TN, 25 mM Tris und 150 mM NaCl, pH 7,4; Salzlösung, 150 mM NaCl.

AUSFÜHRLICHE BESCHREIBUNG

[0039] Aloe wird seit langem als Arzneipflanze eingesetzt. Sie ist eine succulente Pflanze, die an das Leben unter ariden und semiariden Bedingungen angepasst ist. Die Succulenten sind durch ihren Besitz an reichlich vorhandenen Wasserspeichergeweben gekennzeichnet. Die Aloe-Vera-Blätter bestehen aus zwei Teilen, der grünen Rinde und einer klaren Pulpe (d.h. das innere Gel oder das fleischige innere). Letzteres ist das Wasserspeichergewebe und wird für medizinische Zwecke sehr breit eingesetzt. Aufgrund seines klaren und schleimigen Aussehens wird die Pulpe oft als schleimiges Gel bezeichnet, das weitgehend als homogene Einzeleinheit behandelt wurde.

[0040] Pektine oder pektische Substanzen aus Aloe Vera und ihre Extraktion wurden bisher noch nicht ausführlich beschrieben. Eine an Gal A reiche pektische Substanz wurde bereits als Pulpe-Polysaccharid-Hauptkomponente beschrieben. Dieses Polysaccharid mit einem Gal-A-Gehalt von 85% wurde nach der Heißwasserextraktion der alkoholischen Niederschläge aus der klaren Pulpe isoliert. Die Neutralzucker-Zusammensetzungsanalyse, hat Galactose, Rhamnose, Arabinose und 5 Spurenmengen von Mannose, Glucose und Xylose nachgewiesen. Diese Feststellung wurde als Ergebnis pflanzlicher Schwankung innerhalb der Aloe-Vera-Spezies und der speziellen örtlichen Bedingungen im Vergleich zu der Tatsache, dass die meisten anderen Studien Mannose-reiche Polysaccharide als Polysaccharid-Hauptkomponente in der Aloe-Vera-Pulpe identifizierten, interpretiert. Ein Gal-A-reiches Polysaccharid wurde durch Heißwasser- und Ammoniumoxalatextraktion aus ganzen Blattmaterialien, die zuvor mit siedendem Methanol behandelt worden waren, erhalten. Der Gal-A-Gehalt wurde auf 55% geschätzt, bezogen auf Papier- und Gas-Flüssigkeitschromatographie. Dieses Polysaccharid wurde durch Pektinase abgebaut und daher als Pektin identifiziert, das wiederum als Hauptpolysaccharid von Aloe Vera beansprucht wurde. Bei allen oben genannten Studien wurden keine Verknüpfungsstudien mit Neutralzuckern und keinerlei ausführliche Charakterisierung von anderen chemischen und physikalischen

Eigenschaften (z.B. Größe, DM, DAc und Gelbildung) der isolierten Polysaccharide durchgeführt.

[0041] Eine Ausführungsform dieser Erfindung ging von der klaren Pulpe oder dem fleischigen inneren Gel des Aloe-Vera-Blattes aus. Die Isolierung der verschiedenen Teile des Aloe-Blattes wurde in den U.S.-Patentschriften Nrn. 4,735,935, 4,851,224, 4,917,890, 4,959,214 und 4,966,892 beschrieben, wobei jeweils der gesamte Inhalt dieser Patente hier durch Bezugnahme eingeschlossen ist. Das klare Gel enthält große Mesophyll-(Wasserspeicher)-Zellen mit einer sehr begrenzten Anzahl von degenerierten Zellorganellen, und die grüne Rinde enthält viel kleinere Zellen, die reich an Zellorganellen sind, wie Mitochondrien und Chloroplasten. Es wurde festgestellt, dass die Pulpe nach der Homogenisierung in zwei Hauptteile, löslich und unlöslich, aufgetrennt werden konnte. Der lösliche Teil erwies sich als reich an 1,4- β -verknüpfter Mannose. Der unlösliche Teil bestand hauptsächlich aus klaren Zellwänden oder Zellwandfasern (bezogen auf ihr mikroskopisches Aussehen unter geringer Vergrößerung nach der Homogenisierung). Die Zellwandkomponente in den Aloe-Vera-Pulpeextrakten wurde bisher noch nicht beschrieben. Die Zellwandfasern enthielten einen hohen Gehalt an Gal A (34% Gew./Gew.), wohingegen der lösliche Teil < 5% (Gew./Gew.) Gal A enthielt. Diese Daten legen eindeutig nahe, dass diese Zellwandfasern potentiell reich an Pektin waren. Verifizierungsexperimente zeigten, dass aus diesen Pulpezellwandfasern eine große Menge an Pektin (bis zu 50% Gew./Gew., mit einem durchschnittlichen Gal-A-Gehalt von > 70% (Gew./Gew.) extrahiert werden konnte. Eine große Menge an Pektin, das auch reich ist an Gal A, konnte auch aus den aus der Rinde isolierten Zellwandfasern extrahiert werden. Diese Pektine aus Pulpe oder Rindenfasern wurden als Aloe-Pektine bezeichnet.

[0042] Die Zellwandfasern wurden durch Zentrifugation oder Filtration und anschließend Homogenisierung der Pulpe oder Rinde isoliert und ohne weitere Behandlung, außer Waschen in Wasser, direkt zur Pektinextraktion verwendet. Das Aloe-Pektin konnte aus diesen Fasern unter Anwendung von bereits beschriebenen Verfahren, d.h. heiße Säure bei einem pH von ca. 1,5, kaltes Alkali (NaOH oder Na_2CO_3), bei einem pH von ca. 10 und Chelatbildner (EDTA, Natriumhexametaphosphat) bei einem pH von 4,0–6,5 extrahiert werden. Allerdings wurde festgestellt, dass das wirksamste Extraktionsverfahren, das die höchste Ausbeute ergab, in der Verwendung eines Chelatbildners bei einem pH von über 7 (7–8,5) bestand. Der verwendete Chelatbildner war EDTA. Die Einzigartigkeit dieses Extraktionsverfahrens war der höhere pH (7–8,5), der eingesetzt wurde, da bei allen anderen bisherigen Studien der Chelatbildner immer bei einem pH von $\leq 6,5$ eingesetzt wurde, um den Abbau durch β -Eliminierung möglichst gering zu halten. Der Grund hinter der Verwendung dieses höheren pH-Wertes liegt darin, dass Aloe-Pektine natürlicherweise LM (siehe nachstehend) sind, eine Form von Pektin, die gegenüber der β -Eliminierung unter alkalischen Bedingungen resistent ist, und dass EDTA am wirksamsten bei einem pH oberhalb von 7 funktioniert.

[0043] Ein zweistufiges sequenzielles Extraktionsverfahren maximierte die Verwendung von Fasern und ergab zwei Typen von Pektin, die sich in Größe, HMW und LMW unterschieden. Die Fasern wurden zuerst bei RT und anschließend durch eine weitere Extraktion unter HT (bis zu 80°C) extrahiert. Die RT-Extraktion erzeugte das HMW-Pektin mit einem mittleren MW von $1,1 \times 10^6$ Da, und die HT-Extraktion erzeugte das LMW-Pektin mit einem mittleren MW von $1,9 \times 10^5$ Da. Das MW stand in direkter Korrelation zu den intrinsischen Viskositäten; das HMW-Pektin zeigte eine intrinsische Viskosität von $\times 550$ ml/g und bis zu 978 ml/g. MW und intrinsische Viskosität von HMW-Aloe-Pektin waren viel höher als diejenigen der im Handel erhältlichen Pektine.

[0044] Das Aloe-Pektin wies einige distinkte Merkmale in den Zuckerzusammensetzungen auf. Sie enthielten einen hohen Gehalt an Rhamnose; der Rhamnosegehalt in den Aloe-Pektinen war mindestens zwei Mal so hoch wie derjenige in anderen Pektinen, hauptsächlich Citrus, Apfel, Zuckerrüben und Sonnenblumen. Rhamnose ist ein Schlüsselzucker in der Pektinhauptkette, dessen Gehalt die Biegsamkeit des Moleküls beeinflusst. Aloe-Pektine wiesen auch einen seltenen Zucker auf, 3-OMe-Rhamnose, der bisher in keinem anderen Pektin beschrieben wurde. Aloe-Pektin wurde als von Natur aus LM festgestellt, mit einem DM von im Allgemeinen < 30% und oft < 10%. Sie waren in Gegenwart von Calcium zur Gelbildung in der Lage. Einmaligerweise konnten Aloe-Pektine, insbesondere die HMW-Pektine, bei niedriger Temperatur (4°C) bei einer sehr niedrigen Pektinkonzentration (1 mg/ml) ein reversibles auf einwertigen Kationen (NaCl)-basierendes Gel bilden. Eine solche Kaltgelierung wurde bisher für kein anderes Pektin beschrieben.

[0045] Die grünen Rinden von Aloe-Vera-Blättern werden im Allgemeinen während der Herstellung der auf Pulpe basierenden Produkte als Abfall entfernt. Diese Rinden mit geringen Mengen von ihnen anhaftender Pulpe machen ca. 60% (Gew./Gew., nass) des ganzen Blattes aus. Es wurde festgestellt, dass die aus diesen Rinden hergestellten Zellwandfasern eine Aloe-Pektinausbeute entsprechend denjenigen aus der Pulpe hervorbrachten. Die Aloe-Pektine aus Rinde waren ebenso reich an Gal A und wiesen die gleichen Eigenschaften wie die Pulpe auf, d.h. sie sind natürlicherweise LM, hoch im MW und hoch in der intrinsischen Viskosität (für

HMW-Pektine) und zur Calciumgelbildung sowie zur einwertigen Kationen-basierenden Gelbildung bei niedriger Temperatur (4°C) in der Lage.

[0046] Aloe-Pektine aus den Pulpefasern sind schmutzigweiße Pulver als Endprodukte und erzeugten im Vergleich zu den gelben bis hellbraunen Pulvern und den trüben Lösungen der derzeit im Handel erhältlichen und experimentellen Pektine aus Citrus, Apfel, Zuckerrübe und Sonnenblume klare Lösungen. Diejenigen aus den Rindenfasern waren hellgrün-bräunliche Pulver und erzeugten Lösungen, die trüb waren, allerdings in geringerem Maße als die besten Citrus-Pektine. Pulverfarbe und Lösungsklarheit der Aloe-Pektine aus Rindenfasern konnten durch ein zusätzliches Spülen mit Alkohol wesentlich verbessert werden.

[0047] Zusammengenommen sind die Aloe-Pektine einzigartige Pektine und könnten von den anderen Pektinen, d.h. Citrus, Apfel, Zuckerrübe und Sonnenblume, durch ein oder mehrere der folgenden Merkmale unterschieden werden:

- 1) hohes Molekulargewicht ($> 1 \times 10^6$ Da) und hohes intrinsische Viskosität (> 550 ml/g).
- 2) hoher Rhamnosegehalt
- 3) sie weisen 3-OMe-Rhamnose auf
- 4) sie sind von Natur aus LM
- 5) sie sind zur Calciumgelbildung in der Lage
- 6) sie sind zur einwertigen Kationen-basierenden Gelbildung bei niedriger Temperatur (4°C) in der Lage
- 7) schmutzigweiße Pulver und klare Lösungen (Aloe-Pektin aus Pulpe).

MATERIALIEN UND METHODEN

Materialien

[0048] Aloe Vera (*Aloe Barberdensis* Miller)-Pflanzen (10") wurden von H&P Sales, Inc (Vista, California) über den Löwe-Einzelhandel erhalten. Masseacetyliertes Mannan (BAM) ist ein Aloe-Vera-Pulpeextrakt von Carrington Laboratories, Inc. Verschiedene im Handel erhältliche Pektine und Polygalacturonsäure wurden verwendet. Sie umfassen HM-Citrus (P-9561 mit einem DM von 92% und P-9436 mit einem DM von 64%), LM-Citrus (P-9311 mit einem DM von 28%), Polygalacturonsäure (P-1879) von Sigma Chemical Co., HM-Citrus (PE100 mit einem DM von 67%) von Spectrum Chemical Co., und HM-Citrus (CU401) und HM-Apfel (AU201) von Herbstreith-Fox KG. Die folgenden Reagentien wurden ebenfalls von Sigma Chemical Co. erhalten: Dinatrium-EDTA, Tetranatrium-EDTA, Endo-Polygalacturonase, alkalische Phosphatase, alkalische Phosphatase-Antikörper-(IgG)-Konjugat, Folin-Ciocalteu-Reagents, Imidazol und sämtliche verwendeten neutralen und sauren Zucker. Das alkalische Phosphatasesubstrat pNPP wurde von Pierce erhalten. Natriumhexametaphosphat wurde von Fluka Chemie AG erhalten.

[0049] Im Allgemeinen kann BAM aus Aloe Vera-Blättern, wie folgt, hergestellt werden:

1. Die Aloe-Blätter werden gewaschen, aufgeschlitzt und zur Entfernung der Blattrinde filetiert. Das reine (im Wesentlichen anthrachinonfrei) innere Gel wird zurückbehalten, während die grüne Rinde verworfen wird.
2. Das filetierte Material wird homogenisiert (Crepato) und mit einem Finisher Model 75 (FMC, Chicago, Illinois) ausgiebig filtriert, um den größten Teil der Pulpe zu entfernen.
3. Das klare viskose Gel wird mit verdünnter HCl auf einen pH von etwa 3,2 angesäuert.
4. Sodann wird das angesäuerte Gel mit vier Volumina 95% Ethanol bei Umgebungstemperatur extrahiert. Das Schwebematerial wird entfernt, anschließend wird das Alkohol/Wassergemisch abgesaugt, während der feste Niederschlag durch Zentrifugation gesammelt wird. Der größte Teil der Alkohol/Wasser-löslichen Substanzen, wie organische Säuren, Oligosaccharide, Monosaccharide, Anthrachinone und anorganische Salze, wird durch das alkoholische Extraktionsverfahren entfernt.
5. Anschließend wird der feste Aloe-Vera-Extrakt mit frischem Alkohol gewaschen, zentrifugiert, gefriergetrocknet und zu einem weißen Pulver vermahlen.

[0050] Das Produkt ist in gefriergetrockneter Form mehrere Jahre bei Raumtemperatur stabil, sofern es vor zusätzlicher Feuchtigkeit geschützt wird. Die ausführlichen Verfahrensweisen zur Herstellung von im Wesentlichen Anthrachinon-freiem Aloe-Gel, zur Herstellung von im Wesentlichen Anthrachinon-freiem Aloe-Saft, zur Extraktion aktiver chemischer Substanzen) aus einem Aloe-Blatt, zur Herstellung von BAM und zur Extraktion aus einem Aloe-Blatt von im Wesentlichen, nicht abbaubaren lyophilisierten, geordneten, linearen Manno-Polymeren wurden bereits in den U.S.-Patentschriften von Carrington Nrn. 4,735,935, 4,851,224, 4,917,890, 4,957,907, 4,959,214 und 4,966,892, deren gesamter Inhalt jeweils hier durch Bezugnahme eingeschlossen ist, beschrieben. Die Verwendungen der Aloe-Produkte wurden bereits in den U.S.-Patentschriften

von Carrington Nrn. 5,106,616, 5,118,673, 5,308,838, 5,409,703, 5,441,943 und 5,443,830 beschrieben, deren gesamter Inhalt hier jeweils durch Bezugnahme eingeschlossen ist.

BEISPIEL 1

Licht- und Elektronenmikroskopie der Blattschnitte

[0051] Frische Aloe-Vera-Blätter wurden mit einem Skalpell in 2–3 mm dicke Stücke geschnitten. Die Schnitte wurden direkt unter dem Lichtmikroskop (Olympus BH-2) beobachtet. Zur histologischen Analyse wurden die frischen Aloe-Vera-Blätter in 10% Formalin in PBS fixiert, und die Schnitte wurden mit Toluidinblau angefärbt.

[0052] Die Protokolle zur Gewebefixierung und Anfärbung für die Elektronenmikroskopie befolgten das von Trachtenberg (Annals of Botany, 1984, 53, Ss. 227–236) Beschriebene. Kurz gesagt, wurden frische Pulpegewebeblöcke bei Raumtemperatur in 4% Glutaraldehyd in 0,2 M Cacodylat-HCl-Puffer (pH 7,2) 2 h fixiert, mit anschließender Fixierung für 2 h in 2% Osmiumtetroxid in dem gleichen Puffer. Die Gewebe wurden entwässert und nach Einbetten in Harz geschnitten. Die Gewebsschnitte wurden mit Uranylacetat angefärbt und unter Verwendung eines Zeiss-10C-Elektronenmikroskops überprüft. Die Lichtmikroskopie der Blattschnitte zeigte, dass die Pulpe (**3**) aus großen klaren Mesophyllzellen bestand, die eine hexagonale Form zeigten (**Fig. 2**). Die Größe dieser Zellen war sehr groß, oft mehr als 300 µm breit. Die Wände dieser Zellen waren klar und durchscheinend. Die Zellen in der Rinde (**1**) waren im Vergleich zu denjenigen in der Pulpe (**3**) viel kleiner (**Fig. 2**). Die elektronenmikroskopischen Überprüfungen ergaben, zusätzlich zu den Zellwänden (**6**), ein Flüssigel (**7**), nur die Zellmembranen in der Pulpe zusammen mit einer sehr beschränkten Anzahl von degenerierten Zellorganellen (**8**) (**Fig. 3**). Nuklei, Chloroplasten und weitere Zellorganellen, wie Mitochondrien, wurden nur in der grünen Rinde und in dem vaskulären Bündeln (**2**) (**Fig. 2**) beobachtet.

BEISPIEL 2

Lichtmikroskopie der Zellwandfasern

[0053] BAM wurde in Wasser bei 2 mg/ml gelöst. Die Lösungen wurden bei Raumtemperatur 3 h oder bei 4°C über Nacht gerührt. Anschließend wurden sie bei niedriger Geschwindigkeit (1000 U/min oder 180 g) 15 min zentrifugiert (Beckman TJ-6). Das Pellet wurde gesammelt, einmal mit Wasser gewaschen und getrocknet (Centrivap, Labconco). Das Pelletgewicht wurde nach dem Trocknen bestimmt. Eine kleine Probe des Pellets wurde unter dem Lichtmikroskop (Olympus BH-2) überprüft. Die unlöslichen Pelletmaterialien aus den Pulpeextrakten waren bei geringer Vergrößerung (4×) anscheinend Fasern und bei stärkerer Vergrößerung (10× und 40×) klare durchscheinende Lagen mit einem Aussehen, das demjenigen der oben beschriebenen klaren Pulpezellwände entsprach. Mit einer weniger ausgiebigen Homogenisierung behielten einige dieser Fasern immer noch die ursprünglichen Strukturmerkmale der Mesophyllzellen bei. Diese Feststellungen zusammen geben an, dass die unlöslichen Fasern aus den Pulpemesophyllzellwänden stammten.

BEISPIEL 3

Extraktion der Aloe-Pektine

[0054] Herstellung von Zellwandfasern Zwei Typen von Zellwandfasern wurden verwendet, Alkohol-behandelt und nicht Alkohol-behandelt. Die Alkohol-behandelten Fasern wurden aus BAM durch Zentrifugation isoliert. BAM wurde bei 2 mg/ml in Wasser gelöst. Anschließend wurde die Lösung bei 180 × g 10 min zentrifugiert. Das Pellet, das aus den Zellwandfasern bestand, wurde geerntet und vor dem Trocknen dreimal mit Wasser gewaschen. Da mit BAM bereits die alkoholische Fällung durchgeführt wurde, sind diese Fasern darum den Alkohol-unlöslichen Resten oder Feststoffen (AIS) ähnlich, die üblicherweise zur Extraktion von Pektinen aus anderen Pflanzengeweben hergestellt werden.

[0055] Die nicht Alkohol-behandelten Fasern umfassen die Rohpulpe- und Rindenfasern. Die Rohpulpefasern waren diejenigen, die durch die Grobfiltration während der BAM-Herstellung und anderer auf Pulpebasierender Produkte zurückblieben. Sie sind die gleichen wie diejenigen, die in BAM vorkommen, mit der Ausnahme, dass sie größer und nicht Alkohol-behandelt sind. Sie wurden mit einem Sieb Nr. 18 (Öffnung 1 mm) unter minimalem Verlust gesammelt und dreimal mit Wasser gewaschen. Die grüne Rinde, die ca. 60% des Nassgewichts des gesamten Blattes ausmachte, wird vom Hersteller im Allgemeinen als Abfall verworfen. Er enthielt die eigentliche grüne Rinde sowie etwas Pulpe, die nach dem Filetieren zurückblieb. Die Fasern wurden daraus auf ähnliche Weise wie aus der Pulpe nach der Homogenisierung isoliert. Sie wurden ausgiebig, min-

destens dreimal, mit Wasser gewaschen, anschließend getrocknet und vor der Verwendung für die Pektinextraktion bei Raumtemperatur aufbewahrt.

[0056] Extraktion Der Chelatbildner EDTA wurde zur Extraktion der Aloe-Pektine aus den Zellwandfasern verwendet. Die Fasern wurden bei 0,2–2% (Gew./Vol.) in Wasser suspendiert. Die EDTA-Stammlösung wurde bei 0,5 M und einem pH von 7,0 oder 8,0 hergestellt und der Fasersuspension zugesetzt. Die verwendete EDTA-Endkonzentration betrug 25 mM. Der End-pH der Fasersuspensionen wurde mit NaOH auf die angegebenen Werte eingestellt. Die Extraktion erfolgte unter Rühren entweder bei RT oder unter HT oder sequenziell – RT-Extraktion und anschließende HT-Extraktion. HT wurde bei bis zu 80°C durchgeführt und anschließend vor dem Trennschritt gestoppt. Bei der sequenziellen Extraktion wurden die verbleibenden Fasern nach der RT-Extraktion in dem gleichen Volumen Wasser ohne Waschen resuspendiert, und frisches EDTA wurde in der gleichen Konzentration wie für die RT-Extraktion zugesetzt ([Fig. 4](#)). Nach der Extraktion wurden die restlichen Fasern durch Zentrifugation (500 g, 15 min) oder durch Filtrieren mit einem Sieb Nr. 18 und anschließende Gazeschwamm-Filtration entfernt. Von den Gazeschwämmen (4 × 4, 8 Lagen) wurden drei Stück zusammen verwendet und auf einen Scheibenfilterhalter aufgelegt. Die Schwämme wurden vor der Verwendung mit Wasser gewaschen. Die Gazeschwammfiltration war bei der Entfernung von kleinen Faserresten nach der Siebfiltration äußerst wirksam. Wenn nötig, wurde der Extrakt zweimal über das Schwammfilter gegeben. Das Filtrat war im Wesentlichen klar. Für die quantitativen Studien bezüglich der Ausbeuten aus der sequenziellen Extraktion wurden die Fasern nach dem ersten Extraktionsdurchgang bei RT immer durch Zentrifugation entfernt. Dem klaren Überstand oder dem Filtrat wurde Alkohol (Ethanol) bis zu einer Endkonzentration von 75% (Vol./Vol.) zugesetzt. Die Niederschläge wurden durch Zentrifugation (500 g, 15 min) oder mit dem Sieb Nr. 18 gesammelt und zweimal mit 75% Alkohol gewaschen. Der Alkohol-Waschschritt war notwendig, um restliches EDTA zu entfernen. Anschließend wurden die Niederschläge zur Entfernung von Alkohol gepresst, getrocknet und vor der Verwendung bei RT gelagert.

[0057] Es wurde festgestellt, dass die Extraktion der Aloe-Pektine mit dem Chelatbildner EDTA hochwirksam war. Es konnte eine Ausbeute bis zu 50% (Gew./Gew.) erhalten werden. Die erhaltenen Pektine besaßen einen mittleren Galacturonsäuregehalt von über 70% (Gew./Gew.) (Tabelle 1). Es wurde festgestellt, dass der pH-Wert auf die Pektinausbeute mit EDTA-Extraktion eine große Wirkung (Tabelle 2) besaß. Eine 5 mg/ml-Fasersuspension in Wasser besaß einen pH-Wert von ca. 3,7 (3–4). Der pH-Wert der Fasersuspension betrug nach Zugabe von EDTA-Stammlösung, pH 8,0, bis zu einer Endkonzentration von 25 mM 7,7 (7,5–8,0). Ein pH-Wert von 6,4 (6,3–6,5) wurde erhalten, wenn eine EDTA-Stammlösung, pH 7,0, verwendet wurde, um eine Endkonzentration von 25 mM zu ergeben. Der pH-Wert wurde unter Verwendung eines Natriumacetatpuffers, pH 5,0, bei einer Endkonzentration von 20 mM, eine für die Pektinextraktion übliche Bedingung, erhalten. Es wurde festgestellt, dass nach der RT-Extraktion bei einem pH von 5,0 bis 7,7 (Tabelle 2) kein größerer Unterschied in der Ausbeute bestand. Allerdings wurde eine Hauptwirkung des pH-Wertes während der HT-Extraktion festgestellt. Eine Ausbeutezunahme um > 20% wurde bei einem pH von 7,7, im Vergleich zu pH 5,0 oder pH 6,4, während der HT-Extraktion der frischen Fasern verzeichnet (Tabelle 2). Außerdem wurde eine nahezu zweifache Zunahme in der Ausbeute verzeichnet, wenn die aus dem ersten Durchgang der RT-Extraktion verbleibenden Fasern unter HT, wobei frisches EDTA, pH 8,0, zugegeben wurde, im Vergleich zur Verwendung von EDTA, pH 7,0, extrahiert wurden (Tabelle 2). Die pH-Werte der Fasersuspensionen veränderten sich am Ende der RT-Extraktion nicht wesentlich (Tabelle 3). Nach dem Resuspendieren in Wasser und Zugabe von frischem EDTA war der pH (ca. 8,5) der Suspensionen tatsächlich höher als derjenige der EDTA-Stammlösungen (pH 8,0) (Tabelle 3). Außerdem wurde unter Verwendung der frischen Fasern bei der HT-Extraktion festgestellt, dass die pH-8,5-Extraktion doch eine viel höhere Ausbeute ergab, mehr als doppelt so hoch wie diejenige bei pH 5,0 und ca. 40% höher als diejenige bei pH 7,7 (Tabelle 4). Die Erhöhung des pH-Wertes auf 9,0 verbesserte allerdings die Ausbeute im Vergleich zu pH 8,5 nicht viel weiter (< 10%). Verifizierungsexperimente zeigten auch, dass eine wesentliche Zunahme (20%) in der Ausbeute auch mit einer RT-Extraktion bei pH 8,5 erhalten wurde (Tabelle 4).

[0058] RT war während der Extraktion weniger wirksam als HT. Die Ausbeute zwischen diesen beiden Bedingungen war ähnlich, mit der Maßgabe, dass die RT-Extraktion zeitlich verlängert war. Die Ausbeute durch die RT-Extraktion näherte sich nach ca. 4 h dem Maximum. Eine weitere Ausdehnung der Extraktionsdauer verbesserte die Ausbeute nicht nennenswert. Die Ausbeute der zweiten Extraktion mit HT schwankte in Abhängigkeit von der Dauer der ersten RT-Extraktion; darum war die Ausbeute mit HT höher, wenn die RT-Extraktion nur 1 h durchgeführt wurde, oder geringer, wenn die RT-Extraktion 4 h oder länger durchgeführt wurde (Tabelle 2).

[0059] Die wiederholte Extraktion unter den gleichen Bedingungen brachte eine schrittweise geringere Ausbeute hervor. Die Ausbeute nahm bei jeder Extraktion um etwa die Hälfte ab. Die restlichen Fasern können

darum in der Hälfte des Volumens aus der vorhergehenden Extraktion suspendiert werden.

[0060] EDTA und die Faserkonzentrationen beeinflussten ebenfalls den Extraktionswirkungsgrad. Wenn 25 mM EDTA mit einer 2 mg/ml Fasersuspension verwendet wurde, konnte mit einer einzigen Extraktion unter HT eine Ausbeute zwischen 50–60% erhalten werden. Bei Verwendung einer 5 mg/ml Fasersuspension mit der gleichen EDTA-Konzentration nahm die Ausbeute auf ca. 30% ab. Mit der sequenziellen RT-dann-HT-Extraktion, wie in [Fig. 4](#) gezeigt, konnte leicht eine Gesamtausbeute von 40–50% erhalten werden. Kein Unterschied in der Ausbeute wurde zwischen Alkohol-behandelten und nicht Alkoholbehandelten Fasern festgestellt.

[0061] Auch andere Chelatbildner wurden zur Aloe-Pektin-Extraktion betrachtet. Ammoniumoxalat wurde nicht verwendet, da es als toxisches Mittel angesehen wird. Unter Verwendung von Natriumhexametaphosphat wurde eine beträchtliche Ausbeute erhalten; allerdings war dieses Mittel aufgrund der Niederschlagsbildung in alkoholischer Lösung schwer zu entfernen, und ein Säure (HCl oder HNO_3)-Fällungsschritt war vor der alkoholischen Wäsche erforderlich.

[0062] Auch andere Bedingungen wurden für die Aloe-Pektin-Extraktion überprüft. Heiße verdünnte Säurelösungen und kalte alkalische Lösungen sind zwei andere für die Pektin-Extraktion übliche Bedingungen. Beide von ihnen können einen ausgedehnten Abbau hervorrufen. Im Handel erhältliche Pektine aus Citrus und Apfel wurden unter der Bedingung heißer verdünnter Säure extrahiert. Unter Anwendung dieser Bedingung auf das Aloe-Pektin wurde der pH-Wert der Fasersuspensionen mit HCl auf 1,5 eingestellt, gefolgt von HT bis zu 80°C. Die erhaltene Ausbeute ist im Vergleich zu der Verwendung der EDTA-Extraktion viel geringer (Tabelle 5). Die Extraktion durch HT in Wasser allein ergab praktisch keine Alkohol-ausfällbaren Materialien. Renault und Thibault (Renault und Thibault, Carbohydrate Research, 1993, 244, Ss. 99–114) berichteten, dass die Extraktion von Apfel- und Zuckerrübenfasern in PBS (pH 6,5) mit HT (80°C) eine hohe Ausbeute, entsprechend derjenigen der EDTA-Extraktion, hervorbrachte. Unter Anwendung dieser Bedingung wurde aus den Aloe-Vera-Pulpefasern nur eine geringe Ausbeute (Tabelle 5) erhalten. Die kalte alkalische Extraktion wurde mit 50 mM NaOH oder 50 mM Na_2CO_3 bei 4°C durchgeführt. Der pH-Wert in Suspension betrug 11,5 mit 50 mM NaOH und 10,5 mit 50 mM Na_2CO_3 . Nach 1 h bei 4°C wurde eine sehr geringe Ausbeute mit 50 mM Na_2CO_3 erhalten. Mit 50 mM NaOH wurden keine Alkohol-fällbaren Materialien erhalten. Wenn die Extraktion 1 h bei Raumtemperatur durchgeführt wurde, wurde mit keinem der beiden Reagentien eine Ausbeute erhalten, was nahe legt, dass die Pektine unter diesen Bedingungen schnell abgebaut wurden.

[0063] Zusammengekommen zeigten diese Ergebnisse, dass die Extraktion mit EDTA bei pH 7,0–8,5 die wirksamste Extraktionsmethode für Aloe-Pektin ist. Mit dem in [Fig. 4](#) gezeigten sequenziellen RT-dann-HT-Extraktionsschema konnte eine hohe Ausbeute (40–50%, Gew./Gew.) verbunden mit der Herstellung von sowohl HMW- als auch LMW-Aloe-Pektinen erhalten werden. Die Einzigartigkeit dieses Extraktionsverfahrens war der höhere pH-Wert, der eingesetzt wurde (7,0–8,5). Der Grund für diesen höheren pH-Wert besteht darin, dass die Aloe-Pektine von Natur aus LM (siehe nachstehend) sind, die gegenüber der β -Eliminierung unter alkalischen Bedingungen beständiger sind, und dass EDTA bei einem pH über 7,0 besonders wirksam funktioniert. Zusätzlich ist EDTA bei einem pH über 7,0 löslicher und kann darum während der alkoholischen Fällung und der Waschschrte leichter entfernt werden.

[0064] Die grünen Rindenfasern brachten im Vergleich zu den Pulpe-Fasern bei Extraktion mit dem pH-8,0-EDTA eine ähnliche Ausbeute von Pektin hervor (Tabelle 6). Dieses Rindenpektin war genauso reich an Gal A (Tabelle 1). Die Menge von aus der Rinde erhaltenen Fasern war 10 Mal höher als diejenige aus der Pulpe (pro Einheit von Blättern) (Tabelle 6). Dies steht im Einklang mit der Tatsache, dass die Rinden, verglichen mit der Pulpe, aus viel kleineren Zellen bestanden ([Fig. 2](#) und [Fig. 3](#)). Zusammengekommen zeigen diese Ergebnisse, dass aus dem Rindenteil des Blattes, der derzeit von einigen Herstellern als Abfallmaterialien verworfen wird, eine sehr große Menge an Aloe-Pektin erhalten werden kann.

[0065] Zur Extraktion von LM/HMW-Aloe-Pektinen mit EDTA bei etwa Raumtemperatur liegt der pH-Arbeitsbereich anscheinend zwischen etwa 5 und etwa 8,5, vorzugsweise etwa 8–8,5. Zur Extraktion von LM/LMW-Aloe-Pektin mit EDTA bei erhöhter Temperatur, beispielsweise bei etwa 80°C, liegen die pH-Arbeitsbereiche anscheinend zwischen etwa 5 und etwa 8,5, vorzugsweise bei etwa 8,0. Bei einem pH von über 6,5 würde die EDTA-Extraktion der HM-Pektine aus anderen Quellen bei erhöhter Temperatur zum Abbau der Produkte führen. Zur Extraktion von Pektinen aus anderen pflanzlichen Quellen unter Verwendung von EDTA oder anderen Chelatbildnern betragen die angegebenen pH-Bereiche 4–6,5.

Pektinreinigung durch Ionenaustauscherchromatographie

[0066] Die Ionenaustauscherchromatographie wurde auf eine Pharmacia Biotech AKTA Explorer Chromatographiesystem durchgeführt. Die Säule waren drei Pharmacia Hi-trap Q 5-ml-Patronen, die hintereinander geschaltet waren. Die Aloe-Pektine wurden in Wasser bei 1 mg/ml gelöst und bei einer Fließgeschwindigkeit von 1 ml/min auf die Säule geladen. Nach Waschen mit 15 ml Wasser wurden die gebundenen Materialien mit einem linearen Gradienten von NaCl (0–1,0 M) eluiert. Das Säuleneluat wurde durch UV-Absorption bei 215, 254 und 280 nm kontrolliert. Die Fraktionen, die Pektin enthielten, bildeten Niederschläge, die durch Niedergeschwindigkeitszentrifugation gesammelt, vereinigt und wieder in Wasser gelöst wurden. Anschließend wurden sie durch Aufgeben auf eine Sephadex G-25-Säule entsalzt. Die Pektin-enthaltenden Fraktionen wurden gesammelt, getrocknet und bei Raumtemperatur gelagert.

Tabelle 1: Galacturonsäuregehalt von Aloe-Pektinen

Quelle der Zellwandfasern*	EDTA-Extraktionsbedingung ⁺	UA-Gehalt (%, Gew./Gew.)	DM [#] (%, mol/mol)	Phenol (%, Gew./Gew.)
Pulpe, BAM 20926 (AP B1)	leicht alkalisch, HT	64	-	-
Pulpe, BAM 20926 (AP B8)	sauer, HT	89	-	-
Pulpe, BAM 20926 (AP B8-2)	leicht alkalisch	85	-	-
Pulpe, BAM 10679 (AP B9)	sauer, HT	84	-	-
Pulpe, BAM 10679 (AP B9-2)	leicht alkalisch, HT	86	-	-
Pulpe, BAM 10679 (AP B10)	sauer, HT	69	-	-
Pulpe, BAM 10679 (AP B14)	sauer, HT	87	-	-
Pulpe, BAM 10679 (AP B15)	leicht alkalisch, RT	81	35	0,064
Pulpe, BAM 10679 (AP B15-2)	leicht alkalisch, HT	79	40	0,036
Pulpe, BAM 10679 (AP 10679)	leicht alkalisch, HT	77	9,4	0,05
Pulpe, roh (AP B16)	leicht alkalisch, RT	93	1,1	<0,03
Pulpe, roh (AP B16-2)	leicht alkalisch, HT	92	17,5	<0,03
Pulpe, roh (AP 97-1)	leicht alkalisch (RT & HT)	91	4,4	<0,03
Rinde, roh (AP-Rinde B1)	leicht alkalisch, RT	81	4	0,045
Rinde, roh (AP-Rinde B1-2)	leicht alkalisch, HT	84	9,5	0,041
Rinde, roh (AP-Rinde B2)	leicht alkalisch, RT	75	-	0,219

* Die Zahlen nach BAM (masseacetyliertes Mannan) sind die BAM-Chargennummern. Die Aloe-Pektin-Seriennummern sind in Klammern angegeben. -2 bezeichnet Pektine, die durch HT-Extraktion und anschließende RT-Extraktion erhalten werden.

⁺ leicht alkalisch, pH 7,0-8,5; sauer, pH 5,0; RT, Raumtemperatur, HT, Erhitzen.

[#] DM, Methylierungsgrad.

Tabelle 2: die unter verschiedenen Extraktionsbedingungen erhaltene Aloe-Pektin-Ausbeute (% , Gew./Gew.)

		Extraktionsbedingungen *		
Extraktions- temperatur ⁺		pH 7,0 EDTA und 20 mM pH 5,0 NaOAc (pH 5,0)	pH 7,0 EDTA (pH 6,4)	pH 8,0 EDTA (pH 7,7)
Bsp. 1	HT	22	26	32,3
Bsp. 2	RT (1h)	-	14,4	16
	HT	-	15	24,4
	Gesamtausbeute	-	29,4	40,4
Bsp. 3	RT (4 h)	28 (DM=30 %)	31,6 (DM=29 %)	30 (DM=19 %)
	HT	5,6	5,8	13,5
	Gesamtausbeute	33,6	37,4	43,5

* Die 5 mg/ml-Rohpulpefasersuspensionen wurden verwendet. Die Zahlen in Klammern geben den pH-Wert der Fasersuspensionen nach EDTA-Zugabe an.

⁺ RT, Raumtemperatur; HT, Erhitzen.

[#] DM, Methylierungsgrad

Tabelle 3: pH-Wert der Fasersuspensionen vor und nach Extraktion mit EDTA

Extraktionsbedingungen *			
	pH-7,0-EDTA und 20 mM pH-5,0-NaOAc	pH-7,0-EDTA	pH-8,0-EDTA
pH nach Zugabe von EDTA	5,0	6,4	7,7
pH nach RT-Extraktion	5,06	6,4	7,74
pH nach Resuspendieren und Zugeben von frischem EDTA und vor HT-Extrak- tion	5,15	6,8	8,56

* Die 5 mg/ml-Rohpulpefasersuspensionen wurden verwendet, die einen pH von 3,5 aufwiesen. RT, Raumtemperatur; HT, Erhitzen.

Tabelle 4: Weitere Bewertung der Auswirkung des pH-Werts auf die Aloe-Pektin-Ausbeute (% Gew./Gew.) mit EDTA-Extraktion

Faser- quelle	Extrak- tions- tempe- ratur ⁺	Extraktion unter Erhitzen in Gegenwart von EDTA*		
		pH 5,0 (pH-7,0-EDTA in 20 mM pH-5,0-NaOAc)	pH 7,7 (pH-8,0-EDTA allein)	pH 8,5 (pH-8,0-EDTA und pH- Einstellung mit NaOH)
Pulpe, roh	HT	18 (DM = 27 %) [#]	32,4 (DM = 29 %)	44,8 (DM = 30 %)
Rinde, roh	RT	26 (DM = <10 %)	26 (DM = <10 %)	32 (DM = <10 %)

* Die 5 mg/ml-Fasersuspensionen wurden verwendet.

⁺ RT, Raumtemperatur; HT, Erhitzen.[#] DM, Methylierungsgrad

Tabelle 5: Aloe-Pektin-Ausbeuten, erhalten mit einer Nicht-EDTA-Extraktion

	Extraktionsbedingungen *				
	Erhitzen in Wasser	Erhitzen bei pH 1,5, (eingestellt mit HCl)	Erhitzen bei pH 6,5 (pH-6,5-PBS)	50 mM Na ₂ CO ₃ (pH 10,5) bei 4 °C, 1 h	50 mM, Na ₂ CO ₃ (pH 10,5) bei RT, 1 h
Ausbeute (%, Gew./Gew.)	0	9,6	10,6	7,5	0

* Die 5 mg/ml-Rohpulpefasersuspensionen wurden verwendet.

Tabelle 6: Extraktion von Aloe-Pektin aus grünen Rindenfasern

	frische Aloe-Vera-Blätter	
	Pulpe	Rinde
	pH 7,0 EDTA und 20 mM	pH 8,0 EDTA
	pH 5,0 NaOAc	
Nassgewicht nach Trennung	188 g (33 %)	376 g (67 %)
Fasern, erhalten nach Homogenisierung, Sieb-Nr.-18-Filtration und Waschen	0,34 g	5,23 g
Pektin-Ausbeute*		
EDTA-RT (1. Durchgang)	10,8 % (Gew./Gew.)	17,5 % (Gew./Gew.)
EDTA-HT (2. Durchgang)	26,4 % (Gew./Gew.)	25,5 % (Gew./Gew.)
gesamt	37,2 % (Gew./Gew.)	43 % (Gew./Gew.)
Pektinpulverfarbe	weiß - schmutzigweiß	hellgrün - braun

* Die Fasern wurden bei 5 mg/ml extrahiert, und die RT-Extraktion wurde 1 h gerührt.

BEISPIEL 5

Uronsäuretest

[0067] Der Uronsäuretest auf m-Hydroxyldiphenyl-Basis wurde durchgeführt wie von Blumenkranz und Asboe-Hansen (1973, Analytical Biochemistry 54, Ss. 484–489 beschrieben. Kurz gesagt, wurden die Proben oder Standards in 200 µl pyrogenfreiem Wasser mit 1,2 ml konzentrierter H_2SO_4 , die 0,0125 M Natriumtetraborat enthielten, vermischt und sodann sofort auf Eis gegeben. Die Proben wurden 5 min in siedendem Wasser gehalten und anschließend in einem Wasser-Eisbad abgekühlt. Jeder Umsetzung wurden anschließend 20 µl 0,15% (Gew./Vol.) m-Hydroxyldiphenyl in 0,5% NaOH zugesetzt. Nach dem Mischen wurden die Proben 30 min bei Raumtemperatur gehalten. Dann wurde die Extinktion bei 520 nm bestimmt. Gal A wurde zur Erstellung einer Standardkurve (0, 1, 2, 4, 6, 8 und 10 µg) verwendet. Mannose wurde als Neutralzucker-Kontrolle verwendet. Sämtliche Proben wurden bei 20 µg oder weniger getestet.

[0068] Der durchschnittliche Gal-A-Gehalt der verschiedenen Aloe-Pektine lag oberhalb von 70% (Tabelle 1). Es exisitierten keine wesentlichen Unterschiede zwischen dem Gal-A-Gehalt von unter verschiedenen Bedingungen extrahierten Pektinen.

BEISPIEL 6

Zuckerzusammensetzung und Verknüpfungsanalyse

[0069] Fluorophore-Assisted Carbohydrate Electrophoresis ("FACE") ist als schnelle und einfache Technik zur Zuckerzusammensetzungsanalyse bekannt. Sie erlaubt die anfängliche Überprüfung und den Vergleich verschiedener Proben und wurde nach dem Verfahren durchgeführt, das mit dem FACE-Zuckerzusammensetzung-Analysekit (Glyco, Inc.) bereitgestellt wurde. Kurz gesagt wurden die Polysaccharide mit 2 N Trifluoressigsäure (TFA) bei 100°C 5 h hydrolysiert und sodann mit einem fluoreszierenden Farbstoff (AMAC, 2-Amino-

acridon) markiert und elektrophoresiert. Die Kohlehydratbanden wurden unter einem UV-Licht (Fotodyne 3-3000) sichtbar gemacht. Neben den Neutralzuckerstandards, die in dem Kit bereitgestellt waren, wurden auch Gal A und Glc A verwendet.

Zusammensetzungsanalyse durch TMS-Derivatisierung

[0070] Die Proben wurden in 2 N TFA 6 h bei 105°C einer wässrigen Vorhydrolyse unterzogen. TFA wurde durch Eindampfen unter Stickstoff entfernt, und mit dem teilweise hydrolysierten Kohlehydrat-Rückstand wurde eine Methanolyse in 2 N methanolischer HCl 16 h bei 80°C zur vollständigen Hydrolyse unter Bildung von Methylglycosiden durchgeführt. Die methanolische HCl wurde unter Stickstoff entfernt, und mit den Methylglycosiden wurde eine N-Acetylierung in Methanol-Pyridin-Essigsäureanhydrid 6 h bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Lösungsmittel wurden eingedampft, und die Rückstände wurden unter Verwendung von Tri-Sil bei 80°C 20 min trimethylsilyliert. Die resultierende TMS-Methylglycoside wurden durch GC-MS unter Verwendung einer 30 m DB-5-Kapillarsäule, ausgestattet mit einem selektiven Massendetektor, analysiert.

Verknüpfungsanalyse

[0071] Es wurde das Hakomori-Verfahren (Hakomori, Journal of Biochemistry, 1984, 55, Ss. 205–212) zur Methylierung mit superdeuterierter Reduktion verwendet. Die Proben wurden in DMSO suspendiert und bei 60°C für 36 h einer Ultraschallung in einem Ultraschallbad unterzogen. Die Proben wurden anschließend unter Verwendung von Kaliummethylsulfonylcarbanion (3,6 M) methyliert, und anschließend wurde ein 50- bis 100-facher Überschuss von Methyljodid zugesetzt. Das teilweise methylierte Material wurde durch Umkehrphasen-Patronenchromatographie isoliert und einer Carboxylreduktion unterzogen. Sodann wurden die Proben gereinigt und nach dem Hakomori-Verfahren der Remethylierung unterzogen. Anschließend wurden die Proben hydrolysiert und in teilweise methylierte Alditolacetate übergeführt. Die resultierenden PMAA-Derivate wurden unter Verwendung einer 30 m SP-2300 Kapillarsäule durch GC-MS analysiert.

[0072] Die Zuckerzusammensetzungsanalyse unter Verwendung von FACE zeigte, dass das extrahierte Pektin im Vergleich zu den Zellwandfasern reicher an Gal A war. Die ausführlichen Zusammensetzungen wurden mit TMS-Derivatisierung und GC-MS-Analyse erhalten. In Tabelle 7 sind die Zuckerzusammensetzungen von drei Proben AP 10679, AP 10679 (gereinigt wie in Beispiel 4 beschrieben) und AP97-1 dargestellt (siehe auch Tabelle 1). Die Probe AP 10679 wurde durch HT-Extraktion aus Alkohol-behandelten Fasern, wie in Beispiel 3 beschrieben, erhalten. Probe AP97-1 war eine Versuchsprobe, extrahiert aus nicht Alkohol-behandelten Rohfasern. Die Fasern wurden zweimal bei Raumtemperatur und durch eine anschließende HT-Extraktion extrahiert. Die unter den beiden Extraktionsbedingungen erhaltenen Pektine wurden vereinigt, und das Verhältnis der bei RT extrahierten Pektine zu denjenigen der HT-Extraktion betrug ca. 2:1.

Tabelle 7. Zuckerzusammensetzungen (% , Mol/Mol) Aloe-Pektine

	AP 10679 (5)*	AP 10679 (gereinigt) (5)	AP 97-1 (5)
Ara	4,2	1,8	4,0
Rha	11,1	4,4	10,3
3-Me-Rha	0,8	0,5	0,8
Fuc	0,6	0,4	0,6
Xyl	3,9	1,2	2,4
Man	1,6	0,3	3,5
Gal	8,5	6,8	14,8
Glc	1,1	0,7	0,4
Gal A	67,5	83	63,2
DM	LM(9, 4) (natürlich)	LM (natürlich)	LM(4, 4) (natürlich)
Dac	9,0	2,8	9,1
Gesamtphenol (%, w/w)	0,058	-	<0,03
Rha/Gal A	0,16	0,05	0,16
Gal/Gal A	0,13	0,08	0,23

* Die Zahl in Klammer ist die Bezugsziffer. Siehe Liste der Literaturhinweise am Ende von Tabelle 12.

[0073] Die Zuckerzusammensetzungsanalyse zeigte, dass Gal A der Hauptzucker war, 67% in AP 10679 und 63,2% in AP 97-1. Rhamnose und Galactose sind die am reichlichsten vorhandenen Neutralzucker, die 10 bis 11% bzw. 8,5 bis 14,8% ausmachen. Unter den kleineren Neutralzuckern wurde ein modifizierter Zucker, 3-OMe-Rhamnose, nachgewiesen, der etwa 10% der gesamten Rhamnose ausmachte. Die Zuckerzusammensetzungen waren zwischen den beiden Proben sehr ähnlich, mit Ausnahme einer kleinen Menge (< 0,5%) GalNAc und Glycerin, das in AP 10679 nachgewiesen wurde.

[0074] Das gereinigte AP 10679 zeigte einen angereicherten Gal-A-Gehalt und einen verminderten Neutralzuckergehalt, was nahe legt, dass einige der in der ungereinigten Probe nachgewiesenen Neutralzucker nicht mit dem Pektin assoziiert sein können. Rhamnose und Galactose war immer noch die am reichlichsten vorhandenen Neutralzucker. Die 3-OMe-Rhamnose war ebenfalls noch vorhanden und machte wiederum ca. 10% der gesamten Rhamnose aus.

[0075] Die Zuckerverknüpfungsdaten für AP 10679 und AP 97-1 sind in den Tabellen 8 und 9 gezeigt. Die nachgewiesenen Hauptverknüpfungen waren 1,4-verknüpftes Gal A und 1,2-verknüpfte Rhamnose. Die 1,4-Verknüpfung für Gal A ist die Gleiche wie für die anderen Pektine. Für Gal A wurde keine andere Verknüpfung nachgewiesen (Tabellen 8 und 9). Neben der 1,2-Verknüpfung waren die Rhamnoseresste auch 1,2,4-verknüpft, mit einem kleinen Teil (0,6 oder 0,7%), der 1,2,3-verknüpft war. Die Rhamnose mit den 1,2- und 1,2,4-Verknüpfungen machte den Hauptteil der gesamten Rhamnoseresste aus, was nahe legt, dass sich der größte Teil der nachgewiesenen Rhamnoseresste in der Pektinhauptkette befindet. Da die 1,2,4-verknüpfte Rhamnose in beiden Proben viel häufiger vorkam als die 1,2,3-verknüpfte, sind darum die Neutralzucker-Sei-

tenketten am wahrscheinlichsten mit der Hauptkette in der O-4-Position der Rhamnosereste verknüpft.

Tabelle 8. Glycosylverknüpfung in AP 10679

Monosaccharid	Verknüpfung	% Gesamtfläche*	Flächenverhältnis
Arabinose	terminal (fur)	7,2	0,39
	terminal (pyr)	0,6	0,03
	5-verknüpft (fur)	1,1	0,06
	2-verknüpft (pyr)	0,7	0,04
	2,3-verknüpft (pyr)	0,6	0,03
Rhamnose	terminal	4,0	0,22
	2-verknüpft	14,7	0,8
	3-verknüpft	2,2	0,12
	2,3-verknüpft	0,7	0,04
	2,4-verknüpft	6,3	0,34
Xylose	terminal	5,5	0,3
	4-verknüpft	4,8	0,26
	2,4-verknüpft	1,2	0,07
Fucose	terminal	3,9	0,21
	3,4-verknüpft	1	0,05
Mannose	terminal	1,2	0,07
	4-verknüpft	4	0,22
Galactose	terminal	5,7	0,31
	3,4-verknüpft	1,4	0,06
	3,6-verknüpft	0,6	0,03
	4,6-verknüpft	0,5	0,03
Glucose	4-verknüpft	2,5	0,14
Galacturonsäure	terminal	2,8	0,15
	4-verknüpft	18,3	1
Glucuronsäure	terminal	2,6	0,14
	2-verknüpft	2,3	0,13
	2,4-verknüpft (Gal UA/GlcUA)	0,9	0,05

* % der Gesamtfläche normiert auf 1,4-verknüpfte Galacturonsäure

Tabelle 9. Glycosylverknüpfung in AP 97-1

Monosaccharid	Verknüpfung	% Gesamtfläche*	Flächenverhältnis
Arabinose	terminal (fur)	6,2	0,34
	terminal (pyr)	0	0
	5-verknüpft (fur)	1,6	0,09
	2-verknüpft (pyr)	0,8	0,04
	2,3-verknüpft (pyr)	0,7	0,04
Rhamnose	terminal	3,8	0,21
	2-verknüpft	11,1	0,61
	3-verknüpft	1,5	0,08
	2,3-verknüpft	0,6	0,03
	2,4-verknüpft	10,7	0,58
Xylose	terminal	6,9	0,38
	4-verknüpft	2,9	0,16
	2,4-verknüpft	1,1	0,06
Fucose	terminal	3,3	0,18
	3,4-verknüpft	0,8	0,04
Mannose	terminal	2,7	0,15
	4-verknüpft	8,2	0,45
Galactose	terminal	5,3	0,29
	3,4-verknüpft	1,5	0,08
	3,6-verknüpft	0,5	0,03
	4,6-verknüpft	0,6	0,03
Glucose	4-verknüpft	1,7	0,09
Galacturonsäure	terminal	2,6	0,14
	4-verknüpft	18,3	1
Glucuronsäure	terminal	2,3	0,12
	2-verknüpft	2,5	0,14
	2,4-verknüpft (Gal UA/GlcUA)	0,9	0,05

* % der Gesamtfläche normiert auf 1,4-verknüpfte Galacturonsäure

Tabelle 10. Zuckerzusammensetzung (% Mol/Mol) von Aloe-Pektin im Vergleich mit im Handel erhältlichen Pektinen (ungereinigt)

	AP 10679 (5)*	AP 97-1 (5)	Apfel (1)	Apfel K (9)	Apfel U (9)	Zitrone A (4)	Zitrone B (4)	Citrus (8)	Citrus (2)	Zuckerrübe (6)	
Ara	4,2	4,0	1,4	7,23	3,42	2,9	2,7	1,44	3,3	13,2	
Rha	11,1	10,3	2,9	2,03	1,83	1,8	1,4	1,74	1	3,2	
3-Me-Rha	0,8	0,8	-	-	-	-	-	-	-	-	
Fuc	0,6	0,6	-	-	-	-	-	-	-	-	
Xyl	3,9	2,4	2,2	1,24	0,46	0,17	0,16	0,16	0,1	0,3	
Man	1,6	3,5	tr	0,11	0,11	0,17	0,16	0,21	0,2	0,3	
Gal	8,5	14,8	3,4	9,6	7,43	6,0	6,7	5,41	4,8	7,1	
Glc	1,1	0,4	4,7	18,87	8,57	0,5	0,87	0,89	0,6	0,4	
Gal A	67,5	63,2	85	64	76,68	88	88	90,2	90	58,8	
DM	LM(9,4) (natürlich)	LM (4,4) (natürlich)	LM (28)	LM (42)	HM (73,6)	HM (71,5)	HM (72)	-	HM (71,4)	HM (66,6)	
DAC	9	9,1		-	-	1,4	1,6	-	<1	25,4	
Rha/Gal A	0,16	0,16	0,034	0,004	0,015	0,02	0,016	0,016	0,011	0,054	
Gal/Gal A	0,13	0,23	0,04	0,15	0,1	0,068	0,076	0,06	0,053	0,12	
Pulverfarbe	weiß / schmutzigweiß	hellbraun			hellgelb / braun						hellbraun
Lösungsklarheit	klar				trüb						trüb

* Bezugsziffer. Siehe Liste der Literaturhinweise am Ende von Tabelle 12.

Tabelle 11. Zuckerzusammensetzung (% Mol/Mol) von gereinigtem Aloe-Pektin im Vergleich zu anderen gereinigten Pektinen

	AP 10679 (gereinigt)/ Chela* (5)#	Citrus/Säure* (15)	Citrus/Säure (2)	Apfel/ Chela (11)	Apfel/ Säure (9)	Apfel/ Säure (9)	Apfel/ Säure (9)	Apfel/ Chela (12)	Zuckerrübe/ Säure (13)	Zuckerrübe/ Chela (13)	Zuckerrübe/ Chela (11)
Ara	1,8	1,9	1,8	13	2,77	2,1	2,1	4	9,8	2,9	16
Rha	4,4	0,6	0,7	2	1,16	0,58	0,58	1	3,1 (+Fuc)	1,1 (+Fuc)	2
3-Me-Rha	0,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fuc	0,4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	tr
Xyl	1,2	0,2	0,1	1	1,04	0,35	0,35	1	0,3	0,3	tr
Man	0,3	0,1	-	-	0,11	-	-	tr	0,06	0,02	-
Gal	6,8	2,7	3,2	3	5,2	5,02	5,02	3	4	3,3	6
Glc	0,7	0,2	0,2	1	2,08	1,75	1,75	1	0,2	0,3	tr
Gal A	83	66,3	94	88	87,38	89,95	89,95	90	82	92	76
DM	LM (natürlich)	HM (79,1)	HM (72)	-	HM (75,8)	HM (72,3)	HM (72,3)	-	HM (62)	HM (60)	-
Dac	≤2,8	2	<1	-	-	-	-	-	35	15	-
Rha/Gal A	0,053	0,009	0,007	0,022	0,013	0,006	0,006	0,011	(0,038)	(0,012)	0,026
Gal/Gal A	0,08	0,04	0,034	0,034	0,06	0,06	0,06	0,033	0,0	0,036	0,078

* Chela, extrahiert mit Chelatbildner

+ Säure, extrahiert unter der sauren Bedingung

Bezugsziffer. Siehe Liste der Literaturhinweise am Ende von Tabelle 12.

Tabelle 12. Zuckerzusammensetzung (% Mol/Mol) von Aloe-Pektinen im Vergleich zu anderen mit Chelatbildnern extrahierten Pektinen

	AP 10679 (5)*	AP 97-1 (5)	Apfel (14)	Apfel (12)	Apfel (11)	Citrus (10)	Raps (3)	Sonnen- blume (8)	Zuckerrübe (12)	Zuckerrübe (15)	Kartoffel (7)
Ara	4,2	4,0	28	15	4,9	4	27	0,75	25	15	2,8
Rha	11,1	10,3	3	2,9	1,6	1	2,0	1,77	2,5	2,2 (+fuc)	2,2
3-Me-Rha	0,8	0,8	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fuc	0,6	0,6	0,01	0,1	-	-	0,6	-	-	-	0,3
Xyl	3,9	2,4	4	3,9	1,4	<1	8,2	0,31	-	0,6	0,5
Man	1,6	3,5	1	-	tr	1	3,0	0,1	-	0,3	1,3
Gal	8,5	14,8	8	8,4	6,5	2	9,2	0,68	7,7	5	14,6
Glc	1,1	0,4	1	1,2	3,9	2	3,2	1,18	-	0,7	0,9
Gal A	67,5	63,2	55	67,4	81	90	47	95,6	64,1	76	77,3
DM	LM (9,4) (natürlich)	LM (4,4) (natürlich)	HM (82)	HM (75)	HM (60)	HM (79)	-	LM (38,5) (natürlich)	HM (58)	HM (64)	~50%
DAC	9,0	9,1	13	12	2	2	-	2,01	33	20,6	-
Rha/Gal A	0,16	0,16	0,055	0,043	0,019	0,011	0,045	0,008	0,039	0,029	0,028
Gal/Gal A	0,13	0,23	0,15	0,12	0,08	0,02	0,19	0,01	0,12	0,066	0,189

* Bezugsziffer. Siehe Liste der Literaturhinweise auf der nächsten Seite.

Literaturliste für die Tabellen 7, 10, 11 und 12

1. Axelos, M. A. V. und Thibault, J.F. (1991). *Int. J. Biol. Macromol.* 13, 77-82.
2. Axelos, M. A. V., Thibault, J.F., und Lefebvre, J. (1989), *Int. J. Biol. Macromol.* 11, 186-191
3. Eriksson, I., Andersson, R., und Aman, P. (1997), *Carbo. Res.* 301, 177-185.
4. Kravtchenko, T.P., Voragen, A.G.J., und Pilnik, W. (1992), *Carbo. Polymers* 18, 17-23, 1992.
5. Analysis reports on Aloe pectins from Complex Carbohydrate Research Center at University of Georgia.
6. Guillon, F. und Thibault, J-F. (1990). *Carbo. Polymers* 12, 353-374.
7. Jarvis, M.C., Hall, M.A., Threlfall, D.R. und Friend, J. (1981). *Planta* 152, 93-100.
8. Miyamoto, A. und Chang, K.C. (1992). *J. Food Sci.* 57, 1439-1443.
9. Pilnik, W. (1981). *APRIA symposium on fiber in human nutrition*. P. 91, Paris.
10. Ros, J.M., Schols, H.A., und Voragen, A.G.J. (1996). *Carbo. Res.* 282, 271-284.
11. Renard, C.M.G.C., Voragen, A.G.J., Thibault, J.F., und Pilnik, W. (1990). *Carbo. Polymers* 12, 9-25.
12. Renard, C.M.G.C. und Thibault, J-F. (1993). *Carbo.Res.* 244, 99-114.
13. Rombouts und Thibault (1986). *Carbo Res.* 154, 177-187.
14. Schols et al (1995). *Carbo. Res.* 275, 343-360.
15. Thibault, J.F. (1988). *Carbo. Polymers* 8, 209-223.
16. Thibault, J-F und Dreu, R.D., Geraeds, C.C.J.M., und Rombouts, F.M. (1988). *Carbo. Polymers* 9, 119-131,

[0076] Die Verknüpfungsexperimente wiesen auch Glc A nach, die nicht in den Zusammensetzungsexperimenten nachgewiesen wurde, da ihr Peak durch diejenigen des viel stärkeren Gal-A-Peaks überlagert wurde (Tabellen 8-9). Bei anderen Zuckern war Galactose entweder 1,3,4- oder terminal verknüpft, wobei ein kleiner Teil 1,3,6- oder 1,4,6-verknüpft war, Arabinose(fur) war entweder 1,5- oder terminal verknüpft, Arabinose(pyr) war 1,2-verknüpft, Fucose 1,3,4-verknüpft, Xylose 1,4-verknüpft, Mannose hauptsächlich 1,4-verknüpft, Glucose 1,4-verknüpft und Glc A 1,2-verknüpft. Die 1,4-verknüpfte Mannose ist in der Verknüpfung dem Mannan ähnlich, das in dem Flüssiggel im Inneren von Pulpe-Mesophyllzellen gefunden wurde. Somit konnte die Gegenwart von 1,4-verknüpfter Mannose das Ergebnis eines flüssigen Restgels sein, das immer noch mit den

Mesophyllzellwandfasern assoziiert war.

BEISPIEL 7

Saure Polysaccharid-Gelelektrophorese

[0077] Die Gelelektrophorese zur Auftrennung von sauren Polysacchariden wurde wie von Misevic (Misevic, Methods in Enzymology, 1989, 179, Ss. 95–110) beschrieben unter Verwendung des Bio-Rad-Minigelgeräts durchgeführt. Tris-Borsäure (pH 9,0) wurde sowohl als Gel- als auch als Laufpuffer verwendet. Ein 15%iges Polyacrylamidgel wurde als optimal befunden. Die Gele wurden mit Alcianblau angefärbt und mit 2% (Vol./Vol.) Essigsäure entfärbt.

BEISPIEL 8

Enzymabbau von Aloe-Pektin

[0078] Aloepektin wurde in 50 mM Natriumacetatpuffer (pH 5,0) gelöst. Endopolygalactunorase (EC3.2.1.15) wurde in verschiedenen Konzentrationen (0,25–25 mU) zugesetzt. Nach 1 h Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Proben sofort mit dem Probenpuffer (pH 9,0) gemischt und durch saure Polysaccharid-Gelelektrophorese wie vorstehend beschrieben aufgetrennt.

[0079] Endo-Polygalactunorase ist auf 1,4- α -verknüpfte Gal-A-Reste in Pektine spezifisch. Die Ergebnisse zeigten, dass dieses Enzym Aloe-Pektin dosisabhängig abbaut, je höher die Enzymkonzentration desto kleiner die Größe der Pektin-Restmoleküle, wie durch die schnellere Wanderung in dem Gel gezeigt. Es wurde keine Wirkung auf Heparin, eine Nichtpektinkontrolle, festgestellt. Dieses Ergebnis bestätigte die 1,4-Verknüpfung zwischen den Gal-A-Resten in Aloe-Pektin und zeigte auch, dass die Konfiguration dieser Verknüpfung α ist.

BEISPIEL 9

Acetylierung, Methylierung und Gesamtphenol

Acetylierung und Methylierung

[0080] Die Acetylgruppen wurden durch Derivatisierung mit Hydroxylamin-HCl und Fe(III)/Säure nachgewiesen. Acetylcholin (0,001–0,0005 N) wurde als Standard verwendet. Die Proben wurden in verschiedenen Konzentrationen (0,2–0,8 mg/ml) getestet. Sowohl Proben als auch Standards wurden in 1 ml 0,001 N Acetatpuffer hergestellt und mit 2 ml Hydroxylamin-HCl-Reagens (2 M Hydroxylamin-HCl, gemischt 1:1 mit 3,5 N NaOH) gemischt. Nach etwa 1 min wurde 1 ml 4 N HCl zugesetzt. Nach einer weiteren Minute wurde 1 ml 0,037 Eisen(III)-chlorid (0,1 N HCl) zugesetzt. Nach dem Mischen wurde die Extinktion bei 540 nm gemessen. Die Menge an Acetylgruppen in Mol wurde durch Extrapolieren gegen die lineare Regressionskurve des Standards bestimmt. Der Acetylierungsgrad (DAc) der Pektine wurde als % (Mol/Mol) von Gal A ausgedrückt.

[0081] Der Methylierungsgrad (DM) wurde unter Verwendung des selektiven Reduktionsverfahrens, das von Maness beschrieben wird (Maness, Analytical Biochemistry, 1990, 185, Ss. 346–352), mit Modifikationen bestimmt. Die Pektinproben wurden in 1 M Imidazol-HCl-Puffer (pH 7,0) hergestellt. Für jeden Test wurde 1 mg Probe in 400 μ l verwendet. NaBH₄ (40 mg) wurde zugesetzt, und die Probe wurde 1 h auf Eis gehalten, um die Methyl-veresterten Gal-A-Reste selektiv zu reduzieren. Anschließend wurde zur Entfernung des restlichen NaBH₄ 0,1 ml Essigsäure zugesetzt. Die Probe wurde mit 0,5 ml Wasser verdünnt, und die Pektine wurden mit 4 Volumina 95% Ethanol ausgefällt. Nach dem Trocknen wurde die Probe in Wasser gelöst, und der Gal-A-Gehalt wurde wie vorstehend beschrieben bestimmt. Die Kontrolle durchlief die gleichen Schritte, mit der Ausnahme der Zugabe von NaBH₄. DM wurde durch die folgende Formel bestimmt: $DM = [(Mole \text{ von Gal A in der Kontrolle-Mole von Gal A, reduziert}) / Mole \text{ von Gal A in der Kontrolle}] \times 100$.

[0082] Es wurde festgestellt, dass die alkoholische Fällung und die Trocknungsschritte weggelassen werden konnten, ohne die Ergebnisse zu beeinflussen. Somit wurden nach Zugabe von Essigsäure 9,5 ml Wasser zugesetzt, was eine Pektinkonzentration von 0,1 mg/ml oder 20 μ g/200 μ l – die obere Grenze für den Uronsäuretest – ergab.

Bestimmung des Gesamtphenols

[0083] Das von Rombouts und Thibault beschriebene Verfahren (Carbohydrate Research, 1986, 282, Ss. 271–284) wurde verwendet. Die Pektinproben wurden in 0,6 ml Wasser mit 0,6 ml Folin-Ciocalteu-Reagens gemischt. Nach 3 min wurde 0,6 ml 1 M Natriumcarbonat zugesetzt. Die Gemische wurden 1 h bei Raumtemperatur belassen, bevor die 750-nm-Extinktionswerte bestimmt wurden. Ferulasäure wurde als Standard zugesetzt. Nachdem die Pektinproben mit den Reagentien gemischt waren, bildeten sich einige Niederschläge. Sie waren anscheinend farblos und wurden durch Zentrifugation bei 3000 U/min 15 min vor der Extinktionsmessung bei 750 nm entfernt.

Methylierung, Acetylierung und Gesamtphenol

[0084] Die mit der selektiven Reduktionsmethode erhaltenen Ergebnisse zeigten, dass Aloe-Pektine einen DM unter 40% und oft < 10% aufwiesen (Tabelle 1). Die DM von 2 Pektinproben (Citrus LM und Citrus HM) von Sigma Chemical Co. wurden durch dieses Verfahren als 24% ($\pm 3,5$) und 58% ($\pm 3,5$) bestimmt, was mit den Werten (28% bzw. 64%) im Einklang stand, die von der Lieferfirma bereitgestellt wurden.

[0085] Es wurde festgestellt, dass Aloe-Pektine, die durch RT-Extraktion erhalten wurden, einen DM aufwiesen, der im Vergleich zu denjenigen, die durch HT-Extraktion erhalten wurden, um 5–10% niedriger war (Tabelle 1). Es wurde ebenfalls festgestellt, dass die RT-Extraktion bei pH 7,7 Pektin mit einem im Vergleich zu demjenigen durch RT-Extraktion bei pH 5,0 oder 6,4 einen um ca. 10% niedrigeren DM erzeugte (Tabelle 2). Diese letztere Feststellung stand anscheinend mit der Tatsache im Einklang, dass ein zunehmender pH bei RT die Demethylierungsreaktion gegenüber der β -Eliminierung begünstigt. Es wurde kein Unterschied festgestellt, wenn die HT-Extraktion bei verschiedenen pH-Werten (5,0 bis 8,5) durchgeführt wurde (Tabelle 4).

[0086] Das Rindenpektin war ebenfalls LM (Tabelle 1). In der Tat zeigten sie durchgehend einen DM unter 10% (Tabellen 1 und 4). Dies legt nahe, dass die Rindenpektine natürlicherweise einen noch niedrigeren DM im Vergleich zu denjenigen der Pulpepektine aufweisen können.

[0087] Die Acetylierung wurde mit einem chemischen Verfahren, wie vorstehend beschrieben, nachgewiesen. AP 10679 und AP 97-1 zeigte einen DAc von 9,0% bzw. 9,1%, allerdings wurde der DAc von gereinigtem AP 10679 als < 2,8% festgestellt. Dies legt nahe, dass das Aloe-Pektin ebenfalls einen geringen Acetylierungsgrad besaß (Tabelle 7).

[0088] Aloepektine besaßen eine sehr geringe Menge an Phenolen (0 bis 0,22%, Gew./Gew.)(Tabelle 1).

BEISPIEL 10

Molekulargewichtsbestimmung durch Größenausschlusschromatographie (SEC)

[0089] Die SEC wurde unter Verwendung von einer TSK-Gel G5000 PWXL-Säule (Toso Haas) durchgeführt. Die Proben wurden bei 0,3 mg/ml in Wasser mit 0,05% (Gew./Vol.) Natriumacid hergestellt. 50 μ l der Probe wurden injiziert und mit 0,05% Natriumacid bei 1 ml/min eluiert. Der Brechungsindex wurde on line gemessen. Pullulane ($4,04 \times 10^5$, $7,88 \times 10^5$ und $1,66 \times 10^5$ Da) wurden als Standards verwendet. Das Molekulargewicht wurde gegen die lineare Regressionskurve der Standards berechnet.

[0090] Die Aloe-Pektine zeigten im Allgemeinen nur einen Hauptpeak. Dies steht mit der Feststellung über andere Pektine im Einklang. Aloe-Pektine, die durch RT-Extraktion erhalten wurden, besaßen ein mittleres Molekulargewicht von $1,1 \times 10^6$ (0,785 bis $1,36 \times 10^6$ Da), das ca. 5 Mal größer war als die mittlere Größe $1,9 \times 10^5$ (0,375– $6,08 \times 10^5$ Da) der durch HT-Extraktion erhaltenen. Die mit HT aus den Restfasern der RT-Extraktion extrahierten Pektine besaßen eine ähnliche Molekülgröße wie diejenigen, die mit HT aus frischen Fasern extrahiert wurden.

[0091] Die Größe der Pektine wurde ebenfalls durch saure Polysaccharid-Gelelektrophorese analysiert. Die aus der Gelelektrophorese erhaltenen Profile standen mit den durch Größenausschlusschromatographie erhaltenen Ergebnissen im Einklang, d.h. die Größe der durch RT-Extraktion erhaltenen Pektine waren viel größer (wanderten viel langsamer im Gel) als diejenige der HT-Extraktion. Unter Verwendung dieser Technik wurde auch festgestellt, dass mit HT bei niedrigem pH (5,0) extrahierte Pektine eine mit denjenigen vergleichbare Größe aufwiesen, die durch RT-Extraktion erhalten wurden. Dies legt nahe, dass der pH der besonders wichtige Faktor bei der Bestimmung der Größe der erhaltenen Pektine ist, obwohl das Erhitzen ebenfalls wichtig

ist. Diese Feststellungen stehen im Einklang mit den allgemeinen Eigenschaften der Pektine, d.h. sie sind bei niedrigem pH (3–4) und niedriger Temperatur am stabilsten.

[0092] Zusammen werden die durch RT-Extraktion oder HT-Extraktion bei niedrigem pH (5,0) erhaltenen Pektine als hochmolekulare (HMW) Pektine und diejenigen, die durch HT-Extraktion bei pH 7,0 oder darüber erhalten wurden, werden als niedermolekulare (LMW) Pektine klassifiziert. Somit können leicht 2 Klassen von Pektinen, die durch die Größe unterschieden werden, durch Veränderung der Extraktionstemperatur erhalten werden. Dies konnte am Besten durch das folgende in [Fig. 4](#) ausgeführte sequentielle Extraktionsschema erreicht werden.

[0093] Die mittlere Größe von HWM-Aloe-Pektinen ($1,1 \times 10^6$ Da) ist viel größer als diejenige von handelsüblichen Pektinen ($0,7\text{--}1,4 \times 10^5$ Da), was derjenigen von LM-Aloepektinen nahe kommt. Zur Bestätigung dieses Größenunterschiedes wurden 3 handelsübliche Citrus-Pektinproben, eine LM (P-9311, Charge 74H1092; Sigma Chemical Co.) und zwei HM (P-9436, Charge 96H0788; Sigma Chemical Co. und PE100, Charge JR071, Spectrum Chemical Co.) unter den gleichen Bedingungen durch SEC analysiert. Ihre Größen reichten von $2,0\text{--}4,6 \times 10^5$ Da, was viel niedriger war als diejenigen der HMW-Aloe-Pektine. Die Größe der Citrus-Pektine ist in der Regel größer als diejenigen von Apfel-Pektinen (Pilnik und Voragen, *Advances in Plant Biochemistry and Biotechnology*, 1992, 99, Ss. 219–270).

BEISPIEL 11

Viskosität

[0094] Die intrinsischen Viskositäten wurden unter Verwendung des Ubbelohde-Viskosimeters (Nr. 2) bestimmt. Die Pektine wurden in 0,1 M NaCl bei einer Konzentration von 0,005–0,2% (Gew./Vol.) bestimmt (Owens, *Journal of the American Chemical Society*, 1946, 68, Ss. 1628–1632; Axelos, *International Journal of Biological Macromolecules*, 1989, 11, Ss. 186–191). Die intrinsische Viskosität (η) wurde unter Verwendung der doppelten Huggins ($\eta_{sp}/c = \eta + k^1\eta^2c$) und Kraemer ($(\ln\eta_{rel})/c = \eta + k^2\eta^2c$)-Extrapolation (auf die Konzentration 0) (Axelos und Thibault, *International Journal of Biological Macromolecules*, 1989, 11, Ss. 186–191; Doublier und Cuvelier, *Carbohydrates in Food*, Hrsg. A. C. Eliasson, Marcel Dekker, New York, 1996, Ss. 283–318) berechnet. Die Mittelwerte der mit diesen beiden Gleichungen erhaltenen Zahlen sind in Tabelle 13 im Vergleich mit MW dargestellt.

[0095] Die höchste intrinsische Viskosität (978 ml/g) wurde mit einem Rindenpektin, das durch RT-Extraktion erhalten wurde, festgestellt. Die intrinsischen Viskositäten von HMW-Aloepektinen waren im Allgemeinen höher als diejenigen von LMW-Pektinen. Die intrinsischen Viskositäten von HMW-Aloepektinen waren ebenfalls im Allgemeinen höher als diejenigen der handelsüblichen Citrus- und Apfel-Pektine, die hier getestet wurden. Dies steht ebenfalls im Einklang mit den unterschiedlichen Molekulargewichten von HMW-Aloepektinen und handelsüblichen Pektinen.

Tabelle 13. Intrinsische Viskositäten von Aloe-Pektinen

Pektine	Faserquelle	Größe (Da)	intrinsische Viskosität (η , ml/g)
AP 97-1	Pulpe, roh	$1,36 \times 10^6$ (HMW)	740
AP 10679	Pulpe, BAM	$3,75 \times 10^4$ (LMW)	68
AP B15	Pulpe, BAM	$7,87 \times 10^5$ (HMW)	262
AP B15-2	Pulpe, BAM	$6,45 \times 10^4$ (LMW)	68
AP B16	Pulpe, roh	$1,06 \times 10^6$ (HMW)	550
AP B16-2	Pulpe, roh	$6,08 \times 10^5$ (LMW)	337
AP Rinde B1	Rinde, roh	ND*	978
AP Rinde B1-2	Rinde, roh	ND	523
AP Rinde B2	Rinde, roh	ND	846
Sigma LM Citrus	-	$2,18 \times 10^5$	51
Sigma HM Citrus	-	$2,02 \times 10^5$	178
Spectrum HM Citrus	-	$4,56 \times 10^5$	297
HF HM Citrus	-	ND	201
HF HM Apfel	-	ND	277

* nicht bestimmt.

BEISPIEL 12

Calciumgelbildung

[0096] Aloepektine in verschiedenen Konzentrationen in Wasser wurden mit Calciumchloridlösung bei verschiedenen Konzentrationen zusammen mit handelsüblichen LM- und HM-Pektinen gemischt. Nach Stehenlassen bei Raumtemperatur für bis zu 24 h wurden die Röhrchen umgekehrt. Wenn die Probe unschwer floss, wurde davon ausgegangen, dass keine Gelbildung eingetreten ist. Wenn die Probe nicht floss oder sich nicht unter ihrem Eigengewicht verformte, war die Gelbildung eingetreten. Wenn die Probe nicht floss sondern sich verformte (d.h. die Oberfläche hielt keine gerade Linie senkrecht zu der Seite des Röhrchens, wenn die Röhrchen in horizontaler Position gehalten wurden) wurde das System als weiches Gel angesehen. Die Ergebnisse zeigten, dass Aloe-Pektin, das entweder durch RT- oder HT-Extraktion aus entweder Pulpe- oder Rindenfasern erhalten worden war, in Gegenwart von Calcium feste Gele bildete, ebenso wie das LM-Citrus-Pektin und die Polygalacturonsäure (Tabelle 14). Unter den gleichen Bedingungen bildete HM-Citrus-Pektin keine Gele. Dies steht mit der Tatsache im Einklang, dass das Aloe-Pektin ein LM-Pektin ist. Pektine aus Citrus und Apfel sind natürlicherweise HM-Pektine. LM-Pektine werden durch Demethylierung der HM-Pektine erhalten. Da während der Extraktion der Aloe-Pektine, insbesondere mit der RT-Extraktion, keine rigiden Bedingungen angewandt wurden, ist das Aloe-Pektin ein natürliches LM-Pektin.

[0097] Mit einer 0,2% Aloe-Pektinlösung wurde die minimale erforderliche Konzentration an Calciumchlorid zur Gelbildung als 1–2 mM ($50\text{--}100\text{ mg CaCl}_2/\text{g Pektin}$) bestimmt. Mit zunehmenden Konzentrationen von Pektin und/oder Calciumchlorid wurden die Gele nach und nach fester. Es wurde festgestellt, dass die HMW-Aloepektine insofern schneller Gele bildeten als LMW-Aloepektine, als sie weniger Zeit zur Gelbildung benötigten und das Gel fester erschien.

[0098] Die Zunahme der Ionenstärke erleichterte die Calciumgelbildung. Die Geschwindigkeit der Gelbildung erhöhte sich nach und nach mit zunehmenden NaCl-Konzentrationen (0–0,2 M) nach Zugabe einer feststehen-

den Menge an Calciumchlorid.

BEISPIEL 13

Einwertige Kationen-basierende Gelbildung

[0099] Aloepektine wurden in Wasser bei verschiedenen Konzentrationen gelöst. Die Pektinlösungen wurden bei RT mit gleichen Volumina 0,3 M NaCl (2 Salzlösung), 0,3 M NaCl und 40 mM Natriumacetat (pH 5,0) oder 2 × PBS (pH 7,4) gemischt. Die Endvolumina waren 1 oder 2 ml. Die Röhrchen (12 × 75 mm) wurden sodann bei 4°C in einen Kühlschrank oder auf Eis (0°C) verbracht. Die Gelbildung wurde wie in Beispiel 12 beschrieben bewertet. Die Röhrchen wurden anschließend wieder auf RT gebracht, um zu bestimmen, ob sich das Gel wieder in eine Lösung verwandelte. Verschiedene NaCl-Konzentrationen (0,05–1 M) wurden für die Gelbildung getestet. Das Kaliumsalz (KCl) wurde ebenfalls getestet. Die Salz- und Pektinlösungen waren immer in den gleichen Volumina (1:1) gemischt. Zur Bestimmung der Auswirkung von Endo-Polygalacturonase auf die Gelbildung wurde den Pektinlösungen pH-5,0-Acetatpuffer bis zu einer Endkonzentration von 20 mM zugesetzt. Anschließend wurde das Enzym in den angegebenen Konzentrationen zugesetzt. Nach Stehen bei Raumtemperatur für 30 min wurden die Lösungen mit gleichen Volumina von 0,3 M NaCl gemischt und anschließend auf Eis verbracht. Die Gelbildung wurde wie vorstehend überprüft.

[0100] Wurde eine Aloe-Pektinlösung in 0,15 M NaCl (physiologische Salzlösung) auf 4°C abgekühlt, wurde ein Gel erhalten. Das Gel war fest und frei stehend, wenn es wie das Calciumgel sofort bei 4°C gehalten wurde. Es verwandelte sich schnell wieder in eine Lösung, wenn es auf RT (22°C) gebracht wurde. Dieser reversible Lösung-Gel-Übergang konnte durch Änderung der Temperatur viele Male wiederholt werden.

[0101] Im Gegensatz zur Gelbildung in Gegenwart von Calcium, die wirksam sowohl mit HMW- als auch LMW-Aloepektinen eintrat, trat die einwertige Kationenbasierende Gelbildung nur wirksam mit HMW-Aloepektinen auf, die entweder aus Pulpe- oder Rindenfasern erhalten wurden. Die Probe AP 97-1 und ähnliche, die Molekulargewichte von $> 1 \times 10^6$ Da aufwiesen, konnten feste Gele bei Konzentrationen von so niedrig wie 1 mg/ml in Gegenwart von 0,15 M NaCl erzeugen. Solche Gele waren auch klar, wenn die Pektinkonzentrationen 5 mg/ml oder weniger betrugen. Mit höheren Pektinkonzentrationen (> 5 mg/ml) waren die Gele fester und etwas trübe. Mit einem 1-ml-Volumen konnte sich in ca. 15 min nach Verbringen des Röhrchens auf Eis ein Gel bilden, und es wurde in etwa der gleichen Zeit wieder zur Lösung, nachdem es wieder auf RT gebracht wurde. Das Gel verwandelte sich allerdings bei einer Temperatur von so hoch wie 15°C nicht wieder in eine Lösung. Das Gel konnte sich bei pH 5,0 (in Salzlösung mit 20 mM pH 5,0 Natriumacetat) sowie pH 7,4 (in PBS) bilden.

[0102] Die LMW (0,375–6,08 $\times 10^5$ Da)-Aloe-Pektine bildeten solche nur Gele bei höheren Konzentrationen (≥ 5 mg/ml). Bei 1 mg/ml konnten nur weiche Gele mit einigen der LMW-Proben in 0,15 M NaCl erhalten werden. Die kleinste Aloe-Pektinprobe (0,375 $\times 10^5$ Da) bildete bei 1 mg/ml in 15 M NaCl kein Gel. Nur mit dieser Probe wurde bei einer Pektinkonzentration von 10 mg/ml in 0,2 M NaCl ein weiches Gel erhalten. Dies legt nahe, dass die Wirksamkeit der einwertigen Kationen-basierenden Gelbildung von der Größe der Pektinmoleküle abhängt. Wie in Beispiel 8 gezeigt, konnte Aloe-Pektin durch Endo-Polygalacturonase abgebaut werden. Somit wurden 300 μ l 2 mg/ml AP 97-1 Pektinlösung in 20 mM pH 5 Natriumacetat mit diesem Enzym bei verschiedenen Konzentrationen vor dem Mischen mit einem gleichen Volumen von 0,3 M NaCl abgebaut und auf Eis verbracht. Die Ergebnisse zeigten, dass die Kontrolle (kein Enzym zugesetzt) ein Gel bildete und die Probe mit der höchsten Enzymkonzentration eine Lösung blieb (Tabelle 15). Zwischen der Kontrolle und der höchsten Enzymkonzentration war der Übergang von der Lösung zum Gel offensichtlich, d.h. das Gel wurde weicher mit einer Zunahme in der Enzymkonzentration, bis bei der höchsten Enzymkonzentration eine vollständige Lösung erhalten wurde. Dieses Ergebnis zeigt, dass die Größe der Aloe-Pektinmoleküle ein bedeutender Faktor bei der einwertigen Kationen-basierenden Gelbildung ist.

[0103] Die Gelbildung war auch von der NaCl-Konzentration abhängig. In 0,1 M NaCl wurden nur weiche Gele mit Proben wie AP 97-1 erhalten. Die festen Gele bildeten sich nur in 0,15 M und 0,2 M NaCl, wohingegen das Gel, das sich bei 0,15 M NaCl bildete, vollständig reversibel war, wenn das Gel wieder auf RT gebracht wurde, das bei 0,2 M NaCl gebildete Gel war, insbesondere für die HMW-Aloepektine, nicht leicht reversibel. Nach Stehen bei Raumtemperatur für 1 h oder länger traten bei dem mit 0,2 M NaCl gebildeten Gel oft Syneresen auf, d.h. die Flüssigkeit trennte sich vom Gel. Mit höheren NaCl-Konzentrationen ($\geq 0,4$ M) bildeten sich bei RT Niederschläge. Die Niederschläge waren bei hohen NaCl-Konzentrationen (0,6–1 M) weiß und amorph und waren bei 0,4 M NaCl anscheinend feine Körnchen.

[0104] Eine solche Kaltgelierung ist auch gegenüber der Spezies von verwendeten einwertigen Kationen

empfindlich. Mit KCl (0,05–1 M) trat keine Kaltgelierung auf, obwohl sich bei höheren KCl-Konzentrationen ($\geq 0,4$ M) bei RT Niederschläge bildeten.

[0105] Die Fällung von Pektinen bei hohen Salzkonzentrationen wurde bereits beobachtet. Allerdings wurde eine solche reversible einwertige Kationen (NaCl)-basierende Kaltgelierung unter physiologischer Bedingung (0,15 N NaCl, pH 7,4) bisher noch nicht mit anderen Pektinen beschrieben. Bis jetzt wurde mit keinen anderen Polymeren oder Substanzen aus der Literatur ein derartiges Gelbildungssystem identifiziert. Unter Verwendung von handelsüblicher Polygalacturonsäure, LM- und HM-Pektinen wurde keine derartige einwertige Kaltgelierung erhalten.

BEISPIEL 14

Verwendung von Aloe-Pektin als Verkapselungsmittel zur kontrollierten Freisetzung

[0106] Das APase- und APase-Antikörper (APase-Ab)-Konjugat wurde zur Verkapselung verwendet. Sie wurden gewählt, da die relative Aktivität direkt unter Verwendung des APase-Substrats pNPP gemessen werden kann. Aloe-Pektine bei 10 oder 15 mg/ml in Wasser wurden mit APase oder APase-Ab bei einer Endkonzentration von 10 bis 20 $\mu\text{g/ml}$ gemischt. Das Gemisch bei RT wurde während etwa 30 min in ein 200 mM CaCl_2 -Bad getropft, um Perlen, ca. 1 mm Durchmesser, herzustellen. Die durch Abdekantieren isolierten Perlen wurden gewaschen und in Wasser bei 4°C gehalten. Zuerst wurde in Relation zur Pektinkonzentration und der Größe von Pektinmolekülen eine spontane Freisetzung überprüft. Für die Freisetzungsexperimente wurde die gleiche Anzahl von Perlen (3–5) bei Raumtemperatur in 100 ml Wasser, Salzlösung (150 mM NaCl), TN-Puffer oder Puffer ohne NaCl bei verschiedenen pH-Werten 2 h inkubiert. Der pH von 3–5 wurde mit 10 mM Natriumacetatpuffer erreicht, und der pH von 6–8 wurde mit Tris-Puffer erreicht. Am Ende der Inkubation wurden 10 μl des Inkubationsmediums entnommen und mit 100 μl des APase-Substrats (pNPP) vermischt. Nach 15 min wurde die Umsetzung mit 50 μl 2 M NaOH gestoppt, und die Extinktion bei 405 nm wurde gemessen.

[0107] Die Ergebnisse zeigten, dass eine Pektinkonzentration von über 10 mg/ml die spontane Freisetzung wirksam hemmen konnte und größere Pektine das Ziel-Mittel wirksamer einschließen ([Fig. 5a](#) und [Fig. 5b](#)). Anschließend wurden die Bedingungen zur Auslösung der Freisetzung überprüft. Es wurde festgestellt, dass die eingeschlossenen Enzyme nur in Salzlösung (150 mM NaCl) oder bei einem pH von 7,0 oder darüber ([Fig. 5c](#)) freigesetzt wurden. Die Kombination dieser beiden Bedingungen, wie durch TN-Puffer (25 mM Tris 150 mM NaCl, pH 7,4) dargestellt, ergab die wirksamste Freisetzung ([Fig. 5c](#)).

[0108] Obwohl die Proteinmoleküle, die bei den vorliegenden Experimenten eingesetzt wurden, groß sind (APase, 140 kDa; APase-IgG, ca. 350 kDa), zeigen diese Ergebnisse eindeutig, dass in dem Aloe-Pektin-Calciumgel ein durch die Salzkonzentration und den pH kontrollierter Freisetzungsmechanismus besteht. Somit sollte die physiologische Bedingung (150 mM NaCl und pH 7,0–7,4) die Freisetzung sofort starten, wenn die Perlen in vivo abgegeben werden, wohingegen unter den Aufbewahrungsbedingungen keine oder nur eine minimale Freisetzung eintritt. Dieses Aloe-Pektin-Calciumgel-Verkapselungssystem sollte für Proteinmoleküle, wie Antikörper und Impfstoffe, geeignet sein.

Tabelle 14. Gelbildung und Methylierungsgrad (DM) von Aloe-Pektin

	Aloe-Pektin	Citrus-Pektin	Citrus-Pektin	Polygalacturonsäure
Ca^{++} -Gelbildung	ja	ja	nein	ja
DM	LM(<50%)	LM (28%)	HM (64%)	0

Tabelle 15. Wirkung von Endo-Polygalacturonase auf die Kaltgelierung von Aloe-Pektin in Gegenwart von einwertigen Kationen (NaCl)

	Endo-Polygalacturonase (Einheit/ml)				
	0	0,053	0,105	0,21	0,42
Gelbildung	festes Gel	festes Gel	weiches Gel	weicheres Gel	Flüssigkeit

BEISPIEL 15

Verwendung eines Pektینگels auf der Basis einwertiger Kationen als neue Matrix für eine Antigen-und-Antikörperfällungsreaktion

[0109] Der Fällungstest ist ein übliches Diagnoseverfahren zum Nachweis von pathogen spezifischen Antigenen oder Antikörpern. Er umfasst das sorgfältige Überschichten der Antikörperlösung mit der Antigenlösung oder umgekehrt. Der Überschichtungsschritt ist wichtig, und es muss darauf geachtet werden, dass es zwischen den zwei Lösungen nicht zu Verwirbelungen kommt. Die Bildung einer weißen Niederschlagslinie zwischen den zwei Lösungen als Ergebnis von Diffusion zeigt ein positives Ergebnis an. Alternativ wird dieser Test in Agar durchgeführt, der als Agar-Diffusionstest bezeichnet wird. Dieser Test umfasst die Herstellung von Agar und dauert länger um Ergebnisse zu sehen.

[0110] Die Fähigkeit von HMW-Aloe-Pektin zur Bildung eines Gels in PBS bei 4°C stellt eine Gelegenheit zur Entwicklung eines neuen, einfacheren Tests bereit. Eine Lösung wird im festen Zustand bei 4°C gehalten, so dass eine andere Lösung leicht und zusammenhängend darüber geschichtet werden kann. Wenn das Gel wieder auf Raumtemperatur gebracht wird, geht es wieder in eine nicht viskose Lösung über und erlaubt den Eintritt der Diffusion.

[0111] Um diese potentielle Anwendung zu testen, wurden Maus-IgG (Antigen) und Anti-Maus-IgG-Antikörper (Antikörper) verwendet. 10 µl des Antigens bei verschiedenen Konzentrationen wurden mit 0,4 ml 1 mg/ml AP 97-1 in PBS vermischt. Sodann wurden die Teströhrchen auf Eis gehalten, und wenn sich ein Gel bildete, wurden 200 µl der Antikörperlösung in PBS direkt auf das Gel gegeben. Dann wurden die Teströhrchen wieder auf Raumtemperatur gebracht. Nach 30 min trat zwischen den beiden Lösungen eine Fällungslinie auf. Wenn der Antikörperlösung das Antigen mit oder ohne Pektin bei Raumtemperatur zugesetzt wurde, wurde keine oder nur diffuse Fällungslinien festgestellt. Dies legt nahe, dass unter Verwendung des Aloe-Pektینگels als Matrix ein solcher Antigen-und-Antikörperfällungstest nicht nur vereinfacht, sondern auch seine Empfindlichkeit verstärkt werden kann.

BEISPIEL 16

Extraktion durch superkritisches Fluid

[0112] Die Zellwandfasern (wie in Beispiel 3 erhalten) werden in die superkritische Fluid(SF)-Extraktionszelle gepackt, die dann versiegelt wird. Der SF-Generator wird eingeschaltet, und nach Erreichen der gewünschten Bedingungen von Temperatur und Druck wird SF in die Extraktionszelle mit der entsprechenden Fließgeschwindigkeit gepumpt. Das pektinreiche austretende Fluid wird in der Dekompressionskammer abkühlen gelassen. Anschließend wird das abgekühlte Fluid zur Isolierung des Pektins behandelt. Ein Isolierungsverfahren besteht im Ausfällen des Pektins durch Zugabe eines wasserlöslichen organischen Lösungsmittels, vorzugsweise Ethanol, zu dem Fluid oder zu dem teilweise verdampften Fluid. Das ausgefällte Material wird anschließend durch Filtration oder Zentrifugation abgetrennt und getrocknet. Das Pektin kann auch von dem Fluid durch Entfernung des Fluids über Gefriertrocknen oder Verdampfen abgetrennt werden. Das für die SF-Extraktion zu verwendende Fluid kann Wasser oder eine wässrige Lösung sein, die eine Säure oder eine Base oder ein Puffersalz oder einen wasserlöslichen organischen Modifizierer oder eine beliebige Kombination der zuvor genannten Hilfsstoffe enthält. Das Verfahren kann bei Temperaturen zwischen etwa 300 und etwa 800°C und bei Drücken zwischen etwa 200 atm. und etwa 1000 atm. betrieben werden.

BEISPIEL 17

Extraktion von Aloe-Pektinen mit Enzymen

[0113] Zellwandfasern werden mit Wasser gewaschen und in einem Puffer bei einer entsprechenden Konzentration suspendiert, bei der sich die maximale Aktivität des Enzyms (der Enzyme) anwenden lässt. Die Enzyme, die verwendet werden können, umfassen Endo-Arabinase, Endo-Galactanase und Rhamnogalacturonase. Die Endo-Polygalacturonase, obgleich für die von Natur aus HM-Pektine brauchbar, ist für Aloe-Pektin nicht geeignet, da es natürlicherweise LM ist. Das Enzym wird dann zugesetzt. Die Fasersuspension wird für eine bestimmte Zeitdauer (1–24 h) bei 20–37°C gehalten. Die zurückbleibenden Fasern werden durch Filtration entfernt. Die Pektine werden mit Alkohol ausgefällt und getrocknet.

BEISPIEL 18

Extraktion von Aloe-Pektinen mit Mikroben

[0114] Zellwandfasern werden mit Wasser gewaschen und in Wasser bei einer entsprechenden Konzentration suspendiert. Mikroben, entweder Bakterien oder Fungi, die Enzyme produzieren, die in der Lage sind, Pektine aus Zellwänden freizusetzen, werden der Fasersuspension zugesetzt. *Bacillus subtilis* ist ein Beispiel für ein solches Bakterium. Die erzeugten Enzyme umfassen Endo-Arabinase, Endo-Galactanase, Endo-Polygalacturonase und/oder Rhamnogalacturonase. Die Mikroben, die hauptsächlich Endo-Polygalacturonase produzieren, werden vermieden, da das Aloe-Pektin von Natur aus ein LM-Pektin ist. Die Extraktion dauert bei 20–37°C eine bestimmte Zeit (5–24 h). Die zurückbleibenden Fasern werden durch Grobfiltration entfernt. Sodann wird das Filtrat über ein feines Filter passiert, um die Mikroben zu entfernen. Das Endfiltrat wird mit Alkohol (Ethanol) vermischt. Die Pektinniederschläge werden gesammelt und getrocknet.

BEISPIEL 19

Verwendung von Gel auf der Basis einwertiger Kationen als Speichermatrix für pharmakologische Mittel

[0115] Pharmakologische Mittel werden oft in gepufferter oder nicht gepufferter physiologischer Salzlösung (0,15 M NaCl) bei 0–8°C gelagert. Ein pharmakologisches Mittel ist jedes Material, das auf ein biologisches System, entweder ein Tier oder eine Pflanze, eine physiologische Wirkung ausübt. Ein Problem, das oft bei dieser Lagerungsform angetroffen wird, ist die zeitabhängige Aggregatbildung und Fällung.

[0116] Das thermoreversible Aloe-Pektin-Gel auf der Basis einwertiger Kationen kann unter physiologischen Bedingungen (0,15 M NaCl, pH 7,4) bei niedriger Temperatur (4°C) mit einer sehr niedrigen Pektinkonzentration (1 mg/ml) gebildet werden. Die Einarbeitung von pharmakologischen Mitteln in das Gel würde eine Matrix bereitstellen, die eine mögliche Aggregation reduzieren würde. Das Gel auf der Basis einwertiger Kationen geht schnell wieder in Lösung zurück, nachdem es wieder auf RT (22°C) gebracht wurde, so dass das gespeicherte Mittel in Lösungsform verwendet werden kann.

[0117] Das Modellprotein Rinderserumalbumin (BSA), das in physiologischer Salzlösung (0,15 M NaCl) gelöst ist, wurde mit einem gleichen Volumen von 2 mg/ml Aloe-Pektin in 0,15 M NaCl vermischt. Die BSA-Endkonzentration betrug 20 mg/ml und die Aloe-Pektin-Endkonzentration betrug 1 mg/ml. Das Gemisch wurde anschließend auf Eis gehalten. Nach ca. 15 min wurde ein Gel gebildet. Dies zeigte, dass das auf einwertigen Kationen basierende Gel das Aufnahmevermögen für hohe Konzentrationen von biologischen Mitteln besitzt.

[0118] Schwarze indische Tinte wird aus winzigen Kohlenstoffpartikeln hergestellt, die zum zeitabhängigen Ausfallen neigen, wenn die Suspension ungestört stehen gelassen wird. Um die Fähigkeit des Gels auf der Basis einwertiger Kationen zur Verhinderung des Ausfällens zu zeigen, wurde schwarze indische Tinte in das Gelsystem eingebracht. Die schwarze indische Tinte (Higgins, Faber-Castell Corporation, NJ) wurde in 0,15 M NaCl 1000-fach verdünnt. Sodann wurde die verdünnte Tinte mit gleichen Volumina von 2 mg/ml Aloe-Pektin in 0,15 M NaCl oder nur mit 0,15 M NaCl als Kontrolle vermischt. Die Gemische wurden auf Eis gestellt. Das Gemisch mit Pektin bildete schnell ein Gel, und die Kontrolle blieb eine Lösung. Beide Proben wurden sodann bei 4°C gelagert. Nach 48 h war es offensichtlich, dass der obere Teil der Kontrolllösung im Vergleich zu dem unteren Teil nicht so dunkel war und dass sich am Boden ein kompakter schwarzer Bereich gebildet hat. Dies zeigt, dass die Fällung der indischen Tinteteilchen erfolgt war. Andererseits war das Gel gleichmäßig dunkel, und am Boden des Röhrchens wurde kein kompakter schwarzer Bereich festgestellt. Wenn sich das Gel bei Rückkehr auf Raumtemperatur wieder in die Lösung verwandelte, war die Lösung ebenfalls gleichmäßig dunkel. Dies zeigte, dass das Gel die Fällung der Mittel verhindern konnte, die aus der Aggregation herrühren könnten.

BEISPIEL 20

Physikalische und chemische Charakterisierung von Aloe-Pektinen

[0119] Aussehen der Endprodukte und Lösungen Das getrocknete aus Pulpefasern stammende Aloe-Pektin besaß ein schmutzig-weißes Aussehen. Diese Farbe stand im scharfen Gegensatz zu den derzeit im Handel erhältlichen Pektinen sowohl von Citrus als auch Apfel, einschließlich von Polygalacturonsäure, die aus Citrus-Pektin hergestellt wird, und anderen derzeit unter Entwicklung befindlichen Pektinen, wie Sonnenblumenpektin, entwickelt werden. Sowohl Apfel- als auch Sonnenblumenpektin sind hellbraun, und Citrus-Pektine be-

saßen eine hellgelbe-braune Farbe. Die überlegene Farbqualität des Aloe-Pektins aus der Pulpe beruht wahrscheinlich auf der klaren und farbfreien Natur der Pulpe.

[0120] Bei Auflösung in Wasser waren die Aloe-Pektinlösungen bei einer Konzentration von 5 mg/ml im Wesentlichen klar, wohingegen die Handelsüblichen Produkte zu verschiedenen Ausmaßen trübe waren, wobei die Apfel-Pektine die trübsten waren. Diese Feststellung wurde durch Messen der Extinktion bei 600 nm bestätigt (Tabelle 16). Die Extinktion bei 600 nm von aus Pulpefasern extrahierten Aloe-Pektinen war mindestens zweimal geringer als von jedem anderen Pektin.

[0121] Die Aloe-Pektine aus grünen Rindenfasern zeigten eine hellgrüne braune Pulverfarbe in einem den Citrus-Pektinen entsprechenden Ausmaß. Ihre Lösung war im Vergleich zu den Pulpepektinen weniger klar, allerdings war sie so klar wie die besten Citrus-Pektine (Tabelle 16).

Tabelle 16. Trübung der Pektinlösungen in Wasser, wie gemessen bei OD 600 nm

Quelle	Pektine (5 mg/ml in Wasser)	OD 600 nm
Aloepulpe	AP 10679	0,028
	AP 97-1	0,044
Aloerinde	AP Rinde B1 (RT)	0,084
	AP Rinde B1-2 (HT)	0,110
handelsüblich	Citrus (LM), Sigma	0,103
	Citrus (HM), Sigma	0,082
	Citrus, Sigma	0,176
	Citrus, Spektrum	0,136
	Citrus, HF	0,272
	Apfel, HF	0,345
	Polygalacturonsäure (Citrus), Sigma	0,206

MERKMALE-ÜBERSICHT

[0122] Im Vergleich zu anderen Pektinen zeigte das Aloe-Pektin einige einzigartige Merkmale. Erstens besaß das Aloe-Pektin einen viel höheren Rhamnose-Gehalt. Dies wurde sowohl mit ungereinigtem als auch gereinigtem Aloe-Pektin im Vergleich zu den handelsüblichen Pektinen und den experimentellen in der Literatur beschriebenen Pektinen gezeigt (Tabellen 10 und 11). Dies wurde auch gezeigt, wenn die Extraktionsbedingungen betrachtet wurden, d.h. mit EDTA extrahiertes Aloe-Pektin wurde mit anderen auf ähnliche Weise extrahierten (mit einem Chelatbildner) Pektinen verglichen (Tabelle 12). Der Rhamnose-Gehalt in Aloe-Pektin ist in ungereinigten Proben mehr als drei Mal so hoch oder in gereinigten Proben mehr als zwei Mal so hoch im Vergleich zu den entsprechenden Formen der anderen Pektine. Dieser Unterschied wurde weiter durch die Tatsache belegt, dass die Rhamnose/Gal-A-Verhältnisse in Aloe-Pektin ebenfalls höher waren. Rhamnose, die ein Hauptkettenzucker ist, besitzt eine kritische Wirkung auf die Hauptkettenflexibilität. Je mehr Rhamnose vorhanden ist, desto biegsamer ist das Molekül. Somit wird erwartet, dass Aloe-Pektine im Vergleich zu anderen Pektinen biegsamer sind. Dies kann dem Aloe-Pektin gewisse distinkte Theologische Eigenschaften verleihen.

[0123] Aloe-Pektine enthielten auch einen seltenen Zucker, 3-OMe-Rhamnose (Tabelle 7). Er wurde in sämtlichen Proben, einschließlich des gereinigten AP 10679, nachgewiesen. Er machte ca. 10% der gesamten Rhamnose aus. Die Gegenwart dieses modifizierten Zuckers wurde bisher bei keinen anderen Pektinen berichtet. Die erfindungsgemäßen Aloe-Pektine sind relativ frei von Faser. Die Fasergehalte der so erhaltenen Aloe-Pektine betragen weniger als etwa 20 Gew.-%, vorzugsweise weniger als etwa 5 Gew.-% und noch mehr bevorzugt weniger als etwa 1 Gew.-%.

[0124] Eine Zusammenfassung der anderen Eigenschaften der Aloe-Pektine, die aus Rohpulpe und Rindenfasern extrahiert wurden, ist in Tabelle 17 angegeben.

[0125] Obgleich die Zusammensetzung von isolierten Aloe-Pektinen und die bevorzugten Verfahren zum Erhalt und zur Verwendung von ihnen offenbart worden sind, ist es für die Fachwelt klar, dass im Hinblick auf die

obige Lehre zahlreiche Modifikationen und Änderungen möglich sind. Es sollte von der Fachwelt auch erkannt werden, dass solche Modifikationen und Änderungen nicht vom Geist und Umfang der Erfindung, wie sie in den beigefügten Ansprüchen dargelegt sind, abweichen.

Tabelle 17. Überblick über die Eigenschaften der aus Rohpulle und Rindenfasern extrahierten Aloe-Pektine

Faserquelle	Extraktions- temperatur	Pulverfarbe	Lösungs- klarheit	MW (Da)	intrinsische Viskosität (η , ml/g)	Gal-A- Gehalt (%, Gew./Gew.)	DM	DAc	Phenol (%, Gew./Gew.)	Ca ⁺⁺ - Gelbildung	Na ⁺ - Gellierung
AP B16	Pulpe	RT	schmutzig- klar	1,06x10 ⁶	550	93	11	ND*	<0,03	+	+
			weiß								
AP B16-2	Pulpe	HT	schmutzig- klar	6,08x10 ⁵	337	92	18	ND	<0,03	+	+ +
			weiß								
AP 97-1	Pulpe	RT/HT	schmutzig- klar	1,36x10 ⁶	740	91	4,4	9,1	<0,03	+	+
			weiß								
AP Rinde B1	Rinde	RT	hellbraun [#] trüb [#]	ND	978	81	4,0	ND	0,045	+	+
AP Rinde B1-2	Rinde	HT	hellbraun trüb	ND	523	84	9,5	ND	0,041	+	+ +
AP Rinde B2	Rinde	RT	hellbraun trüb	ND	846	75	ND	ND	0,219	+	+

* nicht bestimmt.

+ weiches Gel.

Farbe und Trübung können durch zusätzliches Spülen mit Alkohol wesentlich herabgesetzt werden.

Patentansprüche

1. Pektische Substanz aus Aloe Vera mit einem 3-O-Methylrhamnose-Gehalt von 0,1 bis 5 Mol-%, die in der Lage ist, in Gegenwart einer Lösung eines Calciumsalzes ein Gel zu bilden, und gegebenenfalls mit mindestens einer der folgenden Eigenschaften:
Methylierungsgrad von weniger als 50 Mol-%; und
Rhamnosegehalt von 2 bis 15 Mol-%;
wobei die pektische Substanz aus dem Blatt von Aloe Vera durch Extraktion erhältlich ist, wobei die Extraktion durch ein superkritisches Fluid, ein wasserlösliches organisches Lösungsmittel, eine Säure, ein Alkali, einen Chelatbildner, ein Bakterium, ein Enzym oder eine Kombination davon erreicht wird.
2. Pektische Substanz aus Aloe Vera mit einem 3-O-Methylrhamnosegehalt von 0,1 bis 5 Mol-%, die in der Lage ist, in Gegenwart einer Lösung eines Calciumsalzes ein Gel zu bilden, und gegebenenfalls mit mindestens einer der folgenden Eigenschaften:
Methylierungsgrad von weniger als 30 Mol-%;
Rhamnosegehalt von 3 bis 15 Mol-%;
in der Lage, ein einwertiges Kationen-basierendes Gel zu bilden; und
Molekulargewicht von 10^4 bis 10^7 Dalton;
wobei die pektische Substanz aus dem Blatt von Aloe Vera durch Extraktion erhältlich ist, wobei die Extraktion durch ein superkritisches Fluid, ein wasserlösliches organisches Lösungsmittel, eine Säure, ein Alkali, einen Chelatbildner, ein Bakterium, ein Enzym oder eine Kombination davon erreicht wird.
3. Pektische Substanz nach Anspruch 1 oder Anspruch 2, wobei die Extraktion durch ein superkritisches Fluid bei einer Temperatur von 300°C bis 800°C unter einem Druck von 200 bis 1000 atm durchgeführt wird.
4. Pektische Substanz nach Anspruch 1 oder Anspruch 2, wobei die Extraktion durch eine Säure bei einem pH von 0,5 bis 3 bei einer Temperatur von 0°C bis 100°C durchgeführt wird.
5. Pektische Substanz nach Anspruch 1 oder Anspruch 2, wobei die Extraktion durch eine Säure bei einem pH von 1 bis 2 bei einer Temperatur von 60°C bis 90°C durchgeführt wird.
6. Pektische Substanz nach Anspruch 1 oder Anspruch 2, wobei die Extraktion durch ein Alkali bei einem pH von 9 bis 13 bei einer Temperatur von 0°C bis 22°C durchgeführt wird.
7. Pektische Substanz nach Anspruch 1 oder Anspruch 2, wobei die Extraktion durch ein Alkali bei einem pH von 10 bis 11 bei einer Temperatur von 0°C bis 4°C durchgeführt wird.
8. Pektische Substanz nach Anspruch 1 oder Anspruch 2, wobei die Extraktion durch einen Chelatbildner mit EDTA bei einem pH von 3 bis 7 bei einer Temperatur von 20°C bis 100°C durchgeführt wird.
9. Pektische Substanz nach Anspruch 1 oder Anspruch 2, wobei die Extraktion durch einen Chelatbildner mit EDTA bei einem pH von 7 bis 9 bei einer Temperatur von 20°C bis 100°C durchgeführt wird.
10. Pektische Substanz nach Anspruch 1 oder Anspruch 2, wobei das Molekulargewicht der pektischen Substanz 10^4 Dalton bis 10^7 Dalton beträgt.
11. Pektische Substanz nach Anspruch 10, wobei die pektische Substanz, die ein Molekulargewicht von über 10^4 Dalton aufweist, ein Gel mit einer Lösung von Natriumsalz bei einer Temperatur von -10°C bis 10°C bildet und das Gel sich in eine Lösung verwandelt, wenn die Temperatur auf oder über 15°C erhöht wird.
12. Pektische Substanz nach Anspruch 11, wobei die Konzentration der Lösung von Natriumsalz 0,1 M bis 0,5 M beträgt.
13. Pektische Substanz nach Anspruch 1, wobei der Methylierungsgrad der pektischen Substanz unter 50% beträgt.
14. Pektische Substanz nach Anspruch 2, wobei der Methylierungsgrad der pektischen Substanz unter 30% beträgt.
15. Pektische Substanz nach Anspruch 1 oder Anspruch 2, wobei die intrinsische Viskosität der pektischen

Substanz 100 ml/g bis 2000 ml/g beträgt.

16. Pektische Substanz nach Anspruch 1, wobei auf die Extraktion eine weitere Reinigung der pektischen Substanz mit einem Ionenaustauscherharz, unter Erhalt einer gereinigten pektischen Substanz folgt.

17. Gereinigte pektische Substanz nach Anspruch 16, wobei der Methylierungsgrad unter 50 Mol-% liegt.

18. Pektische Substanz nach Anspruch 2, wobei auf die Extraktion eine weitere Reinigung der pektischen Substanz mit einem Ionenaustauscherharz, unter Erhalt einer gereinigten pektischen Substanz folgt.

19. Gereinigte pektische Substanz nach Anspruch 18, wobei der Methylierungsgrad unter 30 Mol-% beträgt.

20. Gereinigte pektische Substanz nach Anspruch 16 oder Anspruch 18, wobei der Rhamnosegehalt 3 bis 6 Mol-% beträgt.

21. Gereinigte pektische Substanz nach Anspruch 16 oder Anspruch 18, wobei der Gehalt an 3-O-Methylrhamnose oberhalb von 0,1 Mol-% beträgt.

22. Pektische Substanz nach Anspruch 1 oder Anspruch 2, wobei die Extraktion durch ein superkritisches Fluid erreicht wird.

23. Pektische Substanz nach Anspruch 1 oder Anspruch 2, wobei die Extraktion durch eine Säure oder Alkali erreicht wird.

24. Pektische Substanz nach Anspruch 1 oder Anspruch 2, wobei die Extraktion durch ein Chelatbildner erreicht wird.

25. Pektische Substanz nach Anspruch 1 oder Anspruch 2, wobei die Extraktion durch ein Bakterium oder ein Enzym erreicht wird.

26. Pektische Substanz aus Aloe Vera mit einem 3-O-Methylrhamnose-Gehalt von 0,1 bis 5 Mol-%, die in der Lage ist, in Gegenwart einer Lösung eines Calciumsalzes ein Gel zu bilden, und gegebenenfalls mit mindestens einer der folgenden Eigenschaften:

Methylierungsgrad von weniger als 30 Mol-%;

Rhamnosegehalt von 3 bis 15 Mol-%, und

Molekulargewicht von 10^4 bis 10^7 Dalton, die in der Lage ist, mit einer Natriumsalz-Lösung bei einer Temperatur von -10°C bis 10°C ein Gel zu bilden, und sich das Gel in eine Lösung verwandelt, wenn die Temperatur auf oder über 15°C erhöht wird;

wobei die pektische Substanz aus dem Blatt von Aloe Vera durch Extraktion unter Verwendung von EDTA bei einem pH von 3 bis 7 bei einer Temperatur von 20°C bis 100°C erhältlich ist.

27. Pektische Substanz aus Aloe Vera mit einem 3-O-Methylrhamnose-Gehalt von 0,1 bis 5 Mol-%, die in der Lage ist, in Gegenwart einer Lösung eines Calciumsalzes ein Gel zu bilden, und gegebenenfalls mit mindestens einer der folgenden Eigenschaften:

Methylierungsgrad von weniger als 30 Mol-%;

Rhamnosegehalt von 3 bis 15 Mol-%, und

Molekulargewicht von 10^4 bis 10^7 Dalton, wobei der Teil der pektischen Substanz mit einem Molekulargewicht von 10^5 bis 10^7 Dalton mit einer Natriumsalz-Lösung bei einer Temperatur von -10°C bis 10°C ein Gel bildet und sich das Gel in eine Lösung verwandelt, wenn die Temperatur auf oder über 15°C erhöht wird;

wobei die pektische Substanz aus dem Blatt von Aloe Vera durch Extraktion unter Verwendung von EDTA bei einem pH von 7 bis 9 bei einer Temperatur von 20°C bis 100°C erhältlich ist.

28. Verfahren zum Erhalt der pektischen Substanz nach Anspruch 1, umfassend:

Homogenisieren einer Rinde oder eines inneren Gels eines Aloe-Vera-Blatts oder eines ganzen Aloe-Vera-Blatts unter Erhalt eines homogenisierten Aloe-Materials;

Erhalten eines wasserunlöslichen Teils aus dem homogenisierten Aloe-Material; und

Extrahieren des Pektins aus dem wasserunlöslichen Teil, wobei die Extraktion durch ein superkritisches Fluid, ein wasserlösliches organisches Lösungsmittel, eine Säure, ein Alkali, einen Chelatbildner, ein Bakterium, ein Enzym oder eine Kombination davon erreicht wird.

29. Verfahren für Reinigung einer gereinigten pektischen Substanz nach Anspruch 1, umfassend:
Homogenisieren einer Rinde oder eines inneren Gels aus einem Aloe-Vera-Blatt oder aus einem ganzen Aloe-Vera-Blatt, unter Erhalt eines homogenisierten Materials;
Erhalten eines wasserunlöslichen Teils aus dem homogenisierten Aloe-Material;
Extrahieren der pektischen Substanz aus dem wasserunlöslichen Teil; und
Behandeln der pektischen Substanz mit einem Anionenaustauscherharz, unter Erhalt der gereinigten pektischen Substanz.

30. Verfahren nach Anspruch 28 oder Anspruch 29, wobei der wasserunlösliche Teil, unter einem pH von 0,5 bis 3, bei einer Temperatur von 0°C bis 100°C extrahiert wird.

31. Verfahren nach Anspruch 28 oder Anspruch 29, wobei der wasserunlösliche Teil, unter einem pH von 9 bis 13, bei einer Temperatur von 0°C bis 22°C extrahiert wird.

32. Verfahren nach Anspruch 28 oder Anspruch 29, wobei der wasserunlösliche Teil mit einem Chelatbildner extrahiert wird.

33. Verfahren nach Anspruch 28 oder Anspruch 29, wobei der wasserunlösliche Teil mit EDTA extrahiert wird

34. Verfahren nach Anspruch 33, wobei der wasserunlösliche Teil mit dem EDTA, unter einem pH von 4 bis 7, bei einer Temperatur von 20°C bis 100°C extrahiert wird.

35. Verfahren nach Anspruch 33, wobei der wasserunlösliche Teil mit dem EDTA, unter einem pH von 7 bis 9, bei einer Temperatur von 20°C bis 100°C extrahiert wird.

36. Verfahren zur Isolierung der pektischen Substanzen nach Anspruch 1 aus dem Aloe-Vera-Blatt, umfassend:

Homogenisieren einer Rinde oder eines inneren Gels aus einem Aloe-Vera-Blatt oder aus einem ganzen Aloe-Vera-Blatt, unter Erhalt eines homogenisierten Materials;
Erhalten eines wasserunlöslichen Teils aus dem homogenisierten Aloe-Material; und
Extrahieren des Pektins aus dem wasserunlöslichen Teil mit EDTA bei einem pH von 4 bis 7 bei einer Temperatur von 20°C bis 100°C.

37. Verfahren zur Isolierung der pektischen Substanz nach Anspruch 1 aus dem Blatt von Aloe Vera, umfassend:

Homogenisieren einer Rinde oder eines inneren Gels aus einem Aloe-Vera-Blatt oder aus einem ganzen Aloe-Vera-Blatt unter Erhalt eines homogenisierten Aloe-Materials;
Erhalten eines wasserunlöslichen Teils aus dem homogenisierten Aloe-Material; und
Extrahieren des Pektins aus dem wasserunlöslichen Teil mit EDTA bei einem pH von 7 bis 9 bei einer Temperatur von 20°C bis 100°C.

38. Verfahren zur Bildung eines Temperatur-reversiblen Gels, umfassend die Zugabe einer Lösung eines Natriumsalzes zu einer pektischen Substanz nach Anspruch 1 mit einem Molekulargewicht von 10^4 Dalton bis 10^7 Dalton bei einer Temperatur von -10°C bis 10°C.

39. Verfahren nach Anspruch 38, wobei die Konzentration der Lösung des Natriumsalzes 0,1 M bis 0,5 M beträgt.

40. Verfahren nach Anspruch 38, wobei die Konzentration der pektischen Substanz 0,5 mg/ml bis 20 mg/ml beträgt.

41. Verfahren nach Anspruch 38, wobei die Lösung des Natriumsalzes der pektischen Substanz im gleichen Volumen unter einem pH von 3 bis 9 zugesetzt wird.

42. Verfahren zur Verwendung einer pektischen Substanz nach Anspruch 1 zur Bildung einer Perle, die zur kontrollierten Freisetzung eines darin eingekapselten pharmakologischen Mittels geeignet ist, umfassend:
Mischen des pharmakologischen Mittels mit der pektischen Substanz mit einem Molekulargewicht von 10^4 Dalton bis 10^7 Dalton in einer Lösung unter Bildung eines Gemisches; und
Zugeben des Gemisches zu einer Lösung eines zweiwertigen Kations unter Erzeugung der Perle.

43. Verfahren nach Anspruch 42, wobei die Konzentration der pektischen Substanz oder der gereinigten pektischen Substanz 0,5 mg/ml bis 20 mg/ml beträgt.
44. Verfahren nach Anspruch 42, wobei das zweiwertige Kation, Calcium oder Zink ist.
45. Verfahren nach Anspruch 44, wobei die Konzentration des zweiwertigen Kations 0,05 M bis 1 M beträgt.
46. Verfahren nach Anspruch 42, wobei das Gemisch einer Lösung des zweiwertigen Kations bei einem pH von 3 bis 9 zugesetzt wird.
47. Verfahren nach Anspruch 42, wobei die Größe der Perle 1 Mikron bis 5 mm beträgt.
48. Verfahren zur Verwendung einer pektischen Substanz nach Anspruch 1 zur Bildung einer Perle, die zur kontrollierten Freisetzung eines darin eingekapselten pharmakologischen Mittels geeignet ist, umfassend Mischen des pharmakologischen Mittels mit der pektischen Substanz, die ein Molekulargewicht von 10^4 Dalton bis 10^7 Dalton aufweist, in einer Lösung unter Bildung eines Gemisches und mit einer Konzentration von 0,5 mg/ml bis 20 mg/ml; und
Zugeben des Gemisches zu einer Lösung eines Calciumsalzes mit einer Konzentration von 0,05 M bis 1 M bei einem pH von 3 bis 9 unter Erzeugung der Perle einer Größe von 1 Mikron bis 5 mm.
49. Verfahren zur Bildung einer Matrix für eine Antigen-und-Antikörper-Fällungsreaktion, umfassend:
Zugeben eines Antigens zu einer Lösung einer pektischen Substanz nach Anspruch 1 mit einem Molekulargewicht von 10^4 Dalton bis 10^7 Dalton unter Erhalt eines Gemisches; und
Abkühlen des Gemisches auf eine Temperatur von -10°C bis 10°C unter Erhalt einer Gelmatrix.
50. Verfahren zur Bildung einer Matrix für eine Antigen-und-Antikörper-Fällungsreaktion, umfassend:
Zugeben eines Antikörpers zu einer Lösung einer pektischen Substanz nach Anspruch 1 mit einem Molekulargewicht von 10^4 Dalton bis 10^7 Dalton unter Erhalt eines Gemisches; und
Abkühlen des Gemisches auf eine Temperatur von -10°C bis 10°C unter Erhalt einer Gelmatrix.
51. Verfahren zur Bildung einer Aufbewahrungsmatrix für ein pharmakologisches Mittel, umfassend:
Zugeben des pharmakologischen Mittels zu einer Lösung einer pektischen Substanz nach Anspruch 1 mit einem Molekulargewicht von 10^4 Dalton bis 10^7 Dalton unter Erhalt eines Gemisches; und
Abkühlen des Gemisches auf eine Temperatur von -10°C bis 10°C unter Erhalt der Aufbewahrungsmatrix.
52. Produkt, das durch das Verfahren nach einem der Ansprüche 28 bis 51 hergestellt worden ist.

Es folgen 5 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

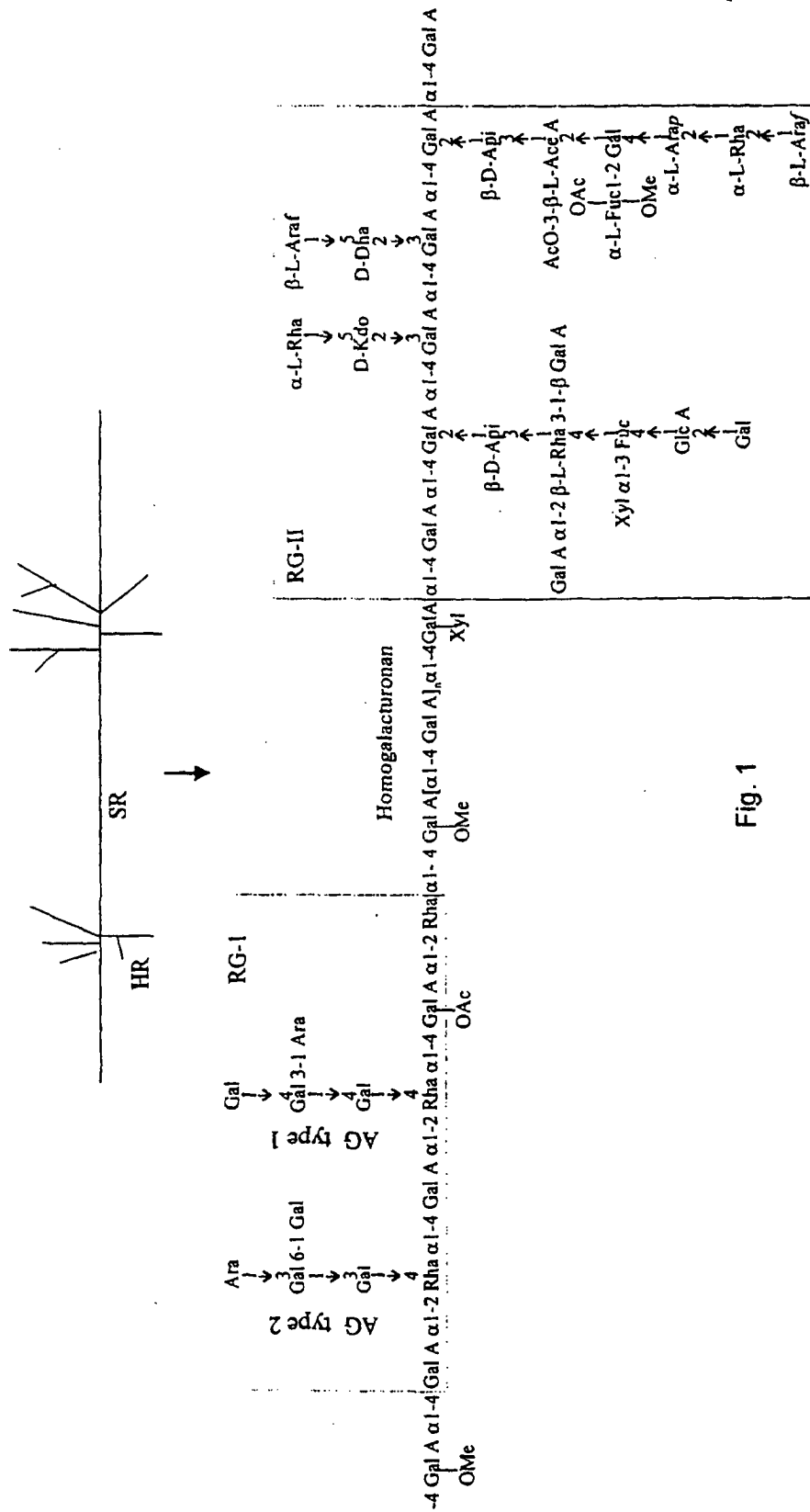


Fig. 1

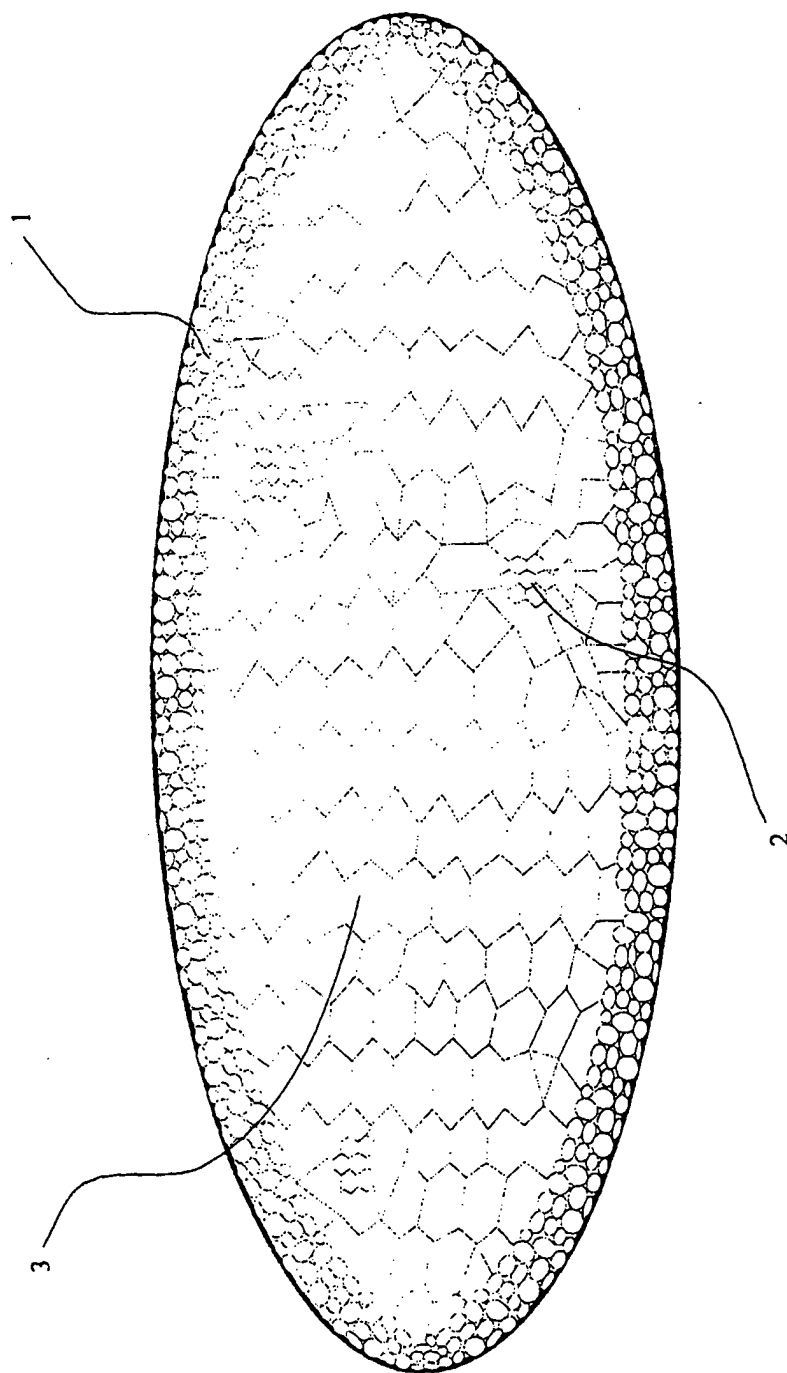


Fig. 2

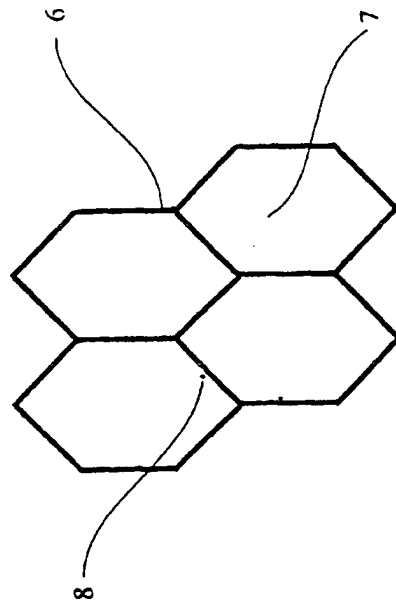


Fig. 3

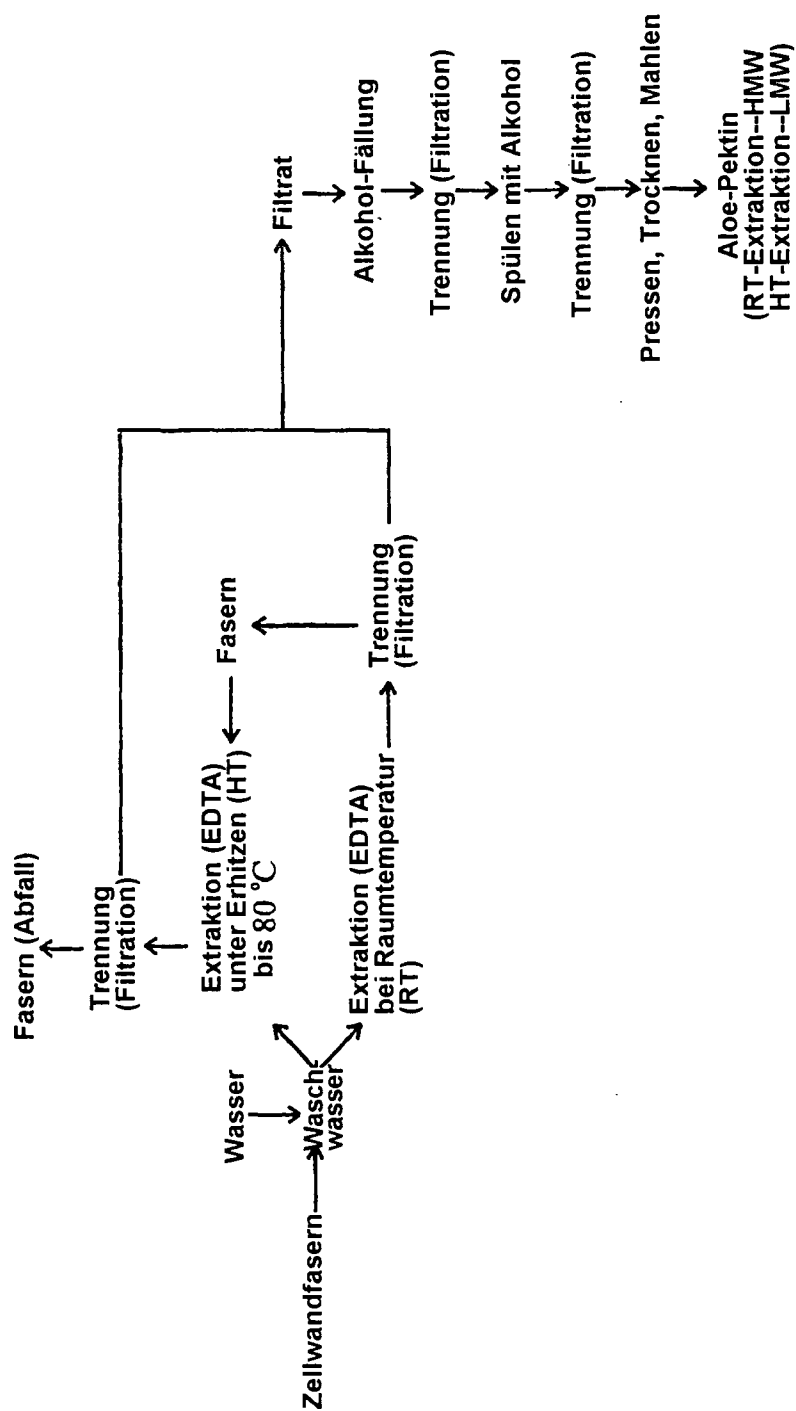


Fig. 4

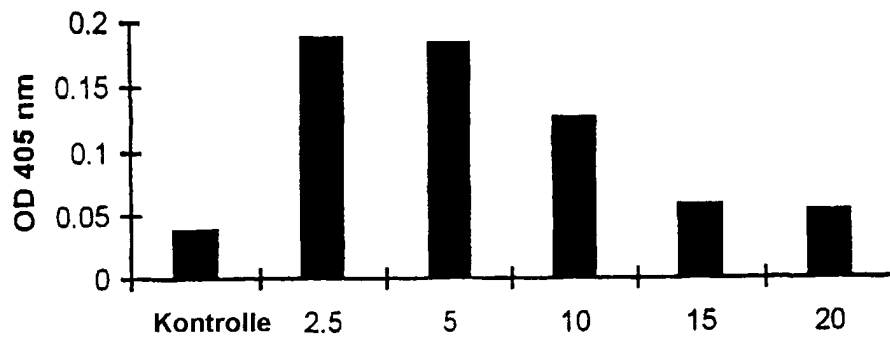


Fig. 5a

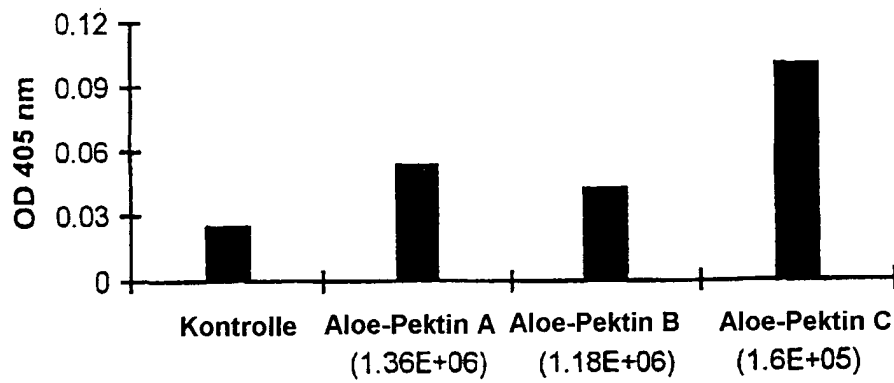


Fig. 5b

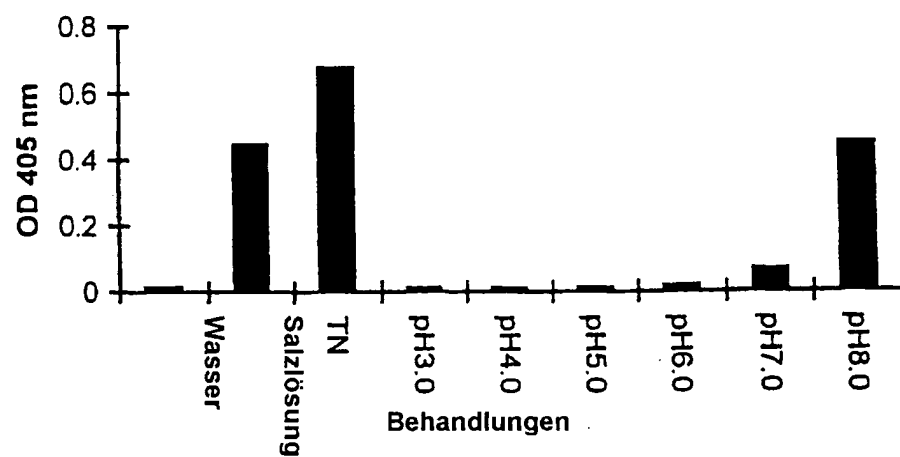


Fig. 5c