

**Entwicklung verschiedener Aufreinigungs- und
Analysestrategien für Proteine und Glykoalkaloide in
Kartoffelfruchtwasser**

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Hannover

zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften
- Dr. rer. nat. -

genehmigte
Dissertation

von

Dipl.-Chem. Veronika Alt
geboren am 23.08.1976
in Verden (Aller)

Hannover 2006

Referent: Prof. Dr. Thomas Scheper
Korreferent: Prof. Dr. Diethardt Hesse
Tag der Promotion: 04. Mai 2006

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von Mai 2002 bis Juli 2005 am Institut für Technische Chemie der Universität Hannover unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Thomas Scheper durchgeführt. Ihm danke ich für die Überlassung des interessanten Themas und die Freiheit, meine eigenen Ideen zu verwirklichen, für die wissenschaftliche Betreuung und die Förderung der Arbeit sowie für das mir entgegengebrachte Vertrauen.

Herrn Prof. Dr. Diethardt Hesse möchte ich für die Übernahme des Korreferates danken.

Dem Industriepartner Emsland-Stärke GmbH danke ich für die angenehme Zusammenarbeit. Ganz besonders möchte ich Dr. Martin Lotz für die stetige Unterstützung und konstruktiven Anregungen danken.

Dr. Cornelia Kasper gilt mein Dank für die gute Betreuung und das Korrekturlesen dieser Arbeit. Ebenso möchte ich Dr. Sascha Beutel für das Korrekturlesen herzlich danken.

Für die Überlassung zahlreicher Kartoffelprotein-Fractionen danke ich Dr. Frauke Menzel und Rafael Steinhof.

Martina Weiß möchte ich ganz besonders für ihre Ratschläge und Unterstützung bei der Wartung und Reparatur der HPLC und viele weitere gute Ideen danken.

Der Diplomandin Tanja Herrmann, dem Praktikanten Marcel Fischer und dem Hiwi Tobias Knobloch danke ich für die gute und ergebnisreiche Zusammenarbeit.

Dr. Ivo Havlik und Dr. Michael Dors ein Dankeschön für die schnellen Reparaturen an älteren Rechnern, die sie schnell wieder zum Laufen bekommen haben.

Für die tatkräftige Unterstützung bei den Reparaturen des MALDI bedanke ich mich bei Dr. Hellmuth Wurm.

Bei Dr. Harald John vom IPF Pharmaceuticals möchte ich mich für die durchgeführten MALDI-Messungen herzlich bedanken.

Alex Gierse und Daniel Riechers gebührt mein Dank für die Unterstützung beim MTT-Test und bei den Adsorptionsversuchen.

Bei allen weiteren Kollegen im AK Scheper möchte ich mich für die angenehme Arbeitsatmosphäre und gute Zusammenarbeit bedanken.

Jirko möchte ich für die aufbauende Unterstützung, Motivation und das Zuhören, gerade nach nicht immer erfolgreichen Versuchen, ebenso danken wie für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Nicht zuletzt gilt mein herzlicher Dank meinen Eltern für ihre Liebe, die großzügige Unterstützung und die Begleitung während meiner Studien- und Promotionszeit.

Kurzzusammenfassung

Jährlich werden in Deutschland ca. 12,6 Mio. t Kartoffeln angebaut. Rund ein Viertel davon sind Stärkekartoffeln, aus denen im industriellen Maßstab Stärke gewonnen wird. Bei diesem Produktions-Prozess fällt als Nebenprodukt das sogenannte Kartoffelfruchtwasser an, welches lange als entsorgungspflichtiger Reststoff angesehen wurde. Das Kartoffelfruchtwasser enthält jedoch viele wertvolle lösliche Bestandteile, so auch ca. 2 % Proteine. Diese sollen aus dem stärkeproduzierenden Prozess in nativer Form gewonnen werden. Anschließend wäre eine Vermarktung als Inhaltsstoff für Functional Food (Nutraceuticals), Sportler- und Babyernährung, Diätetika und Pharmazeutika denkbar. In Zukunft wird somit die Kartoffel bei der biotechnologischen Nutzung nachwachsender Rohstoffe zunehmend an Bedeutung gewinnen.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurden ausgehend von den bereits erfolgreich aus dem Kartoffelfruchtwasser mittels Ionenaustausch-Chromatographie gewonnenen Protein-Fractionen verschiedene instrumentelle Analysemethoden mittels RP-HPLC, MALDI-MS und CE entwickelt. Dabei ist es gelungen, Patatin als Hauptkomponente mittels tryptischen Verdau vom SDS-PAGE und anschließender MALDI-MS-Messung mit einer Sequenzabdeckung von 40 % in der Q-Fraktion nachzuweisen. Kapillarelektrophoretische (CE) Messungen zeigten darüber hinaus verschiedene Isoformen des Patatins. Verschiedene Protease-Inhibitoren aus der S-Fraktion konnten ebenfalls mittels MALDI-MS nachgewiesen werden. Zusätzlich wurden zur Verfolgung der biologischen Aktivität sowohl für die Protease-Inhibitoren als auch für das Patatin geeignete Enzym-Assays etabliert.

Der zweite Teil der vorliegenden Arbeit beschäftigt sich mit der Extraktion und Analytik der ebenfalls im Kartoffelfruchtwasser vorliegenden toxischen Glykoalkaloide. Die wichtigsten Vertreter in der Kartoffel sind α -Solanin und α -Chaconin. Für eine Gewinnung und damit verbundene Nutzung als Nahrungsergänzungsmittel oder Pharmazeutika müssen die toxischen Glykoalkaloide in den gewonnenen Protein-Proben abgereichert werden. Für die in Pulverform vorliegenden Kartoffelprotein-Proben wurde ein dreistufiger Prozess entwickelt. Dieser unterteilt sich in essigsäure Extraktion, Aufreinigung mittels Festphasenextraktion und HPLC-Analytik. Glykoalkaloide weisen nur ein sehr geringes UV-Absorptions-Vermögen auf, so dass Quantifizierungen geringer Konzentrationen erst durch eine Aufkonzentrierung mittels Festphasenextraktion möglich wurden. Unter den hier beschriebenen Bedingungen ist ein Nachweis bis in den unteren ppm-Bereich (20 ppm) bei einfacher UV-Detektion möglich. Zusätzlich zu der quantitativen Analytik von α -Solanin und α -Chaconin ist ein qualitativer Nachweis von β -Chaconin erzielt worden. Die Toxizität der Glykoalkaloide ist darüber hinaus *in vitro* unter Einsatz von Zellkulturen untersucht worden.

Stichworte: Kartoffelfruchtwasser, Patatin, Protease-Inhibitoren, Glykoalkaloide

Abstract

Annually about 12.6 mio t of potatoes are cultivated in Germany. About 25 % of these are starch potatoes from which starch is industrially produced. During this production process potato fruit juice (PFJ) occurs as a by-product which was considered as a non-desired waste material in the past which represents an enormous recycling problem. However the potato fruit juice contains many valuable soluble components, approx. 2 % proteins for example. These proteins shall be recovered from the starch-producing process in biological active form. Subsequently a commercialization as ingredient for functional food (nutraceuticals), athlete and baby food, diet and pharmaceutical products is conceivable. In the future the potato will gain importance in biotechnological use of renewable primary products.

Starting from already successfully obtained protein fractions from ion exchange chromatography different analytical methods such as RP-HPLC, MALDI-MS and CE have been developed in the first part of this work. After a tryptic digest of the patatin band from SDS-PAGE followed by MALDI-MS measurement patatin was identified in the Q fraction with a sequence coverage of 40 %. Furthermore different isoforms of patatin were determined by capillary electrophoresis. Different protease inhibitors from S fraction could also be determined using MALDI-MS. Additionally, enzyme assays for monitoring of biological activity of protease inhibitors and patatin have been established.

The second part of the presented work covers the extraction and analysis of the toxic glycoalkaloids in potato fruit juice. The most important representatives in the potato are α -solanine and α -chaconine. For the profitable use of the potato proteins as dietary supplements or pharmaceuticals the toxic glycoalkaloids have to be removed from the obtained samples. An extraction process with three main steps was developed for the powdery potato protein samples. The process is divided into acetic acid extraction, SPE-purification and HPLC analysis. Since glycoalkaloids have only a minor UV-absorption capacity the quantification of low concentrations could only be carried out by concentrating the samples during SPE-purification. Using the described extraction process the glycoalkaloid determination was possible down to a low ppm-range (20 ppm) with simple UV-detection. Apart from the quantification of α -solanine and α -chaconine qualitative analysis of β -chaconine was achieved. Furthermore the toxicity of glycoalkaloids has been examined using cell culture experiments.

Keywords: potato fruit juice, patatin, protease inhibitors, glycoalkaloids

1	Einleitung und Zielsetzung.....	1
2	Theoretischer Teil	4
2.1	Solanum tuberosum.....	4
2.2	Kartoffelfruchtwasser.....	7
2.2.1	Majores Kartoffelprotein	8
2.2.2	Minore Kartoffelproteine.....	9
2.2.3	Abtrennung und Analytik	11
2.3	Glykoalkaloide	12
2.3.1	Definition und Struktur.....	12
2.3.2	Funktion der Glykoalkaloide in der Kartoffel	14
2.3.3	Verteilung der Glykoalkaloidgehalte in der Kartoffelpflanze.....	15
2.3.4	Einflussfaktoren auf die Glykoalkaloid-Gehalte	16
2.3.5	Biosynthese	18
2.3.6	Toxikologie und Pharmakologie.....	21
2.3.7	Abtrennung und Analytik	23
3	Praktischer Teil – Protein-/Peptidanalytik –	27
3.1	Entwicklung einer RP-HPLC-Methode für die Analyse von Proteinen in Kartoffelfruchtwasser.....	27
3.1.1	Entwicklung eines Lösungsmittelgradienten.....	27
3.1.2	Säulen-Auswahl	29
3.1.3	MALDI-MS der HPLC-Fractionen	30
3.1.4	Anwendung der entwickelten Methode.....	33
3.2	MALDI-MS.....	36
3.2.1	Tryptischer Verdau	39
3.3	Kapillarelektrophorese	46
3.4	Biologische Aktivität von Protease-Inhibitoren	48
3.5	Biologische Aktivität von Patatin	50
3.6	Hydrolyse von Kartoffelproteinen	52
3.7	Zusammenfassung	59
4	Praktischer Teil – Glykoalkaloid-Analytik –	61
4.1	HPLC-Methode für α -Chaconin und α -Solanin.....	61

4.2	Extraktionsmethode	65
4.3	Entwicklung einer SPE-Methode	66
4.3.1	„20-bottle-trick“	68
4.3.2	Vergleich der verschiedenen Waschschr	72
4.3.3	Wiederfindungsraten.....	73
4.3.4	Optimierung der Nachweisgrenze.....	74
4.4	Glykoalkaloid-Bestimmungen in verschiedenen Proben	76
4.5	Bestimmung von β -Chaconin.....	78
4.6	Zeit- und Kostenabschätzung.....	81
4.7	Wiederverwendung der SPE-Kartuschen.....	81
4.8	Adsorption von α -Solanin an Bentonite.....	82
4.9	Biologische Aktivität von α -Solanin	84
4.10	Zusammenfassung	85
5	Zusammenfassung, Diskussion und Ausblick	86
6	Anhang.....	91
6.1	Abbildungen.....	91
6.1.1	Kalibration für RP-HPLC.....	91
6.1.2	Maldi-Spektren.....	91
6.1.3	Tryptischer Verdau vom SDS-Gel	93
6.1.4	Kalibration für CE	93
6.1.5	Enzymreaktion N- α -Tosyl-L-Argininmethylester	94
6.1.6	Reaktionsbedingungen für Protease-Inhibitor-Assay	94
6.1.7	Bestimmung des molaren Extinktionskoeffizienten.....	95
6.1.8	Inhibierung der Trypsinaktivität mit Trypsin-Inhibitoren	96
6.1.9	Enzymreaktion p-Nitrophenolcaprat	96
6.1.10	Reaktionsbedingungen für Patatin-Enzym-Assay	97
6.1.11	Wellenlängenscan von α -Solanin	97
6.1.12	Säulenvergleich für Glykoalkaloid-Analytik	98
6.1.13	Chromatogramme für α -Chaconin und α -Solanin	98
6.1.14	SPE-Material Oasis-HLB.....	99
6.1.15	Kalibration von β -Chaconin.....	99
6.1.16	Hep-G2-Zellen	100

6.2	Methoden	100
6.2.1	Zip-Tip-Aufreinigung.....	100
6.2.2	Spülschritte für Kapillarelektrophorese	100
6.2.3	Aminosäure-HPLC	101
6.2.4	Gelelektrophorese	101
6.2.5	Tryptischer Verdau vom SDS-Gel	102
6.2.6	Mikrobiuret	103
6.2.7	Keimzahlbestimmung.....	104
6.2.8	Methoden und Ergebnisse zur Hydrolyse von KFW	104
6.2.9	Wiederfindung von α -Chaconin und α -Solanin.....	108
6.2.10	Zellkultur	108
6.2.11	MTT-Assay.....	109
6.3	Geräte.....	110
6.4	Materialien	113
6.5	Reagenzien	115
6.6	Puffer und Lösungen.....	117
6.7	Abkürzungsverzeichnis	118
7	Literaturverzeichnis.....	120

1 Einleitung und Zielsetzung

Die Einfuhr der Kartoffel nach Europa Mitte bis Ende des 16. Jahrhunderts legte den Grundstein für eine Sicherstellung der Ernährung der Bevölkerung. Zunächst schmeckte die Kartoffel bitter und ihr Genuss wurde von Ärzten für das Auftreten verschiedener Krankheiten wie z.B. Lepra verantwortlich gemacht. Damals war noch nicht bekannt, dass die Kartoffel (*Solanum tuberosum*) zu der Familie der Nachtschattengewächse gehört und daher toxische Alkaloide enthält. Erst durch Veränderung der Kartoffel durch Züchtung konnten die Alkaloid-Gehalte verringert und somit die Vorurteile und das Misstrauen gegenüber der Kartoffel ausgeräumt werden. Der landwirtschaftliche Anbau der Kartoffel verbreitete sich erst Mitte des 19. Jahrhunderts und konnte seitdem wesentlich zur Grundversorgung der Bevölkerung beitragen. Dank des Kartoffelanbaus wurde es in Europa möglich, schwere Hungersnöte zu überstehen.

Heute ist eine ausreichende Versorgung der Bevölkerung in Europa mit Nahrungsmitteln und zusätzlicher Eiweißnahrung gedeckt. Dennoch gibt es zahlreiche Anwendungsgebiete, in denen die Aufnahme hochwertiger Proteine oder Aminosäuregemische vorteilhaft sein kann. In diesem Zusammenhang sind die Spezialnahrung, z.B. für Kleinkinder, künstliche Ernährung und für Hochleistungssport (Muskelaufbau) zu nennen. Proteine aus Kartoffeln bieten hierfür eine hervorragende Quelle und vor allem eine risikolose Alternative zum kontrovers diskutierten Gen-Soja. Die biologische Proteinwertigkeit der Kartoffel liegt durch die hohen Gehalte der essenziellen Aminosäuren bei 67-71 im Vergleich zu Vollei (100) und bietet daher eine sehr gute Grundlage für den Einsatz im Bereich Functional Food (Nutraceuticals), Sportler- und Babyernährung, Diätetika und in der pharmazeutischen Industrie.

Die Proteine der Kartoffel werden in drei große Gruppen unterteilt. Der ersten Gruppe gehört auch das Hauptspeicherprotein der Kartoffel, das Patatin, mit einer Größe von 40-44 kDa an. Die Protease-Inhibitoren bilden die zweite, sehr heterogene Gruppe der Kartoffelproteine. Sie unterscheiden sich sowohl in ihrem Molekulargewicht und ihrer Aminosäuresequenz als auch in ihrer inhibierenden Aktivität. Es sind jedoch alles kleine Cystein-reiche, hitzestabile Proteine mit Molekulargewichten von 3-23 kDa. Zusätzlich besitzen sie sowohl eine anti-karzinogene Wirkung als auch die Eigenschaft zur Einstellung der Übersättigung. Letztere wird für die Anwendung als Appetitzügler herangezogen. Die dritte Gruppe setzt sich vor allem aus höher molekularen Proteinen wie Polyphenoloxidasen (60-69 kDa), Protein-Kinase (140 kDa) und Phosphorylasen (180-600 kDa) zusammen.

Neben den Proteinen beinhaltet die Kartoffel eine weitere unter pharmazeutischen und toxikologischen Gesichtspunkten, sehr interessante Gruppe, die der Glykoalkaloide. In kommerziell erhältlichen Kartoffelsorten stellen α -Solanin und α -Chaconin 95 % aller Glykoalkaloide dar. Für den Menschen bedeutet eine orale Dosis von 1 mg/kg Körpergewicht bereits eine toxische Konzentration. Daher haben viele Länder, so auch Deutschland, neue

Sicherheitsrichtlinien entworfen, nach denen die Glykoalkaloid-Konzentrationen 60-70 mg/kg Kartoffel nicht überschreiten sollten. Auf der anderen Seite sind Steroid-Glykoalkaloide interessante Startmaterialien für die Synthese von Steroid-Medikamenten und Steroid-Hormonen, wie z.B. Cortison und Progesteron. In jüngster Zeit wird zusätzlich noch eine antikarzinogene Wirkung der Glykoalkaloide beschrieben, wodurch sich ein noch größeres Anwendungsgebiet erschließen würde.

In Deutschland lag der Kartoffelertrag im Jahr 2004 bei 12,6 Mio. t. Ungefähr 3,4 Mio. t davon sind Stärkekartoffeln. Bei der Verarbeitung zu Stärke fällt eine große Menge (ca. 80 % der Kartoffel besteht aus Wasser) des so genannten Kartoffelfruchtwassers an. Kartoffelfruchtwasser galt lange als Abfallstoff aus der Kartoffelstärke-Industrie, dessen Recycling aufgrund der ungenügenden Trennung des Kartoffelfruchtwassers von seinen festen Inhaltsstoffen schwer zu realisieren ist und damit auch ein umweltrelevantes Problem darstellt. Früher wurde es hauptsächlich als Düngemittel für Agrarflächen verwendet. Die Kartoffel besteht zu 2 % aus Proteinen, folglich könnten aus 3,4 Mio. t/a Stärkekartoffeln 68.000 t/a Kartoffelprotein gewonnen werden. Zur Zeit werden jedoch lediglich ca. 45.000 t/a Kartoffelprotein durch Eiweißfällung mittels Heißdampf injektion gewonnen. Die ernährungsphysiologische Wertigkeit des Kartoffelproteins wird dadurch deutlich verringert und lässt nur noch eine Vermarktung als wirtschaftlich unbedeutendes Tierfutterzusatzmittel zu.

Für die Zukunft bietet die Kartoffel ein großes Potential für die Erschließung nachwachsender Rohstoffe zur Isolierung hochwertiger Proteine, die als funktionelle Inhaltsstoffe für Nahrungsergänzungsmittel vermarktet werden können. Bisher ist im technischen Maßstab keine Auftrennung oder Charakterisierung der verschiedenen Kartoffelproteine erfolgt.

GESAMTPROJEKTZIEL

In Zusammenarbeit mit der Emsland-Stärke GmbH soll im Rahmen dieses Forschungsprojektes eine Abtrennung und Aufbereitung ausgewählter nativer Proteine aus dem Kartoffelfruchtwasser erreicht werden. Dabei soll ausgehend von einer Labormethode ein Up-Scaling in den Technikums-Maßstab und als Endziel eine Implementierung in den Stärkeproduktions-Prozess bei der Emsland-Stärke GmbH erreicht werden.

PROTEIN- UND PEPTID-ANALYTIK

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Entwicklung verschiedener Analysemethoden für die gewonnenen Protein-Fraktionen. Als Schwerpunkt soll die instrumentelle Analytik mittels chromatographischer, massenspektrometrischer und kapillarelektrophoretischer Methoden Anwendung finden. Darüber hinaus soll die biologische Aktivität der Kartoffelproteine bestimmt werden. Dafür sollen Enzymassays entwickelt werden, die eine Verfolgung der biologischen Aktivität der verschiedenen im Kartoffelfruchtwasser enthaltenen Proteinklassen erlauben. Zusätzlich soll die enzymatische Hydrolyse des Kartoffelfruchtwassers angestrebt und die dabei entstehenden Hydrolysate auf ihren Protein-, Peptid- und Aminosäure-Gehalt untersucht werden.

GLYKOALKALOID-ANALYTIK

Neben der Protein- und Peptidanalytik soll auch eine geeignete Methode zur Analytik der Glykoalkaloide etabliert werden. Dabei spielen vor allem die bei der Emsland-Stärke GmbH mittels Heißdampfinjektion gewonnenen Kartoffelprotein-Proben aus dem Kartoffelfruchtwasser eine wichtige Rolle. Für diese schwerlöslichen, in Pulverform vorliegenden Proben soll eine Extraktions- und Analysenmethode erarbeitet werden. Als entscheidend für die Entwicklung sollen die benötigte Analysenzeit, ein großes Probenaufkommen und geringe Glykoalkaloid-Konzentrationen berücksichtigt und optimiert werden.

2 Theoretischer Teil

2.1 Solanum tuberosum

Die Kartoffel, *Solanum tuberosum*, gehört wie Tomaten, Paprika, Aubergine und Tabak zur Familie der Nachtschattengewächse (Solanaceae) [1]. Als knollentragende Solanum-Art hat die Kartoffel ihr natürliches Verbreitungsgebiet von den Anden Südamerikas bis Mittelamerika, dazu gehören die Gebirge und Hochebenen der heutigen Staaten Argentinien, Chile Bolivien, Peru, Ecuador, Kolumbien und Venezuela. Zur Kartoffel zählen etwa 220 Wildarten und acht Kulturarten. Alle Nachtschattengewächse enthalten giftige Alkaloide, z.B. Solanin, in den Wildarten liegen sie jedoch in höheren Konzentrationen vor, wodurch sie für eine Kultur ungeeignet sind [2].

GESCHICHTE

In den südamerikanischen Anden war die Kartoffel schon etwa 8.000 Jahre v. Chr. eine Kulturpflanze der Ureinwohner. Mit ihren sprießenden Keimen wurde sie von den Indios als Symbol der Fruchtbarkeit verehrt [1, 3]. Bis heute ist nicht genau geklärt, wie, wann und durch wen die Kartoffel nach Europa kam. Der englische Seefahrer Sir Francis Drake galt lange als „Importeur“ der Kartoffel. Mittlerweile nimmt man an, dass der berühmte Seefahrer und Entdecker Walter Raleigh (1552-1618) die Kartoffel nach Irland gebracht hat [2]. Nach der Einfuhr der Kartoffel nach Europa in der zweiten Hälfte des 16. Jahrhunderts wurde sie zunächst nur wegen der schönen Blüte und des üppigen Laubes als reine Zierpflanze gezüchtet und als seltene Pflanze in botanische Gärten aufgenommen. Erst etwa ein Jahrhundert später wurde in Preußen durch Anweisung von Friedrich dem Großen (1712-1786) die landwirtschaftliche Nutzung begonnen. Allerdings verbreiteten sich der feldmäßige Anbau und der Verzehr nur schleppend, erst nach 1850 wurde der Kartoffelanbau in Deutschland in größerem Maße betrieben [2, 3].

ANBAU, ERTRAG, VERWENDUNG

In den Jahren 2003/2004 wurden weltweit ca. 18,3 Mio. ha Kartoffeln angebaut, geerntet wurden dabei in etwa 300 Mio. t Kartoffeln (siehe Tabelle 2.1). Die größten Kartoffelanbaugebiete liegen dabei in Asien mit 7,3 Mio. ha, in Russland mit 3,2 Mio. ha, in der Ukraine mit 1,6 Mio. ha. und in Europa mit 2,7 Mio. ha. Die höchsten Erträge pro Hektar lassen sich in Nordamerika (36,3 t/ha) und Europa (23,8 t/ha) verzeichnen. In Deutschland wurde bei einer Anbaufläche von 293.000 ha 12,61 Mio. t Kartoffeln in den Jahren 2003/2004 erzeugt. Der Ertrag liegt damit bei ca. 43,1 t/ha und liegt damit weit über den Erträgen für Getreide [4].

Der Verbrauch von Speisekartoffeln in Deutschland beträgt jährlich etwa 67 kg/Kopf der Bevölkerung. Bei einer Gesamtbevölkerungszahl von ca. 82,5 Mio. Menschen ergibt das 5,5 Mio. t verzehrte Kartoffeln pro Jahr, hinzu kommt die Verarbeitung von Industrie-, Futter- und Pflanzkartoffeln. Dennoch verfügt Deutschland über einen Überschuss an Kartoffeln, die seit Ende der 90er Jahre als Exportgut dienen [5].

Tabelle 2.1 Weltweite Erzeugung von Kartoffeln 2003/2004 (Anbaufläche, Ertrag, Erntemenge) [5]

Region	Anbaufläche [1.000 ha]	Ertrag [t/ha]	Erntemenge [Mio. t]
Zentraleuropa (Deutschland)	2.704 (293)	23,8 (43,1)	64,36 (12,61)
Weißrussland	524	16,4	8,59
Ukraine/Moldawien	1.639	11,5	18,85
Russland	3.172	11,6	36,8
Nordamerika	791	36,3	28,71
Südamerika	937	15,1	14,15
Afrika	1.122	11,2	12,57
China	4.502	14,8	66,63
Indien	1.337	17,3	23,13
restliches Asien	1.498	17	25,47
Ozeanien	54	33,2	1,79
Summe	18.280	208,2	301,05

Der Anteil von Industriekartoffeln, wie Stärkekartoffeln, an der gesamten Kartoffelanbaufläche betrug 2003 und 2004 rund 29 %. Ihr Anteil an den insgesamt verarbeiteten Kartoffeln in Deutschland stieg von etwa 20 % Mitte der 70er Jahre auf ca. 50 % im Jahr 2003 an [5].

INHALTSSTOFFE

Die Kartoffel gilt als zweitwichtigste Quelle von produziertem Protein pro Hektar nach der Sojabohne und als zweitwichtigste Kohlenhydratquelle direkt nach dem Zuckerrohr [3, 6]. Die Zusammensetzung kann stark schwanken, Abbildung 2.1 zeigt die ungefähren prozentualen Anteile der Inhaltsstoffe der Kartoffel und des Kartoffelfruchtwassers (KFW). Die Kartoffel besteht aus knapp 80 % Wasser. Bei der Stärkeproduktion aus Kartoffeln fällt daher eine große Menge Wasser, das Kartoffelfruchtwasser, an.

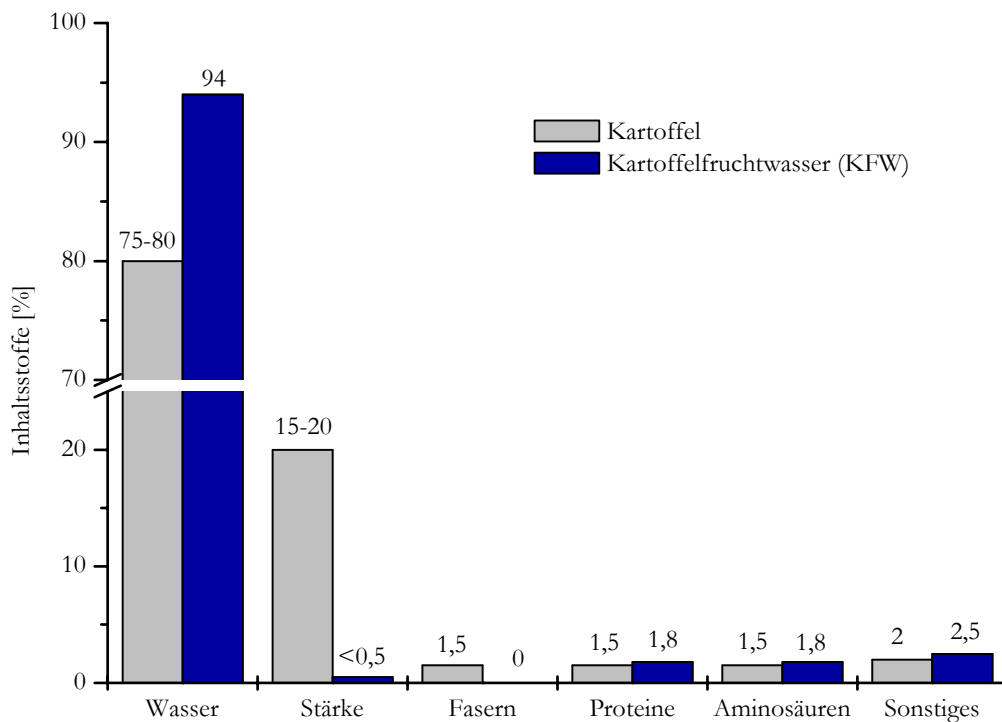


Abbildung 2.1 Inhaltsstoffe der Kartoffel und des Kartoffelfruchtwassers [7]

ERNÄHRUNGSPHYSIOLOGISCHE WERTIGKEIT

Abbildung 2.1 zeigt die ungefähren prozentualen Anteile der Inhaltsstoffe des KFW und der Kartoffel. Unter Sonstiges sind Zucker, Salze, Säuren, Fett und Vitamine zu zählen. Der hohe ernährungsphysiologische Wert der Kartoffel ergibt sich vor allem aus hochwertigen Protein-, hohem Vitamin- (B1, B2, C) und Mineralstoffgehalt (vor allem Kalium und Magnesium) [3]. Die biologische Wertigkeit eines Proteins wird häufig auf Vollei, das willkürlich mit dem Wert 100 definiert ist, bezogen. Die Wertigkeit der Kartoffelproteine basiert auf hohen Gehalte der essenziellen Aminosäuren Leucin, Lysin, Valin und Phenylalanin bei 67 – 71 [8-10]. In Tabelle 2.2 sind der Tagesbedarf eines Erwachsenen an essenziellen Aminosäuren, der Gehalt in der Kartoffel und die Konzentrationen der essenziellen Aminosäuren von Kartoffelprotein im Vergleich zum Eiprotein dargestellt.

Aus Tabelle 2.2 lässt sich errechnen, dass die durchschnittliche Relation von Kartoffelprotein zum Eiprotein einen Wert von $75 \pm 10,5$ hat. Der Wert zeigt, dass eine großtechnische Herstellung von hochwertigen Kartoffelproteinen eine zukunftssträchtige Veredelung von Lebensmitteln darstellen könnte. Ebenso ist die Nutzung der Kartoffelproteine für die menschliche Ernährung sehr empfehlenswert, insbesondere stellt der Gehalt an Aminosäuren im Kartoffelprotein ein ausgezeichnetes Potential für die Verwendung als Functional Food dar.

Tabelle 2.2 Täglicher Bedarf eine Erwachsenen (70 kg) an essenziellen Aminosäuren, Gehalt in 100 g Kartoffeln und Konzentrationen der essentiellen Aminosäuren von Kartoffelproteinen im Vergleich zum Eiprotein [8, 11]

Aminosäure	Täglicher Bedarf [mg]	Gehalt in der Kartoffel [mg/100g]	Kartoffel in Relation zum Eiprotein [%]
Isoleucin	700	100	68 ± 10
Leucin	980	140	83 ± 16
Lysin	840	130	85 ± 21
Methionin	910	50	54 ± 8
Phenylalanin	980	180	70 ± 7
Threonin	490	90	73 ± 9
Tryptophan	280	30	96 ± 5
Valin	700	130	71 ± 8

2.2 Kartoffelfruchtwasser

Proteinreiches Kartoffelfruchtwasser (ca. 20 g/l, pH 5,6-6) fällt bei der industriellen Verarbeitung von Stärkekartoffeln (ca. 20 % Stärke) zu Stärke in großen Mengen als landwirtschaftlicher Reststoff an (Abbildung 2.2).

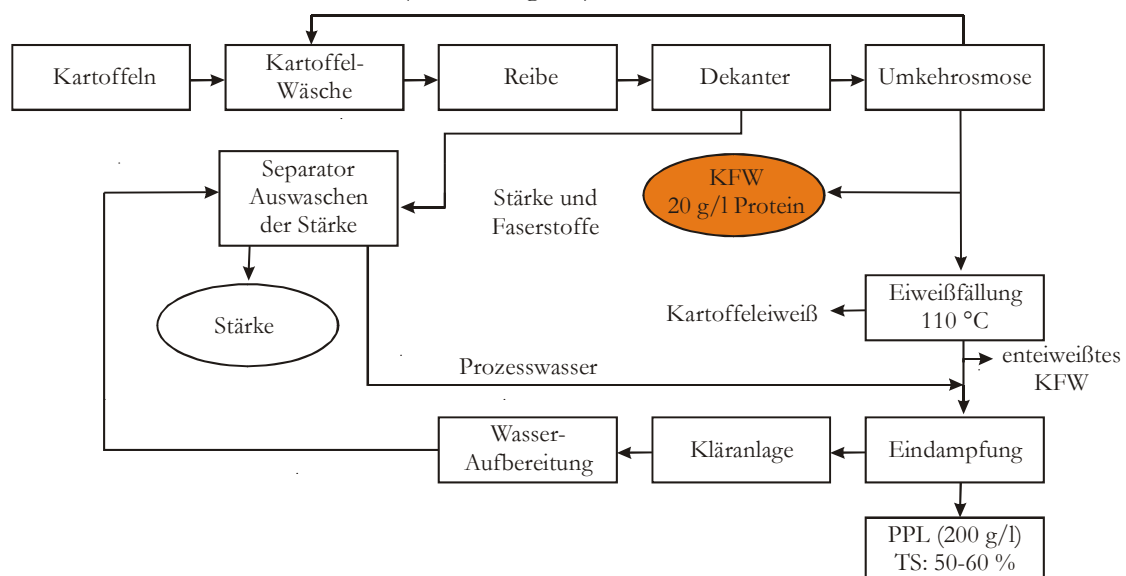


Abbildung 2.2 Prozessschema zur Stärkeproduktion und Gewinnung von Kartoffeleiweiß aus KFW bei der Emsland-Stärke GmbH [12]

In Abbildung 2.2 ist das Prozessschema zur Stärkeproduktion bei der Emsland-Stärke GmbH dargestellt. Aus dem dabei anfallende Kartoffelfruchtwasser wird mittels Heißdampf-injektion hitzeokoagulierte Kartoffeleiweiß gewonnen.

In Europa wird jährlich aus ca. 8,25 Mio. t Stärkekartoffeln 1,65 Mio. t Stärke gewonnen, in Deutschland sind es etwa 680.000 t Kartoffelstärke, die aus 3,4 Mio. t Kartoffeln produziert

werden (Emsland-Stärke GmbH in Emlichheim: ca. 950.000 t/a Kartoffeln → 190.000 t/a Stärke) [5, 8, 13, 14]. Bei einem Proteinanteil von ca. 2 % in der Kartoffel könnten rein rechnerisch 68.000 t Kartoffelprotein aus dem Kartoffelfruchtwasser pro Jahr in Deutschland gewonnen werden. Durch Eiweißfällung mittels Heißdampfinjektion werden aber z.Z. lediglich ca. 45.000 t/a Kartoffelprotein gewonnen und wegen seiner nur noch geringen ernährungsphysiologischen Bedeutung hauptsächlich als Tierfutterzusatz vermarktet. Die Emsland-Stärke GmbH hat durch diese Eiweißfällung bereits ein Konzept entwickelt, das KFW, das auch ein großes Entsorgungs- bzw. Recyclingproblem darstellt, aufzuarbeiten und das erhaltene Eiweiß gewinnbringend zu nutzen. Wenn es in Zukunft gelingen würde, die Kartoffelproteine in nativer Form zu isolieren, könnte zusätzlich eine wertschöpfende Veredelung der Kartoffelproteine erreicht werden [8].

Die Proteine im Kartoffelfruchtwasser lassen sich in drei große Gruppen unterteilen: Die erste Gruppe wird von Isoformen des Patatins gebildet (majores Kartoffelprotein 40-60 %). Die zweite Gruppe der Kartoffelproteine wird durch die Protease-Inhibitoren (minoren Kartoffelproteine 20-30 %) dargestellt. Eine dritte Gruppe (20-30 %) setzt sich aus vorwiegend höher molekularen Proteinen wie Polyphenoloxidasen (60-69 kDa), Enzyme, die in die Stärkesynthese involviert sind (Protein-Kinase 140 kDa) und Phosphorylasen (180-600 kDa) zusammen [4, 8, 15]. Letztere soll im Rahmen dieser Arbeit nicht näher betrachtet werden. Die Anteile am Gesamtprotein des KFW der drei beschriebenen Gruppen können je nach Sorte stark variieren.

2.2.1 Majores Kartoffelprotein

Mit 40-60 % stellt Patatin mengenmäßig das wichtigste lösliche Kartoffelprotein dar [15]. Seinen Trivialnamen hat es 1980 von Racusen et al. [16] bekommen, der zurückgeht auf „patata“, das spanische Wort für Kartoffel. Die Aminosäuresequenz des Patatin besteht aus 362 Aminosäuren und zeigt weder besonders hydrophile noch hydrophobe Cluster, sein molekulares Gewicht wird mit 40-44 kDa angegeben [17]. Bemerkenswert ist der große Tyrosingehalt mit 17 Tyrosinresten in Verbindung mit dem hohen Lysingehalt (21) [6, 8]. Patatin gehört zur Gruppe der Glykoproteine, die N-glykosidisch verknüpft sind. Die Glykosylierung liegt dabei am Amid-Stickstoff der Asparaginsäurereste mit kleinen komplexen Glykaneinheiten wie Xylose, Fucose, Mannose und N-Acetylglukosamin an den Positionen 37, 67, 92, 181 und 301 vor. Durch die gebundenen Oligosaccharide an den Seitenketten besitzt Patatin eine erhöhte Hydrophilie und eine verbesserte Löslichkeit in wässrigen Medien [8, 18]. Die Patatin-Familie besteht aufgrund des Glykosylierungsmusters und der Heterogenität der Primärstruktur aus vielen heterogen geladenen Isoformen (pI 4,5-5,2) [4, 19]. Dennoch ließ sich die enge Struktur-Homologie dieser Isoformen durch NH₂-terminale Sequenzierung von Park et al. [20] zeigen [21]. Nativ kann Patatin als Dimer vorliegen, agiert so als Fettsäure-Esterase und hat dann ein Molekulargewicht von 88 kDa [6, 8, 19].

Patatin gilt als Speicherprotein der Kartoffel, welches in den Vakuolen des Parenchyms und in

den Blättern gespeichert wird [18, 19]. Es besitzt eine enzymatische Aktivität als Acyl-Transferase und Lipid-Acy-Hydrolase (LAH) (Lipid-Deacylierung und Wachsester-Bildung). Letztere ist in der Abwehr gegen den Angriff von Insekten und Pathogenen involviert [4, 6, 21-23]. Zusätzlich weist es eine antioxidative Aktivität in der Kartoffel auf, die gleich nach der der Ascorbinsäure anzusiedeln ist. Eine weitere Art der hydrolytischen Aktivität für Patatin wurde als saure β -1,3-Glucanase beschrieben, die zur Abwehr von pilzartigen Pathogen in der Kartoffelpflanze beiträgt [18]. Die hauptsächliche physiologische Aufgabe des Patatins in der Kartoffel ist allerdings noch ungeklärt [19].

Es wurde gezeigt, dass Patatin beim Menschen auch eine allergische Reaktion auslösen kann [18, 24-26].

2.2.2 Minore Kartoffelproteine

Eine Vielzahl von Protease-Inhibitoren zählen zur zweiten heterogenen Klasse von Proteinen im KFW. Die verschiedenen Protease-Inhibitoren unterscheiden sich sowohl in ihrem Molekulargewicht und ihrer Aminosäuresequenz als auch in ihrer inhibierenden Aktivität. Gemein ist ihnen jedoch, dass es alle kleine Cystein-reiche, hitzestabile Proteine mit Molekulargewichten von 3-23 kDa sind. Ferner spielen die Protease-Inhibitoren eine große Rolle in den Abwehrmechanismen der Kartoffelpflanze gegen Schädlinge und pathogene Mikroorganismen. Ebenso kann man eine Akkumulation von Protease-Inhibitoren in der Kartoffel als Antwort auf eine mechanische Verletzung und nach Exposition mit solarer UV-Strahlung feststellen [27, 28]. Nachdem sie lange wegen ihrer geringen ernährungsphysiologischen Wertigkeit wenig Aufmerksamkeit bekamen, ist das Interesse an den Protease-Inhibitoren wegen ihrer möglichen anti-karzinogenen Eigenschaft und ihrer Eigenschaften als Sättigungsmittel erheblich gestiegen. Die anti-karzinogene Wirkung zeigt sich durch Störung der Proliferation von Tumorzellen. Die Eigenschaft zur Einstellung der Übersättigung kommt durch die (durch den Proteinase Inhibitor II stimulierte) Freigabe des Darmpeptids Cholecystokinin zustande [4, 29, 30].

Die Protease-Inhibitoren des KFW lassen sich in sieben Unterklassen einteilen. Tabelle 2.3 gibt einen Überblick über die sieben Unterklassen von Protease-Inhibitoren unter Berücksichtigung ihrer Molekulargewichte, pI-Werte, Anteile am Gesamtprotein im KFW und ihrer inhibierenden Wirkung auf Chymotrypsin und Trypsin.

Tabelle 2.3 Übersicht der im KFW enthaltenen sieben verschiedenen Klassen von Protease-Inhibitoren mit deren Molekulargewicht, pI-Wert, Anteil vom Gesamtprotein im KFW und inhibierendem Effekt auf Chymotrypsin und Trypsin [4, 29, 31]

Klasse	Molekulargewicht [kDa]	pI	Inhibitor-Typ	Anteil vom Gesamtprotein im KFW [%]	Inhibierende Aktivität auf Chymotrypsin /Trypsin [%]
Potato-Inhibitor I (PI-1)	fünf Isoinhibitor Promotoren 7,0-8,0	5,1-7,8	pentamerischer Serin-Protease-Inhibitor	4,5	19/2
Potato-Inhibitor II (PI-2)	zwei 10,2 Unter-einheiten	5,5-6,9	dimerischer Serin-Protease-Inhibitor	22	82/50
Potato-Cysteinyl-Protease-Inhibitoren (PCPI)	20,1-22,8	5,8-<9	neun verschiedene Cystein-Protease-Inhibitoren	12	16/10 (inhibierende Aktivität auch gegen Papain)
Potato-Aspartyl-Protease-Inhibitoren (PAPI)	19,9-22,0	6,2-8,7	sechs verschiedene Aspartat-Protease-Inhibitoren	6	9/2 (inhibierende Aktivität auch gegen Cathepsin D)
Potato-Kunitz-Protease-Inhibitoren (PKPI)	zwei 20,2 Einheiten	8,0->9	Kunitz-Protease-Inhibitor	4	2/3
Other Serine-Protease-Inhibitoren (OSPI)	21,0 und 21,8; 12,3	7,5-8,8; n.a.		1,5; n.a.	2/3; n.a.
Potato-Carboxypeptidase-Inhibitoren (PCPI)	4,3		Carboxypeptidase-Inhibitor	1	---

Für die spätere Analytik der Fraktionen aus dem Kartoffelfruchtwasser wurden als Standardsubstanzen ein Kunitz-Inhibitor, ein Carboxypeptidase-Inhibitor und ein Bowman-Birk-Inhibitor (Trypsin-Chymotrypsin-Inhibitor) verwendet.

2.2.3 Abtrennung und Analytik

Neben der in der Stärkeindustrie gebräuchlichen Proteingewinnung durch Eiweißfällung mittels Heißdampfinjektion sind in der Literatur zur Abtrennung der Proteine in nativer Form aus dem Kartoffelfruchtwasser verschiedenste Methoden beschrieben. Dazu gehören beispielsweise: Präzipitation mit Polyphosphorsäure, Präzipitation mit FeCl_3 , Präzipitation mit Bentoniten, Ionenaustausch-Chromatographie, Expanded Bed Adsorption, Hitzebehandlungen zur Gewinnung einzelner hitzestabiler Protease-Inhibitoren gefolgt von Ultrafiltration und Zentrifugation. Alle beschriebenen Methoden konnten eine effiziente Abtrennung der Proteine gewährleisten, die funktionellen Eigenschaften der Proteine blieben jedoch nicht in vollem Umfang erhalten [4, 8, 32-37]. Eine effektive Auftrennung der nativen Proteine im KFW ist im technischen Maßstab bisher nicht gelungen.

Zur Analytik von Proteinen und Protease-Inhibitoren aus dem KFW werden vorwiegend gelelektrophoretische Methoden verwendet, Anwendungen zur instrumentellen Analytik sind nur wenig publiziert. Die Isoformen der Patatin-Familie (pI 4,5-5,2) lassen sich durch Kapillarelektrophorese (CE) sowie durch RP-HPLC (Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography) und MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization-Time-of-Flight) unterscheiden [15, 38]. Zur Analytik der Protease-Inhibitoren sind in der Literatur Methoden mittels MALDI-TOF und RP-HPLC verwendet worden [15, 33, 34, 36, 37].

2.3 Glykoalkaloide

2.3.1 Definition und Struktur

ALKALOIDE

Zu den Alkaloiden (vom arabischen kalaja = brennen und griechischen εἶδος = aussehen) werden rund 10.000 Naturstoffe überwiegend pflanzlicher Herkunft gezählt. Es handelt sich um basische Naturstoffe mit einem oder mehreren meist heterocyclisch eingebauten Stickstoffatomen. Trotz der Bezeichnung „Alkaloid“ reagieren nicht alle Vertreter alkalisch. Auf den menschlichen Organismus wirken sie bereits in kleinen Dosen, z.B. anregend, beruhigend, schmerzbetäubend, aber auch psychoaktiv, d.h. euphorisierend bis halluzinogen. Die meisten stickstoffhaltigen Naturstoffe wie Aminosäuren, Peptide, Proteine und stickstoffhaltige Antibiotika gehören nicht zu den Alkaloiden. Der Begriff Alkaloid ist also nicht besonders präzise. Folgende Definition könnte sich als kaum kritisierbar erweisen: „Alkaloide gehören zu den stickstoffhaltigen organischen Verbindungen natürlicher Herkunft; nicht alle, aber viele Alkaloide reagieren basisch, enthalten einen Heterocyclus und entfalten biologische Aktivität“ [39]. Die Bezeichnungen der Alkaloide enden mit der Silbe -in und sind meist Wortschöpfungen der Entdecker, die sich an der natürlichen Herkunft orientieren, z.B. Nicotin aus der Tabakpflanze *Nicotiana tabacum*.

STEROID-ALKALOIDE

Es sind über 100 Steroid-Alkaloide bekannt, die sich fast alle vom tetracyclischen 5 α -Pregnan und 5 α -Cholestan-Grundskelett (C27) ableiten (siehe Abbildung 2.3).

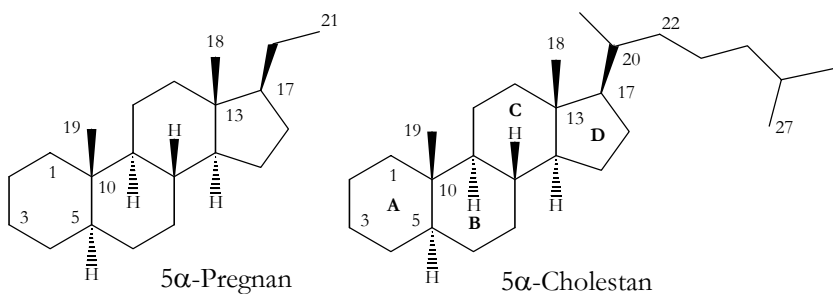
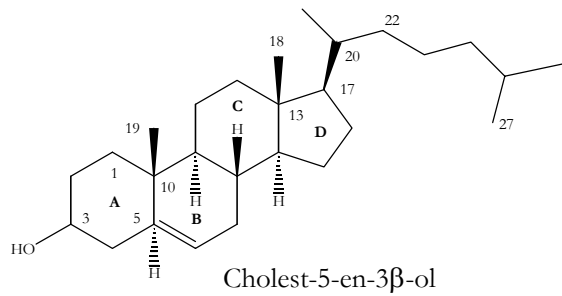


Abbildung 2.3 Strukturformeln von 5 α -Pregnan und 5 α -Cholestan

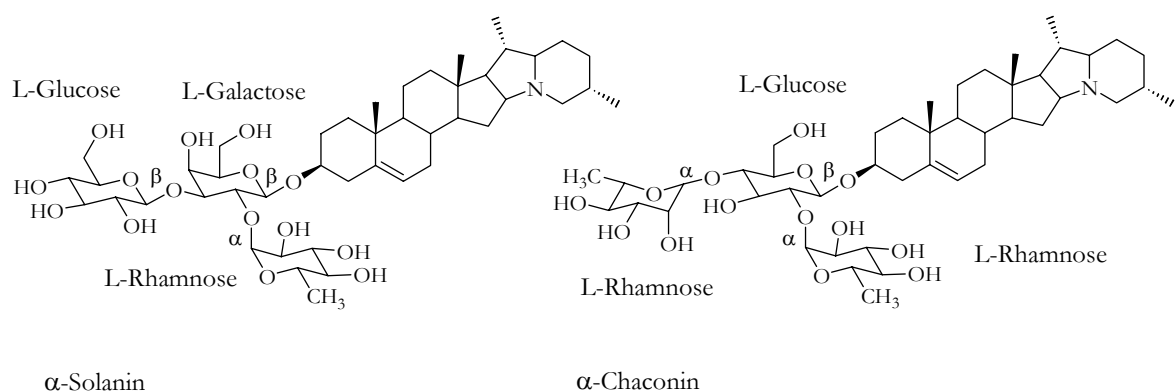
Schließt das N-Atom einen zusätzlichen Heterocyclus, z.B. einen Pyrrolidin-Ring ein, spricht man von Steroid-Heterocyclen. Stammen diese vom 5 α -Cholestan und Cholest-5-en-3 β -ol (Cholesterol, Abbildung 2.3) ab, sind es die Inhaltsstoffe einiger Nachtschattengewächse (Solanaceae).

Abbildung 2.4 Strukturformel des Cholest-5-en-3 β -ol

Zu der Familie der Solanaceae gehören viele landwirtschaftliche Nutzpflanzen wie z.B. Tabak (*Nicotiana tabacum*), Tomaten (*Lycopersicon esculentum*), die Eierpflanze (*Solanum melongena*) und die Kartoffeln (*Solanum tuberosum*) [40]. In der Pflanze liegen diese Alkaloide als Steroid-Alkaloid-Glykoside (Saponine) vor [39].

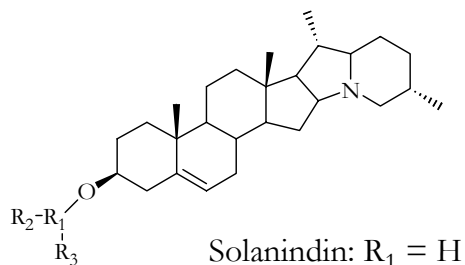
GLYKOALKALOIDE IN DER KARTOFFEL

Die Steroid-Alkaloid-Glykoside werden auch einfacher als Steroid-Glykoalkaloide oder auch Glykoalkaloide bezeichnet. Die Glykosilierung liegt in der Regel an der β -ständigen OH-Funktion in 3-Stellung mit Tri- oder Tetrasacchariden aus D-Gluco-, D-Galacto- und L-Rhamnopyranosen vor [39]. In *Solanum*-Arten wurden bisher mehr als 90 verschiedene Glykoalkaloide identifiziert, 95 % aller Glykoalkaloide in kommerziell erhältlichen Kartoffelsorten (*Solanum tuberosum*) stellen aber α -Solanin und α -Chaconin dar, die meist in einem Verhältnis von ca. 2:3 vorliegen [40, 41]. Sowohl α -Solanin als auch α -Chaconin setzen sich aus dem Steroid-Alkaloid Solanidin, ein Cholest-5-en-3 β -ol, in dem sich die Seitenkette zu einem Indolizidin-Ring schließt, und einem an die Hydroxylgruppe gebundenen, verzweigten Trisaccharid zusammen. Unterscheiden lassen sich α -Solanin und α -Chaconin (Abbildung 2.5) lediglich durch die drei Hexosebausteine des Zuckerrestes [39, 42].

Abbildung 2.5 Strukturformeln von α -Solanin und α -Chaconin

Das Trisaccharid des α -Solanins, die Solatriose, ist eine α -L-Rhamnosylpyranosyl- β -D-glucopyranosyl- β -galactopyranose. Dabei ist Galactose β -glykosidisch an Solanidin gebunden und daran 1 \rightarrow 2 bzw. 1 \rightarrow 3 glykosidisch Rhamnose bzw. Glucose. Die Chacotriose des α -Chaconins ist eine bis- α -L-Rhamnosylpyranosyl- β -D-glucopyranose; Glucose ist dabei β -

glykosidisch an das Solanidin gebunden. Die beiden Rhamnose-Bausteine sind mit der Glucose 1→2 bzw. 1→4 verknüpft [39]. Stufenweise Spaltung der einzelnen Zucker führt zu den möglichen Hydrolysaten der Trisaccharide von α -Solanin und α -Chaconin (Abbildung 2.6).



Solanin		Chaconin	
α -Solanin: (868,0 g/mol)	$R_1 = D$ -Galactose $R_2 = L$ -Rhamnose $R_3 = D$ -Glucose	α -Chaconin: (852,1 g/mol)	$R_1 = D$ -Glucose $R_2 = L$ -Rhamnose $R_3 = L$ -Rhamnose
β 1-Solanin: (705,9 g/mol)	$R_1 = D$ -Galactose $R_2 = L$ -Rhamnose	β 1-Chaconin: (705,9 g/mol)	$R_1 = D$ -Glucose $R_2 = L$ -Rhamnose
β 2-Solanin: (721,2 g/mol)	$R_1 = D$ -Galactose $R_3 = D$ -Glucose	β 2-Chaconin: (705,9 g/mol)	$R_1 = D$ -Glucose $R_3 = L$ -Rhamnose
γ -Solanin: (559,7 g/mol)	$R_1 = D$ -Galactose	γ -Chaconin: (559,7 g/mol)	$R_1 = D$ -Glucose

Abbildung 2.6 Mögliche Hydrolyseprodukte von α -Solanin und α -Chaconin und deren molekulares Gewicht [43-45]

Neben α -Solanin und α -Chaconin liegt von den hydrolysierten Glykoalkaloiden in der Kartoffel-Spezies aber lediglich das Disaccharid β -Chaconin in größeren Mengen vor [40].

2.3.2 Funktion der Glykoalkaloide in der Kartoffel

Glykoalkaloide dienen in den Früchten der Nachtschattengewächse als pflanzliche Giftstoffe, die sie teilweise vor Phytopathogenen wie Pilzen, Bakterien, Viren und vor Phytoparasiten wie Insekten, Schnecken, Käfern, Würmern schützen [46]. Allerdings besitzen sie weder gegen alle Arten der oben genannten Organismen Schutzeigenschaften noch bewirkt der Schädlingsbefall in jedem Fall eine stimulierende Wirkung auf die Biosynthese der Glykoalkaloide [40, 42]. Die wichtige Rolle der Glykoalkaloide in der phytochemischen Abwehr verdeutlicht aber die Tatsache, dass virulente Pathogene effektive Mechanismen entwickelt haben, um die Toxizität der Glykoalkaloide zu umgehen [42].

2.3.3 Verteilung der Glykoalkaloidgehalte in der Kartoffelpflanze

Glykoalkaloide können in allen Teilen der Kartoffelpflanze synthetisiert werden. Die Biosynthese der Glykoalkaloide beginnt während der Keimung und erreicht ihren Höchststand zur Blütezeit. Tabelle 2.4 zeigt die Gesamtglykoalkaloid-Konzentrationen in verschiedenen Teilen der Kartoffelpflanze. Die angegebenen Werte stellen die Schwankungsbreiten der Gesamtglykoalkaloid-Konzentrationen in verschiedenen Pflanzenteilen dar.

Tabelle 2.4 Gesamtglykoalkaloid-Konzentrationen in verschiedenen Pflanzenteilen der Kartoffel [40, 42, 47]

Teil der Pflanze	Gesamtglykoalkaloid-Konzentration [ppm]
Wurzel	180 – 400
Stängel	23 – 71
Blätter	230 – 1.000
Blüten	2.150 – 5.000
Beeren	255 – 1.355
Spross (Keim)	1.950 – 7.300
Schale (Haut)	13 – 1.068
Fleisch (Geschälte Kartoffeln)	12 – 110

Die höchsten Glykoalkaloid-Konzentrationen werden in den Teilen der Kartoffelpflanze gefunden, die die höchste Stoffwechselaktivität zeigen. Dazu zählen neue Blätter, Blüten und Keime. Alle Teile der Kartoffelpflanze synthetisieren und bauen die Glykoalkaloide eigenständig ab. Es gibt also keinen Transport der Glykoalkaloide zwischen verschiedenen Pflanzenteilen [40].

Die Tatsache, dass zwischen 80-95 % der Glykoalkaloide sich im Schalenbereich der Kartoffel befinden, ist dafür verantwortlich, dass früh geerntete kleine Kartoffeln höhere Glykoalkaloid-Konzentrationen erhalten als spät geerntete große Kartoffeln. Erklärbar ist dieser Sachverhalt durch ein größeres „Schale-zu-Fleisch-Verhältnis“ bei kleinen früh geernteten Kartoffeln, das folglich zu einer erhöhten Glykoalkaloid-Konzentration bezogen auf das Gesamtgewicht führt. Der Gehalt an Glykoalkaloiden ist daher umgekehrt proportional zum Knollengewicht [40, 42]. Geschälte Kartoffeln enthalten 50-95 % geringere Glykoalkaloid-Konzentrationen und überschreiten nur in seltenen Fällen die für den Menschen toxische Schwelle (ab 1 mg/kg Körpergewicht) [48]. Eine beispielsweise 70 kg schwere Person müsste demzufolge 70 mg Glykoalkaloide aufnehmen, was einem Verzehr von mehr als ca. 6.000 g rohen geschälten Kartoffeln während einer Mahlzeit gleich kommt. Zum einen werden derartig große Mengen nur selten konsumiert, zum anderen werden durch das Kochen noch im Fleisch geschälter Kartoffeln enthaltene hitzestabile Glykoalkaloide in das Kochwasser abgegeben. Letzteres

sollte deswegen auch nicht für weitere Speisezubereitungen, wie z.B. Soßen, verwendet werden.

2.3.4 Einflussfaktoren auf die Glykoalkaloid-Gehalte

Die Glykoalkaloid-Gehalte in Kartoffeln werden neben dem genetischen Hintergrund sowohl vor als auch nach der Ernte von vielen verschiedenen Faktoren beeinflusst.

VERERBUNG

In der Kartoffel-Spezies existiert sowohl eine breite intraspezifische als auch eine breite interspezifische Variabilität in Hinblick auf den Glykoalkaloidgehalt und den Glykoalkaloidtyp bei den verschiedenen Genotypen. α -Solanin und α -Chaconin waren die einzigen Glykoalkaloide in den kultivierten Spezies wie *Solanum tuberosum* und *Solanum phureja*. Allerdings liegen in den wilden Kartoffel-Spezies weitere Typen von Glykoalkaloiden in sehr unterschiedlichen Konzentrationen vor [48]. Diese Wildarten werden häufig als Kreuzungspartner von kultivierten Kartoffelsorten in der Kartoffelzüchtung eingesetzt. Durch diese Kreuzungen werden Resistenz- und Qualitätseigenschaften der gezüchteten Kartoffelsorte verbessert, aber auch oftmals der Gehalt an Glykoalkaloiden erhöht. Zudem stellen die hohen Konzentrationen an bekannten und unbekanntem Glykoalkaloiden eine zusätzliche Gefahr in der Nachkommenschaft solcher Züchtungen dar. Teilweise konnte erst durch vermehrte Rückkreuzung der Gehalt an Glykoalkaloiden in den neuen Kartoffelstämmen wieder in akzeptable Bereiche gebracht werden [42].

VOR DER ERNTE

Die Glykoalkaloid-Konzentration kann bereits vor der Ernte durch Umwelteinflüsse stark erhöht werden. Dabei stellen Witterungsbedingungen wie Kälte, Nässe, Hitze und Trockenheit Stresssymptome für die Pflanze dar, die die Glykoalkaloid-Biosynthese stimulieren. Die Ernte von unreifen Kartoffeln hat auch einen erhöhten Glykoalkaloid-Gehalt auf Grund des bereits unter 2.3.3 erklärten Schale-zu-Fleisch-Verhältnisses zur Folge. Einen geringen Einfluss auf den Glykoalkaloidgehalt haben die Bodenbeschaffenheit, die Düngung, der Pestizideinsatz und der Schädlingsbefall [40, 42].

NACH DER ERNTE

In kommerziell erhältlichen Kartoffeln ist der Glykoalkaloid-Gehalt üblicherweise sehr gering. Da aber die Biosynthese der Glykoalkaloide noch lange nach der Ernte fortgesetzt wird, können die Glykoalkaloid-Konzentrationen noch ansteigen [40].

A. LICHT

Als ein Stressfaktor für die in der Erde wachsende Kartoffel ist die Bestrahlung mit Licht zu nennen. Dabei ist der Anstieg der Glykoalkaloid-Konzentration sowohl von der Art des Lichts (Wellenlänge) als auch von der Dauer der Bestrahlung abhängig; UV- und Infrarotlicht begünstigen die Glykoalkaloid-Produktion [42, 48, 49]. Als ein Indikator für Lichtstress ist die Produktion von Chlorophyll anzuführen; grüne Kartoffeln gelten als qualitativ minderwertig und enthalten häufig überhöhte Glykoalkaloid-Konzentrationen. Dennoch ist die Biosynthese des Chlorophylls nicht mit der der Glykoalkaloide verknüpft [42, 50]. Die Glykoalkaloid-Akkumulation und das Ergrünen kann durch γ -Strahlung, Chemikalien, die das Keimwachstum inhibieren (z.B. Ethylen) und durch eine Ölschicht auf den Kartoffeln, die die Photoinduktion verhütet, reduziert werden [48, 51].

Kartoffelsorten mit höheren Anfangskonzentrationen entwickeln unter Lichteinfluss eher und schneller exzessive Mengen an Glykoalkaloiden als Kartoffeln mit geringen Anfangsgehalten. Erneut beeinflusst die unter 2.3.3 angesprochene umgekehrte Proportionalität des Gehalts an Glykoalkaloiden zum Knollengewicht den Anstieg der Konzentration unter Lichteinwirkung; der Anstieg der Glykoalkaloid-Konzentration ist in unreifen kleinen Kartoffeln größer als in großen reifen Knollen [40, 48].

B. TEMPERATUR

Hohe Temperaturen ($> 15\text{ °C}$) stellen ein wichtigen umweltabhängigen Stressfaktor dar, der die Bildung von Glykoalkaloiden in den Kartoffelknollen nach der Ernte induziert [40, 52]. Geringere Temperaturen bei der Lagerung von Kartoffeln hingegen produzieren auch geringere Glykoalkaloid-Konzentrationen. Die Grünung ist ebenfalls vermindert. Allerdings stellt eine zu geringe Temperatur ($< 5\text{ °C}$) ebenso einen Stressfaktor dar wie eine zu hohe Lagerungstemperatur und hat damit einen Anstieg der Glykoalkaloid-Gehalte zur Folge. Als optimal werden 7-10 °C angenommen [40].

C. FEUCHTIGKEIT

Trockene Luft während der Lagerung führt zu einer Dehydrierung der Kartoffeln. Dieser Gewichtsverlust seinerseits bewirkt einen Anstieg der Glykoalkaloide in der Frischmasse. Zusätzlich stellt die Dehydrierung einen Stressfaktor dar, der die Glykoalkaloid-Biosynthese stimuliert. Die optimalen Lagerungsbedingungen schwanken in der Literatur zwischen 55-95 % Luftfeuchtigkeit [2, 40, 42].

D. LAGERUNGSZEIT

Unverletzte und nicht ergrünte Kartoffeln können bei der optimalen Temperatur und Luftfeuchtigkeit 6 Monate im Dunkeln gelagert werden [52].

E. KEIMUNG

Nach einer Ruhephase stellt sich der Stoffwechsel der Kartoffel um und die Keimbildung beginnt. Dabei ist die Glykoalkaloid-Produktion, abgesehen von licht- und verletzungsbedingten Stimulationen, auf die Keime der Kartoffel fokussiert. Die Keime besitzen die höchsten Glykoalkaloid-Gehalte in der gesamten Kartoffelpflanze [40, 42].

F. MECHANISCHE VERLETZUNG

Neben Fraßschädlingen und Phytopathogenen führen mechanische Verletzungen der Kartoffelknolle nach der Ernte zu erhöhten Gehalten an Glykoalkaloiden, die eine Schutzfunktion der Pflanze darstellen. Das Ausmaß der Glykoalkaloid-Akkumulation ist sowohl von der Kartoffelsorte als auch von der Art und Größe der Verletzung abhängig; Schnittverletzungen führen zu dem größten Anstieg der Glykoalkaloid-Konzentration. Die Biosynthese der Glykoalkaloide wird dabei in der ganzen Knolle stimuliert und nicht nur an dem verletzten Teil der Kartoffel. Der Anstieg der Glykoalkaloid-Konzentration korreliert mit der sortenspezifischen Reaktion auf Licht- und Temperaturstress [40, 42, 48]. Missbildungen im Inneren der Kartoffel führen ebenfalls zur Glykoalkaloid-Akkumulation und damit zu einer Erhöhung der Glykoalkaloid-Gehalte in geschälten Kartoffeln.

2.3.5 Biosynthese

BIOSYNTHESE VON SOLANIDIN

Die Biosynthese des Solanidins ist bis zum Cholesterin gut bekannt. Cholesterin selbst akkumuliert nicht in der Pflanze und hat keine bekannte Funktion in der Pflanze [40, 42, 51]. Durch zweimalige Abspaltung von CoenzymA aus Acetyl-CoenzymA und Acetoacetyl-CoenzymA entsteht 3-Hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoenzymA, welches anschließend mit der 3-Hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoenzymA-Reduktase (HMGR) irreversibel zu Mevalonsäure reduziert wird (Abbildung 2.7). Die Aktivität der HMGR steigt in der Kartoffel z.B. durch Pathogenbefall und Verletzung an, so dass dabei schon früh eine Regulation der Biosynthese erfolgt [42]. Mevalonsäure ist der Vorgänger der Isopren-Einheit (C_5) des Isopentenyl-Pyrophosphat. Zwei dieser C_5 -Einheiten kombinieren sich und bilden das Monoterpen (C_{10}) Geranyl-Pyrophosphat, welches sich dann mit einer weiteren C_5 -Einheit zum Farnesyl-Pyrophosphat, einem Sesquiterpen (C_{15}), umsetzt. Kondensation von zwei C_{15} -Einheiten produziert anschließend das acyclische Triterpen (C_{30}), das Squalen. Diese Reaktion wird durch die Squalensynthase (SS) biosynthetisiert. Ausgehend vom Squalen läuft die weitere Synthese über Ringschluß und die Zwischenprodukte Cycloartenol und Lanosterin zum Cholesterin ab [42, 51, 53].

Die Biosynthese vom Cholesterin zum Solanidin ist noch nicht vollständig geklärt. Heftmann [53] gibt Dormantinol, Verazin und Etiolin als mögliche Zwischenstufen an. Als Stickstoffquelle des tertiären Stickstoffs im Steroidgerüst wird L-Arginin propagiert [42].

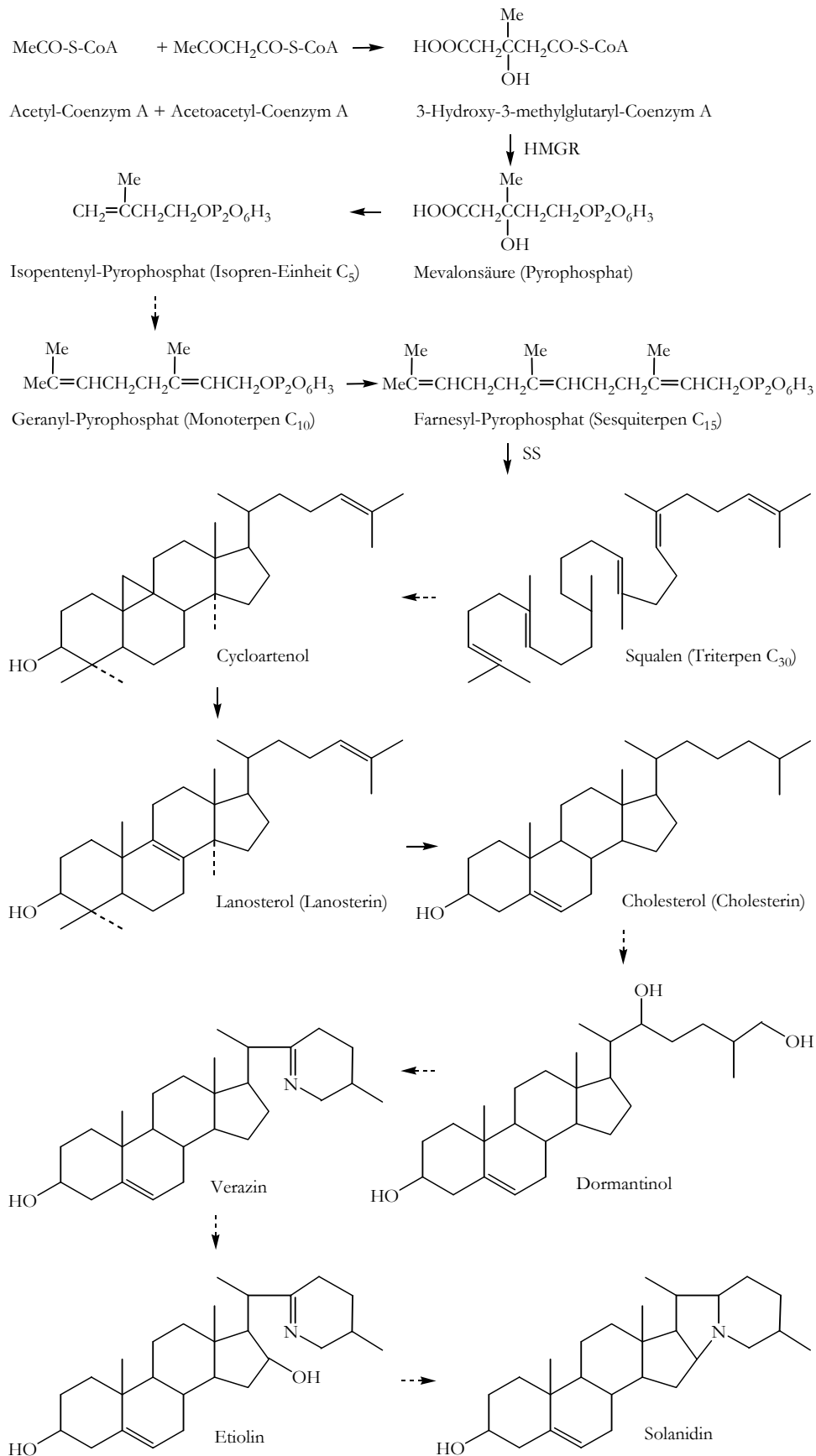


Abbildung 2.7 Schematische Darstellung der möglichen Biosyntheseschritte zum Solanidin [40, 42, 51, 53, 54]

GLYKOSYLIERUNG DES SOLANIDINS

Die Glykosylierung des Solanidins führt in der Kartoffelpflanze zur Bildung der Trisacchariden des Solanidins, α -Solanin und α -Chaconin (Abbildung 2.8).

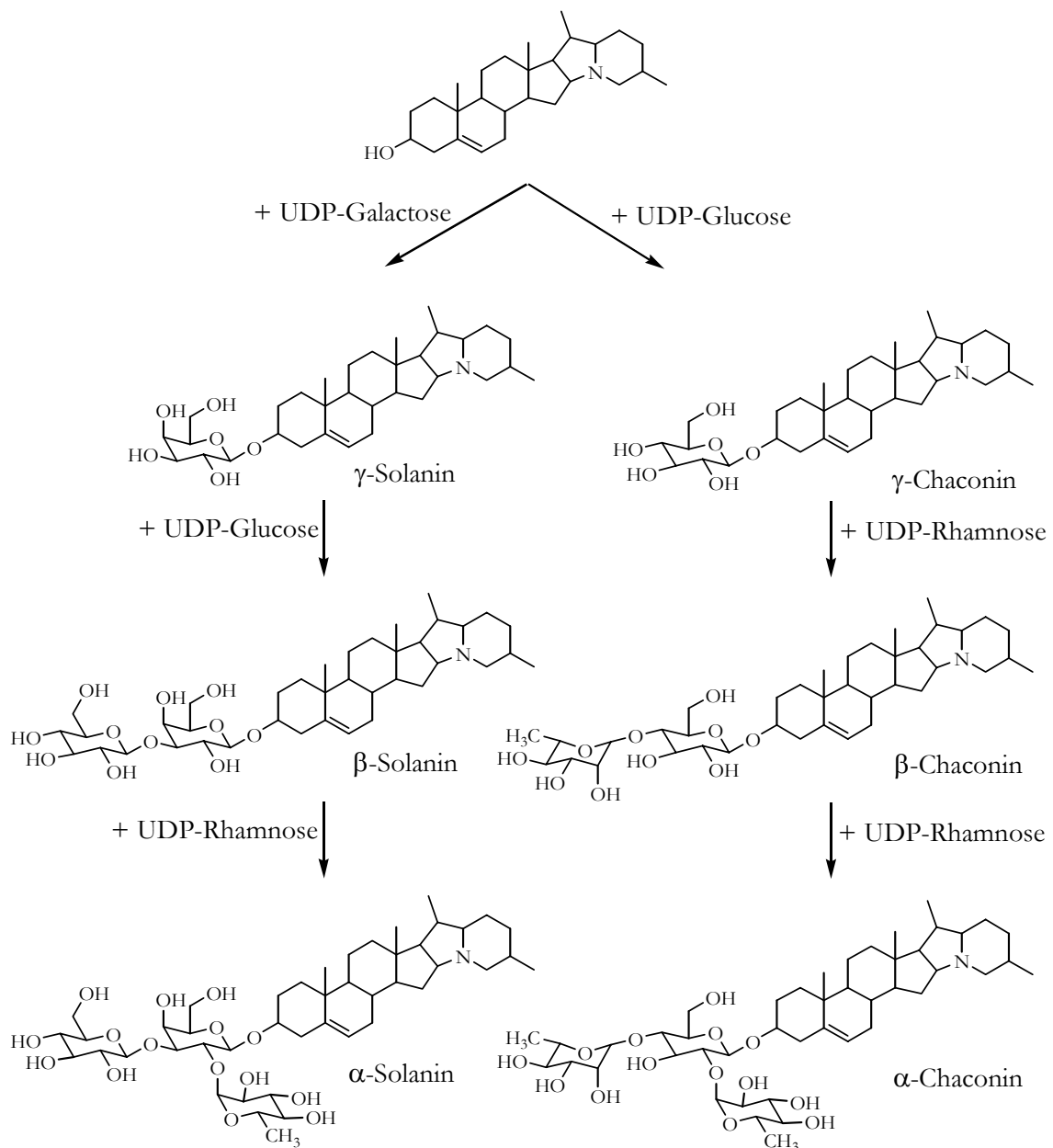


Abbildung 2.8 Schematische Darstellung der möglichen Biosyntheseschritte zum α -Solanin und α -Chaconin [42, 55, 56]

Das Enzym Solanidin-Glukosyltransferase katalysiert die Biosynthese von γ -Chaconin aus Solanidin und UDP-Glucose. Die Solanidin-Glukosyltransferase wird durch mechanische Verletzung induziert und sorgt so für den Fortgang der Biosynthese zu den toxischen Substanzen α -Solanin und α -Chaconin. Die Biosynthese des γ -Solanins erfordert die Galactosyltransferase als Enzym, welches allerdings sehr instabil ist und nur in geringen Konzentrationen nachgewiesen werden konnte [51, 55, 56].

Sowohl die monosaccharidischen (γ -Solanin und γ -Chaconin) als auch die disaccharidischen (β -Solanin und β -Chaconin) Glykoside werden nicht oder nur in Spuren nachgewiesen. Die genaue Abfolge der Glykosylierungsschritte und der beteiligten Enzyme konnte bisher nur teilweise aufgeklärt werden. Man nimmt an, dass Solanidin schrittweise in schneller Abfolge mit den aktivierten Zuckern UDP-Glucose, UDP-Galactose und UDP-Rhamnose verknüpft wird [42, 55, 56].

2.3.6 Toxikologie und Pharmakologie

„Potato Glycoalkaloids: A burden or a Blessing?“ (Kartoffel-Glykoalkaloide: Last oder Segen?), diese kurze Überschrift eines Artikel von Valkonen et al. [48] verdeutlicht den Gegensatz von den Bestrebungen der Abreicherung der Glykoalkaloidgehalte in essbaren Kartoffelprodukten einerseits und der Entwicklung von Kartoffel-Genotypen mit hoher Glykoalkaloid-Produktion für die pharmazeutische Industrie andererseits.

SICHERHEITSRICHTLINIEN

Als bitterschmeckend werden Kartoffelprodukte mit Glykoalkaloid-Konzentrationen ab 140-250 ppm empfunden. Es herrscht daher die weit verbreitete Annahme, dass Glykoalkaloid-Konzentrationen unter 200 ppm bei frischen Kartoffeln und 1.000 ppm bei trockenen Kartoffeln für den Menschen als sicher gelten und keine toxischen Auswirkungen zeigen. Diese Daten sind aber vor langer Zeit (ca. 80 Jahre) lediglich empirisch und nicht experimentell ermittelt worden. Ferner beziehen sie sich auf die akuten Effekte, lassen aber chronische Effekte völlig außer acht [47, 48, 57].

In jüngster Zeit haben viele Länder wie die USA, Großbritannien und Deutschland, neue Sicherheitsrichtlinien entworfen, nach denen die Glykoalkaloid-Konzentrationen in Kartoffeln 60-70 ppm nicht überschreiten sollten. Diese Grenze gewährleistet einen Sicherheitsspielraum für ungewöhnliche Umwelteinflüsse, die nicht unter der Kontrolle der Landwirte stehen [48]. Es handelt sich dabei aber nicht um verbindliche Grenzwerte sondern nur um Richtwerte, die keine Gewähr dafür sind, dass Kartoffeln und Kartoffelprodukte keinen erhöhten Glykoalkaloid-Gehalt aufweisen [42].

TOXIZITÄT FÜR DEN MENSCHEN

α -Solanin und α -Chaconin weisen für den Menschen eine hohe Toxizität auf. Die verfügbaren Informationen über die Suszeptibilität für eine Glykoalkaloid-Vergiftung beim Menschen sind aber sehr variabel. So führt eine orale Dosis von 1-5 mg/kg Körpergewicht zu geringfügigen bis schweren Toxizitätserscheinungen, 3-6 mg/kg Körpergewicht hingegen können schon letal wirken. Die Spanne zwischen Toxizität und Letalität scheint offensichtlich sehr eng und individuell unterschiedlich zu sein [47]. Die Krankheitssymptome für eine Glykoalkaloid-Vergiftung können sowohl gastroenteritischer als auch neurologischer Natur sein. Die Symptome reichen dabei von Übelkeit, Erbrechen, Durchfall, Magen- und Darmschmerzen

bis zu Kopfschmerzen, Fieber, Halluzinationen und Bewusstlosigkeit [42]. Bei pharmakokinetischen Studien mit freiwilligen Probanden wurde festgestellt, dass die oben beschriebenen Symptome 30 Minuten nach der Mahlzeit begannen und 3-4 Stunden andauerten. α -Solanin bzw. α -Chaconin zeigten dabei eine Halbwertszeit von 11 bzw. 19 Stunden im Blutkreislauf [58]. Im Allgemeinen lässt sich sagen: α -Chaconin ist toxischer als α -Solanin und die α -Form ist toxischer als die β -Form, welche ihrerseits wieder toxischer ist als die γ -Form [47, 48, 57]. Inwiefern die Glykoalkaloide in der Kartoffel als teratogen, embryotoxisch und genotoxisch einzustufen sind, ist noch nicht eindeutig geklärt [57, 59, 60].

ZERSTÖRUNG DER ZELLMEMBRAN

Glykoalkaloide weisen eine hohe Fähigkeit auf, die mitochondrische Zellmembran zu schädigen, welches eine Veränderung der Ionenkonzentrationen im Innen- und Außenbereich der Zelle und damit eine Veränderung des Membranpotentials zur Folge hat [40, 42, 57]. Die zellzerstörenden Eigenschaften machen sich durch Brennen im Mund, durch Symptome im Gastrointestinaltrakt und auch durch Zerstörung von Gewebe und Organen bemerkbar. Diese Symptome verhalten sich ähnlich wie lytische Oberflächeneffekte und liegen ursächlich in der Störung der Membranstabilität bzw. -eigenschaft [40, 42, 47, 48]. Die Membranschädigung ist abhängig von der Zusammensetzung des Trisaccharids; α -Solanin zeigt im Gegensatz zu α -Chaconin allein keine Wirkung, zusammen können sie jedoch synergistisch wirken. β -Chaconin zeigt ebenso keinen membranschädigenden Effekt [40, 42, 47, 48].

ANTICHOLINESTERASE-AKTIVITÄT

Einige der Symptome, die bei einer Glykoalkaloid-Vergiftung auftreten, wie schneller oder schwacher Puls, schnelles oder flaches Atmen, Delirium oder Koma, werden mit dem zentralen Nervensystem, insbesondere mit der Inhibierung der Acetylcholinesterase, in Verbindung gebracht [40]. Die Inhibierung wirkt sich so aus, dass der Neurotransmitter Acetylcholin nicht mehr durch die inhibierte Acetylcholinesterase abgebaut werden kann und somit die Nervenimpulsleitung über die Synapsen gestört wird [47]. Diese Störung der Gehalte an Acetylcholinesterase kann sich sogar über mehrere Wochen erstrecken, da angenommen wird, dass die Glykoalkaloide im Körper gespeichert werden und dann erst nach und nach abgegeben werden [61]. Es hat sich bei in-vitro-Inhibierung gezeigt, dass α -Chaconin, β -Chaconin und α -Solanin ungefähr gleiche Effekte auslösen und sich nicht synergistisch verhalten [40, 42, 62].

PHARMAKOLOGISCHE ANWENDUNGEN

Steroid-Glykoalkaloide werden als Startmaterial für die Synthese von Steroid-Medikamenten und Steroid-Hormonen verwendet [48, 54]. So dienen z.B. Solasodin, das von der Pflanze *Solanum laciniatum* gebildet wird, und Tomatidin, welches vermehrt in Wildtomaten (*Solanum lycopersicum*) vorkommt, zur industriellen Produktion von Cortison und Progesteron [63]. Darüber hinaus haben Glykoalkaloide in Gewebekulturen eine Inhibierung vom *Herpes simplex*

Virus Typ 1 [40] und einen Schutz vor einer letalen Infektion mit *Salmonella typhimurium* bei Mäusen [64] gezeigt.

Nach Experimenten zur biologischen Aktivität postulieren die Autoren von [65] eine inhibierende Wirkung von einigen Glykoalkaloiden und deren Hydrolyseprodukten auf Zellkulturen (menschliche Dickdarm- und Leberkrebszellen). Für eine mögliche Nutzung der Glykoalkaloide für Krebsprävention und –behandlung muss aber im Vorfeld noch eine entscheidende Frage untersucht werden: Welches ist eine effektive therapeutische und welches eine toxische Dosis?

Ist diese Frage hinreichend wissenschaftlich geklärt, könnte sich die „Last“ von hohen Glykoalkaloid-Konzentrationen in essbaren Kartoffelprodukten zu einem „Segen“ durch Entwicklung von Kartoffel-Genotypen mit hoher Glykoalkaloid-Produktion für die pharmazeutische Industrie entwickeln [48].

2.3.7 Abtrennung und Analytik

Während der letzten dreißig Jahre wurde eine Vielzahl von Veröffentlichungen herausgebracht, die sich mit Extraktionsmethoden zur Abtrennung der Glykoalkaloide aus Kartoffeln und Kartoffelprodukten und mit Methoden zur qualitativen und vor allem zur quantitativen Analytik beschäftigen.

ABTRENNUNG

Es soll hier eine Übersicht über die in der Literatur beschriebenen Extraktionsmethoden für Glykoalkaloide gegeben werden.

Die zahlreichen Extraktionstechniken für Glykoalkaloide und die dabei erhaltenen Wiederfindungsraten in der Literatur variieren stark und sorgen teilweise für Verwirrung und Widersprüche [66]. Da nahezu alle Glykoalkaloide schlecht wasserlöslich bei pH 7 oder höher sind, werden die Extraktionen ausschließlich in nicht-wässrigen und/oder sauren Lösungsmitteln durchgeführt. Üblicherweise wird bei Raumtemperatur gearbeitet. Eine Kombination von saurem Extraktionsmittel und Hitze wird weitestgehend vermieden, um eine Hydrolyse der Glykoalkaloide zu verhindern [40]. Tabelle 2.5 zeigt eine Übersicht der in der Literatur gängigen Extraktionsverfahren.

Tabelle 2.5 Übersicht über die in der Literatur verwendeten Extraktionsverfahren für Glykoalkaloide inklusive Extraktionsmittel, verwendeten SPE-Kartuschen (Solid Phase Extraction) und sonstigen Parametern

Quelle	Extraktionsmittel	SPE-Kartuschen	sonstige Parameter
Gerstner [42]	Methanol/Ethylacetat/Essigsäure (67:33:1, v/v/v)	Chromafix C18	Zusatz von n-Heptansulfonsäure
Roosen-Runge [67]	Pyridin	---	Soxleth-Extraktion (12h); Fällung mit Ammoniak
Schwardt [63]	Methanol; 5 % Essigsäure	---	Soxleth-Extraktion (8 h); 85 °C
Sotelo et al. [68] Friedman et al. [69] Dao et al. [70]	5 % Essigsäure	---	Fällung mit Ammoniak, Extraktion mit Wasser/Butanol, Trocknen
Väänänen et al. [71]	5 % Essigsäure	fünf verschiedene Kartuschen: C18, SCX, Certify, Oasis, CN (beste Wiederfindung: SCX und Oasis)	Ultraschall (10 min)
Hellenäs et al. [72]	1 l Wasser + 50 ml Eisessig + 5 g Natriumhydrogensulfat	C 18	Homogenisation (2 min)
Achterberg et al. [73]	3 % Essigsäure	---	Fällung mit Ammoniak
Edwards et al. [66]	0,02 M Heptansulfonsäure in 1 % Essigsäure	C 18	Homogenisation (30 s)
Saito et al. [74]	Methanol (Zugabe von Wasser für SPE)	C 18 für geringen, NH ₂ für hohen Fettgehalt in den Proben	Homogenisation (2 min)
Jonker et al. [75]	Methanol/Essigsäure/Wasser (94:1:6, v/v/v)	CN, Phenyl, C8	Homogenisation (2 min)
Kobayashi et al. [76]	Methanol (Trocknen), Methanol/Wasser/ Essigsäure (70:30:0,15, v/v/v)	C18	Homogenisation, Aufreinigung mit Silica-Gel, danach SPE
Fitzpatrick et al. [77, 78]	Methanol/Chloroform (2:1)	---	Mixer, Zugabe von 0,8 % Na ₂ SO ₄ , Fällung mit Ammoniak
Bushway et al. [79]	Tetrahydrofuran/ Wasser/Acetonitril (50:30:20)	---	Mixer, Fällung mit Ammoniak
Bushway et al. [80]	Tetrahydrofuran/ Acetonitril/Wasser/ Essigsäure (49:20:30:1)	---	
Houben et al. [81]	0,02 M Natrium-1-sulphonat in 0,17 M Essigsäure	C18	Ionenpaar-Extraktion
Backleh et al. [82]	n.a.	---	Adsorptive Bubble Separation; pH 6

Ungefähr die Hälfte der in Tabelle 2.5 aufgelisteten Verfahren bedienen sich einer SPE-Aufreinigung der Rohextrakte; die überwiegende Menge verwendet dabei C18-Kartuschen-Materialien, die auf der Methodik der „reversed-phase“-Chromatographie (Umkehrphasen-Chromatographie) basieren. Nur wenige Autoren verwenden CN-, Phenyl-Kationenaustauscher- (SCX: strong cation exchanger) oder Polymer-Materialien wie Oasis.

ANALYTIK

Zur Analytik der Glykoalkaloide wurden in der Literatur viele verschiedene Techniken verwendet, dazu zählen: Gaschromatographie [67, 83], Dünnschichtchromatographie [84, 85], colorimetrische Titration [70, 77], ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) [86, 87], Immunoassay [88-94], Biosensorik [95], Time-resolved Liposome Assay [96], Fluoreszenz-Polarisation [97], MALDI-TOF MS (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time-Of-Flight Mass spectrometry) [98-100], Kapillarelektrophorese [101-105], und allen voran HPLC (High-Performance Liquid Chromatography) [42, 54, 58, 66, 68-70, 72, 74-76, 81, 106-108].

Dieses weite Spektrum an Analysemethoden zeigt die Bedeutung der Analytik von Glykoalkaloiden auf und legt auf der anderen Seite die Vermutung nahe, dass ständig der Bedarf wächst, neue und bessere Methoden und Techniken zu entwickeln. Ursächlich dafür ist sicherlich die schlechte UV-Aktivität der Glykoalkaloide, die Techniken wie z.B. HPLC-Messungen mit UV-Detektor in ihrer Nachweisgrenze limitieren. Erst in jüngster Zeit wurden Methoden wie Electrospray Ionisation/Mass Spectrometry (ESI-MS) für die HPLC-Detektion von Glykoalkaloiden in Kartoffeln angewendet [107, 108], die die Nachweisgrenze um mehr als das 100-fache senken konnten. Tabelle 2.6 zeigt eine Übersicht über die in der Literatur verwendeten HPLC-Methoden und Nachweisgrenzen für die Glykoalkaloid-Analytik.

Es lässt sich erkennen, dass zahlreiche Autoren eine RP-HPLC mit silicabasierten C8- oder C18-Säulen für die Analytik der Glykoalkaloide durchführen. Eine geringere Gruppe von Autoren verwendet NH₂-Säulen und arbeitet damit bei der Glykoalkaloid-Analytik unter Normalphasen-Bedingungen. Der Vorteil von NH₂- gegenüber C18-Säulen liegt in der stark verbesserten Auflösung von α -Chaconin und α -Solanin. Als mobile Phase werden fast ausschließlich Acetonitril-Wasser-Gemische verwendet, weil Acetonitril eine geringe Eigenabsorption in dem detektierten Wellenlängenbereich (200-208 nm) aufweist. Der wässrige Anteil wird dabei entweder mit Puffersalzen auf ca. pH 3 eingestellt, so dass die tertiäre Aminogruppe der Glykoalkaloide protoniert vorliegt, oder man arbeitet bei neutralem pH-Wert und verhindert dabei die Protonierung [42]. Diese salzhaltigen Eluenten wirken sich allerdings häufig nachteilig, insbesondere durch die erhöhte Stör- bzw. Wartungsanfälligkeit des HPLC-Geräts, aus.

Tabelle 2.6 Übersicht über die in der Literatur verwendeten HPLC-Methoden für Glykoalkaloide inklusive Säulenmaterial, Wellenlänge und die erreichte Nachweisgrenze

Quelle	Säulenmaterial	Wellenlänge [λ]	Nachweisgrenze	
			α-Solanin [μg/ml] (ppm)	α-Chaconin [μg/ml] (ppm)
Gerstner [42]	LiChrospher C8	202	2,0	2,0
Vronen [54]	Spherisorb C8	200	n.a.	n.a.
Hellenäs et al. [58]	Hypersil CPS 5	200	n.a.	n.a.
Dao et al. [70]	Resolve Spherical C18	200	n.a.	n.a.
Edwards et al. [66]	acht verschiedene C8- und C18- Säulen	202	n.a.	n.a.
Friedman et al. [69]	vier verschiedene NH ₂ -Säulen	208	7,5	8,0
Hellenäs [72]	Hypersil ODS C18	202	5,0	5,0
Houben et al. [81]	Nucleosil C18	202	n.a.	n.a.
Jonker et al. [75]	Spheri-C8 und - C18	205	n.a.	n.a.
Kobayashi et al. [76]	μ-Bondapak NH ₂	205	(20)	(10)
Saito et al. [74]	Nucelosil-NH ₂	208	1,0	1,0
Sotelo et al. [68]	μ-Bondapak C18	200	2,4	3,0
Verpoorte et al. [106]	verschiedene C18- und NH ₂ -Säulen	200	n.a.	n.a.
Matsuda et al. [107]	Cadenza CD-C18	(ESI-MS)	(0,038)	(0,014)

3 Praktischer Teil – Protein-/Peptidanalytik –

Zu Beginn dieser Arbeit stellte sich zunächst die Aufgabe, geeignete Analysemethoden für die Peptide und Proteine im Kartoffelfruchtwasser zu entwickeln. Dazu sollten vor allem Methoden mittels instrumenteller Analytik wie HPLC, MALDI-MS und CE entwickelt werden. Im weiteren Fortgang wurde größtenteils nicht mehr das native Kartoffelfruchtwasser für die Analytik, sondern vielmehr bereits mittels Ionenaustauschchromatographie gesammelte Fraktionen aus dem KFW verwendet. Diese Fraktionierung wurde mit Kationen- und Anionenmembranadsorbentien (S- und Q-Module, Sartorius AG, Göttingen) vorgenommen. Die gesammelten Protein-Fraktionen wurden mittels Ultrafiltration aufkonzentriert. Die für die weitere Entwicklung der Analysemethoden verwendeten Fraktionen werden als S- und Q-Fraktionen bezeichnet. Für weitere Informationen zur Methodik und Durchführung dieser Ionenaustauschchromatographie sowie das Aufkonzentrieren der Fraktionen sei auf die Dissertation F. Menzel [109] und die laufende Dissertation R. Steinhof [110] verwiesen. Weitere Ziele, die sich im Verlaufe der Arbeit ergaben, waren Aktivitätsbestimmungen in den gewonnenen Protein-Fraktionen sowie die Hydrolyse des Kartoffelfruchtwassers. Die folgenden Kapitel beschreiben die genannten Punkte, beginnend mit der Entwicklung einer RP-HPLC-Methode für die Analyse von Proteinen in Kartoffelfruchtwasser.

3.1 Entwicklung einer RP-HPLC-Methode für die Analyse von Proteinen in Kartoffelfruchtwasser

Bei der Entwicklung einer RP-HPLC-Methode für eine sehr komplexe Matrix wie das Kartoffelfruchtwasser sollten möglichst viele scharf getrennte Peaks im HPLC-Chromatogramm, kurze Analysenzeiten und eine hohe Reproduzierbarkeit erreicht werden. Um diese Anforderungen zu erreichen wurden ein geeigneter Lösungsmittelgradient entwickelt und mit einer Auswahl von vier verschiedenen HPLC-Säulen getestet.

3.1.1 Entwicklung eines Lösungsmittelgradienten

Für die Entwicklung eines Lösungsmittelgradienten wurde zunächst mit einer klassischen RP-HPLC-Säule (Nucleosil C18) begonnen. Es wurden verschiedene Lösungsmittelgradienten entwickelt und getestet. Abbildung 3.1 zeigt die dabei erhaltenen RP-HPLC-Chromatogramme. Der prozentuale Anteil des Elutionsmittels B (ACN) ist auf der rechten Achse aufgetragen.

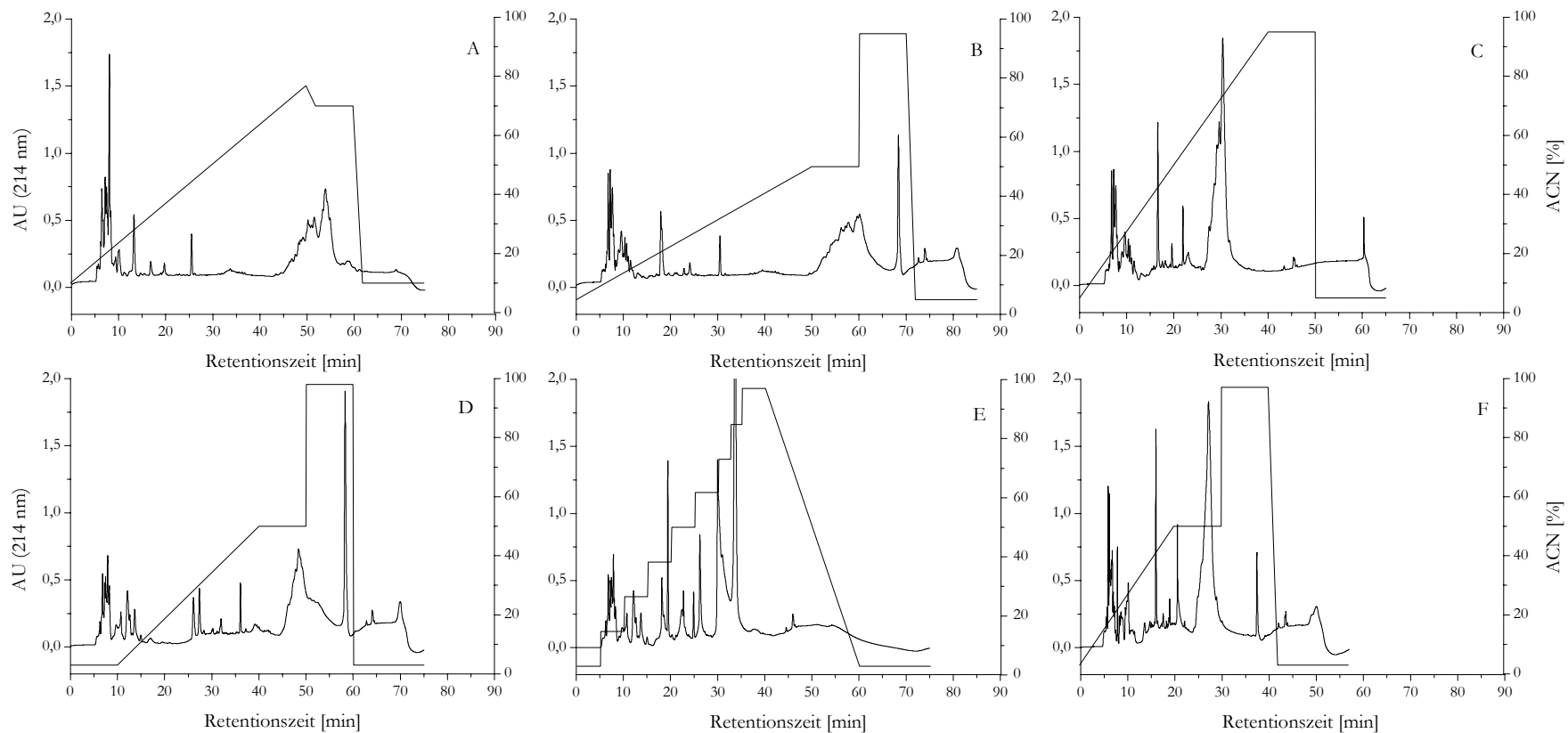


Abbildung 3.1 RP-HPLC-Chromatogramme; Methodenentwicklung für Kartoffelbruchwasser; Säule: Nucleosil C18, 5 μm , 100 \AA , 250 x 4,6 mm; Temperatur: 30 $^{\circ}\text{C}$; Injektionsvolumen: 10 μl ; Eluenten: A: 0,1 % TFA in Wasser, B: 0,1 % TFA in ACN

Der erste verwendete Gradient (A) wurde von C. Kamnerdpetch [111] für die Analytik von Hydrolyseprodukten aus Kartoffelkleber entwickelt und in Rahmen dieser Arbeit für Kartoffelfruchtwasser getestet. Das Chromatogramm weist allerdings nur wenige scharfe Peaks auf. Die Intensität der erhaltenen Peaks ist außerdem nicht sehr hoch, daher wurde dieser Gradient weiterentwickelt. Ausgehend von Gradient A wurde ein flacherer (B) und ein steilerer Gradient (C) verwendet. B stellte sich als nicht ideal dar, weil er ähnlich wie A wenige Peaks mit niedriger Intensität erzeugte. C hingegen lieferte bereits intensivere Peaks mit bereits guter Auflösung untereinander. Zur weiteren Optimierung wurden drei weitere Gradienten auf ihre Eignung zur Trennung des Kartoffelfruchtwassers getestet. Gradient D lieferte dabei bereits mehr Peaks, allerdings noch bei geringer Intensität. Der Gradient E ist wegen seines starken Eigenprofils bei der stufenweisen Erhöhung des Lösungsmittelanteils für eine weitere Verwendung ungeeignet. Schlussendlich wurde Gradient F, eine Kombination aus C und D unter verkürzter Analysenzeit als der unter diesen Bedingungen beste Gradient ausgearbeitet. Er erfüllt die Bedingungen der kurzen Analysenzeit und die Trennung möglichst vieler scharfer Peaks. Ebenso weist er eine hohe Reproduzierbarkeit auf. Die Standardabweichung der Retentionszeit bei drei exemplarisch ausgewählten Peaks liegt zwischen 0,05 und 0,20 min bzw. zwischen 0,2 und 1,03 % ($n = 13$). Wenn nicht anders angegeben, wurde für alle weiteren HPLC-Analysen von Proben aus dem KFW Gradient F verwendet.

3.1.2 Säulen-Auswahl

Ein klassisches HPLC-Säulen-Material wie Nucleosil C18 ist für den Beginn einer Methodenentwicklung generell sehr gut geeignet, für eine weitere „feinere“ Entwicklung der Analytik sollten jedoch auch Materialien mit anderen Funktionalitäten getestet werden. Tabelle 3.1 gibt eine Übersicht der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten HPLC-Säulen.

Tabelle 3.1 Parameter und Charakteristika der verwendeten HPLC-Säulen

Material	Typ	Dimension [mm]	Porengröße [Å]	Partikelgröße [µm]
Nucleosil (Macherey-Nagel)	C18	250 x 4,6	100	5
Jupiter Proteo (Phenomenex)	C12	250 x 4,6	90	4
Discovery Bio Wide Pore (Supelco)	C8	250 x 2,1	100	5
Nucleosil (Macherey-Nagel)	C4	250 x 4,6	120	5

Unter Verwendung des entwickelten Gradienten F wurden die in Tabelle 3.1 aufgelisteten HPLC-Säulen auf ihre Eignung getestet. Die dabei erzielten Chromatogramme enthält Abbildung 3.2.

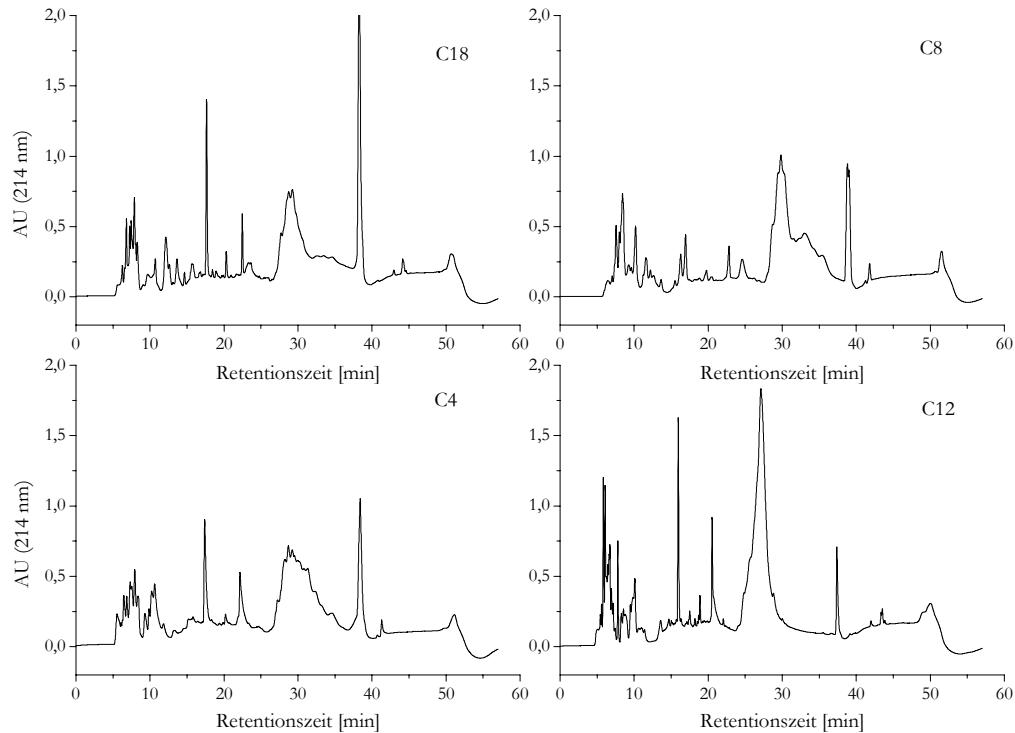


Abbildung 3.2 RP-HPLC-Chromatogramme; 4 verschiedene HPLC-Säulen; Probe: Kartoffelfruchtwasser; Methode: F aus Abbildung 3.1; Temperatur: 30 °C; Injektionsvolumen: 10 µl

Aus Abbildung 3.2 lässt sich erkennen, dass weder die normalerweise für Proteine besser geeigneten C8- noch die C4-Phasen eine Optimierung des Assays erzielten. Anders hingegen verhält es sich mit der Jupiter Proteo-Säule (C12): Das Chromatogramm enthält schärfere und wesentlich intensivere Peaks. Für alle weiteren HPLC-Messungen wurde daher, wenn nicht anderes angegeben, die Jupiter Proteo-Säule verwendet.

3.1.3 MALDI-MS der HPLC-Fraktionen

Für die Detektion der Peaks im HPLC-Chromatogramm stand kein Online-Massen-Detektor zur Verfügung, so dass für eine massenspektrometrische Analyse (hier MALDI-MS) der verschiedenen Peaks diese zunächst manuell am Ausgang des UV-Detektors gesammelt wurden. Abbildung 3.3 zeigt die Fraktionen aus dem Chromatogramm von Kartoffelfruchtwasser, die für die MALDI-MS-Analyse gesammelt worden sind. Die Zahlenbeschriftung gibt die jeweilige Retentionszeit wieder.

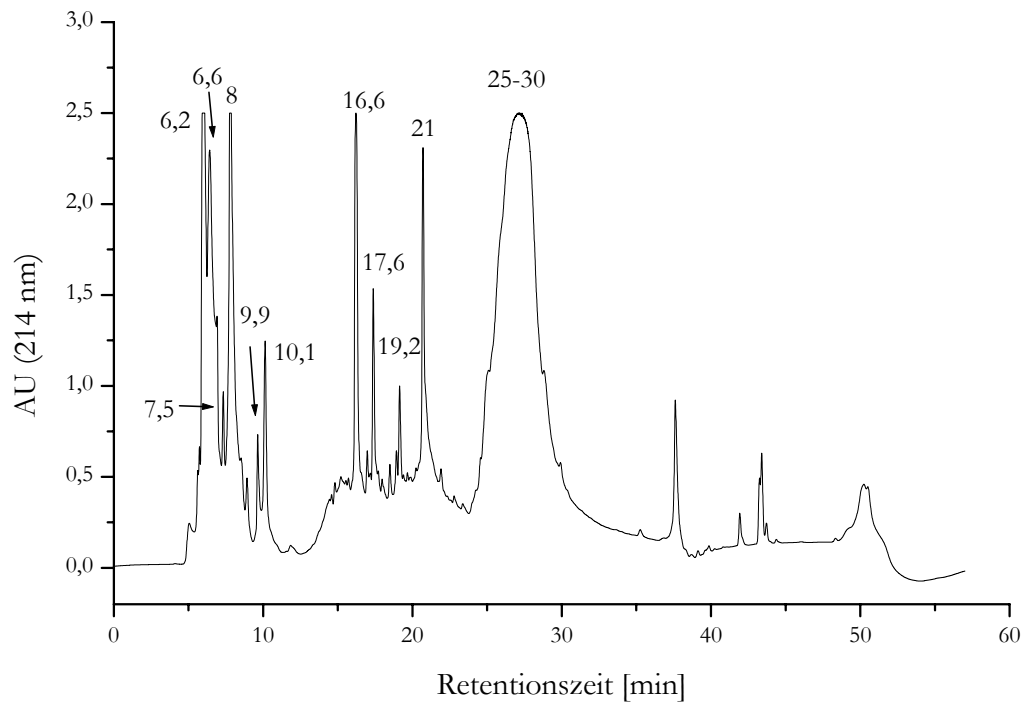


Abbildung 3.3 RP-HPLC-Chromatogramm; Säule: Jupiter Proteo, 4 μm , 90 \AA , 250 x 4,6 mm; Probe: Kartoffelfruchtwasser; Methode: F aus Abbildung 3.1; Temperatur: 30 $^{\circ}\text{C}$; Injektionsvolumen: 50 μl

Im Anschluss an das Sammeln der Fraktionen aus Abbildung 3.3 wurden diese 24 Stunden im Thermoschüttler bei 700 rpm und 37 $^{\circ}\text{C}$ aufkonzentriert. Zur MALDI-MS-Analytik wurden die Proben auf einem MALDI-Slide nach der „Dried-droplet-Methode“ aufgetragen. Dazu wurde zunächst auf die Probenplätze des MALDI-Slides 1 μl Matrixlösung (10 mg/ml Sinapinsäure, Herstellung siehe Anhang 6.6) aufgetragen. Nach dem Trocknen der Matrix wurde auf jeden Platz 1 μl der zu untersuchenden Probensubstanz aufgebracht. Abschließend wurde noch einmal 1 μl Matrixlösung aufgetragen. Zur externen Kalibration des MALDI-Gerätes diente das Standardprotein Insulin. Das MALDI-MS-Spektrum von Insulin wird im Anhang 6.1.2 in Abbildung 6.2 gezeigt. Abbildung 3.4 zeigt die Ergebnisse, die bei den MALDI-Messungen der HPLC-Fraktionen erzielt worden sind. Lediglich die Peaks bei 21 und 25-30 min lieferten dabei befriedigende MALDI-Spektren.

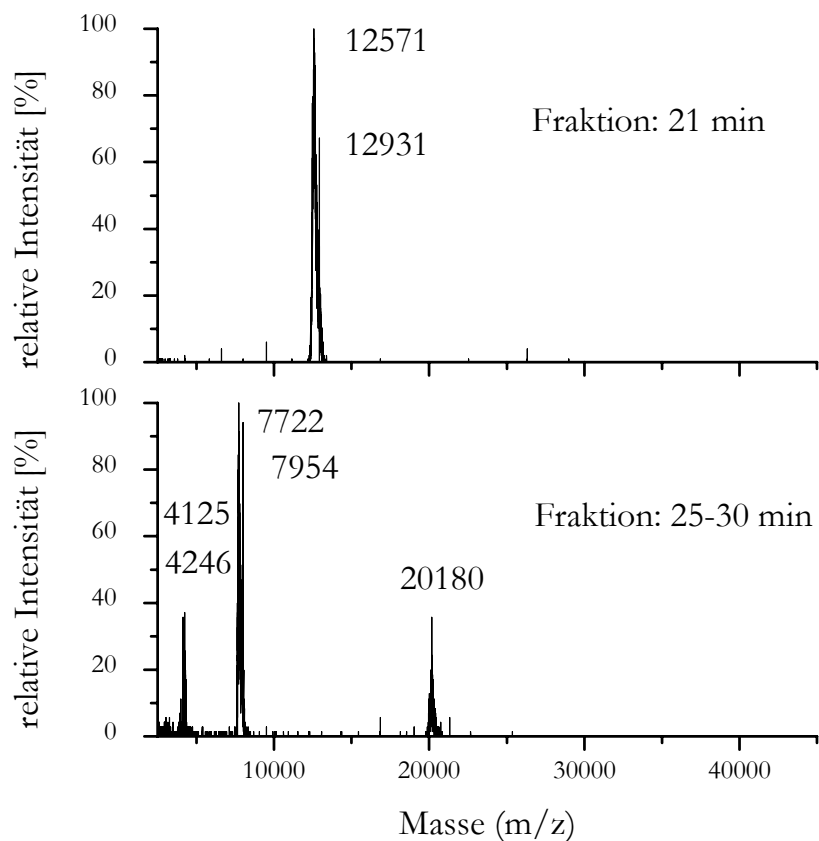


Abbildung 3.4 MALDI-MS-Spektrum der aufkonzentrierten mittels RP-HPLC gewonnenen Fraktionen; Matrix: Sinapinsäure 10 mg/ml; 50 Einzelschüsse

Die 21min-Fraktion stellt dabei die reinste Fraktion dar, die zwei scharfe Peaks bei ca. 12,6 und 12,9 kDa lieferte. Aus Tabelle 2.3 entnimmt man, dass im KFW Serin-Protease-Inhibitoren mit einem Molekulargewicht von 12,3 kDa existieren. Die bei 21 min gesammelte HPLC-Fraktion könnte demnach im Rahmen der Messungengenauigkeiten ein Serin-Protease-Inhibitor sein. Die Fraktion bei 25-30 min lieferte mehrere MALDI-Peaks. Der 4,2 kDa-Peak lässt sich dem Carboxypeptidase-Inhibitor zuordnen. Der 7,8 kDa-Peak könnte einen der Potato-Inhibitoren I (PI-1) aus Tabelle 2.3 darstellen. Eine Zuordnung könnte dabei mit dem Trypsin-Chymotrypsin-Inhibitor (Bowman-Birk-Inhibitor), der auch in der Kartoffel vorkommt, gemacht werden. Die Bestimmung des 20,2 kDa-Peaks hingegen ergibt weitaus mehr mögliche Kandidaten. Es könnte sich um den Protease-Inhibitor (PI-2), einen Cystein-Protease-Inhibitor (PCPI), einen Aspartat-Protease-Inhibitor (PAPI), den Kunitz-Protease-Inhibitor (PKPI) oder auch um einen Serin-Protease-Inhibitor handeln. Eine genauere Zuordnung lässt sich mit Hilfe des Molekulargewichts an dieser Stelle nicht machen.

3.1.4 Anwendung der entwickelten Methode

S- UND Q-FRAKTION

In diesem Abschnitt soll die für das KFW entwickelte RP-HPLC-Methode für die S- und Q-Fractionen, die mittels Ionenaustauschchromatographie aus dem KFW gewonnen wurden, angewendet werden. Die S- und Q-Fractionen lagen nach einem Trocknungsschritt in Pulverform vor, so dass sie in definierten Mengen eingewogen und gelöst werden können. Die Löslichkeit des Feststoffs ist dabei nicht vollständig gegeben. Die mittels Lowry-Test bestimmte Proteinkonzentration stimmte aber im Rahmen der Messungenauigkeiten gut mit der eingewogenen Menge überein (Details siehe laufende Dissertation R. Steinhof [110]). Von den Stammlösungen der S- und Q-Fractionen wurden Verdünnungsreihen erstellt und im Hinblick auf das Detektionslimit bei 214 nm mittels RP-HPLC untersucht. Abbildung 3.5 zeigt die dabei erhaltenen Chromatogramme.

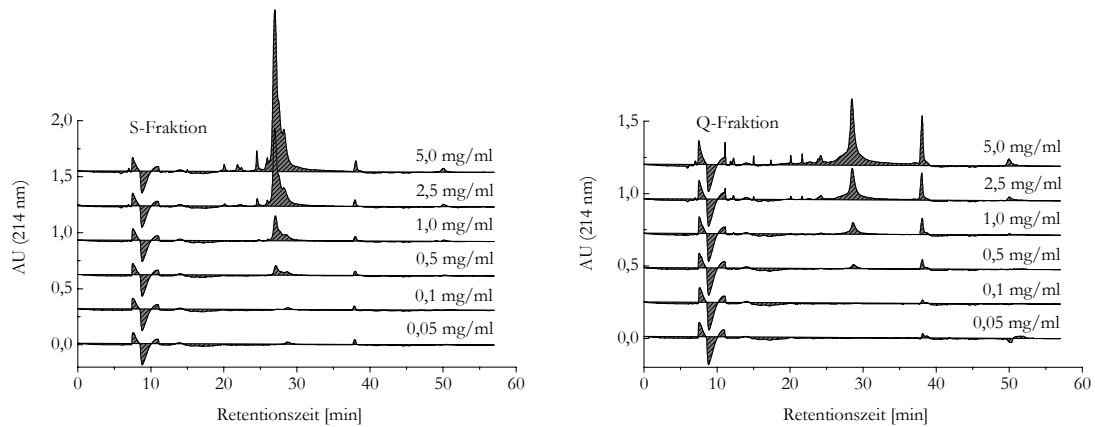


Abbildung 3.5 RP-HPLC-Chromatogramme; Säule: Jupiter Proteo, 4 μm , 90 \AA , 250 x 4,6 mm; Probe: lyophilisierte S- und Q-Fraktion (gelöst in bidest. H_2O : 10 mg/ml); Methode: F aus Abbildung 3.1; Temperatur: 30 $^\circ\text{C}$; Injektionsvolumen: 20 μl

Aus der Literatur ist bekannt, dass in der Kartoffel das Speicherprotein Patatin (40-44 kDa) und eine Gruppe von Protease-Inhibitoren (3-23 kDa) vorliegen. Wie aus gelelektrophoretischen Messungen bereits bekannt ist [109], beinhaltet die Q-Fraktion eine ca. 40 kDa-Bande und die S-Fraktion mehrere Banden im Bereich von ca. 8-20 kDa. Es wird daher davon ausgegangen, dass sich in der Q-Fraktion das Patatin und in der S-Fraktion die Protease-Inhibitoren angereichert haben.

Aus Abbildung 3.5 erkennt man, dass sich sowohl bei der S- als auch der Q-Fraktion lediglich bis zu einer Konzentration von 0,5 mg/ml Protein ein qualitativer Nachweis mit der HPLC-Methode erreichen lässt. Der Grund für diese geringe Empfindlichkeit konnte nicht geklärt werden.

STANDARD PROTEASE-INHIBITOREN

Zur genaueren Analyse der Bestandteile der S- und Q-Fraktion wurden Verdünnungsreihen von kommerziell erhältlichen Standard-Protease-Inhibitoren wie dem Bowman-Birk-Inhibitor (Trypsin-Chymotrypsin-Inhibitor) und dem Kunitz-Inhibitor (Trypsin-Inhibitor) hergestellt. Ebenso wurde eine Verdünnungsreihe von BSA als klassisches Standardprotein verwendet. Abbildung 3.6 zeigt HPLC-Chromatogramme der benannten Standardproteine im Vergleich mit der S- und Q-Fraktion.

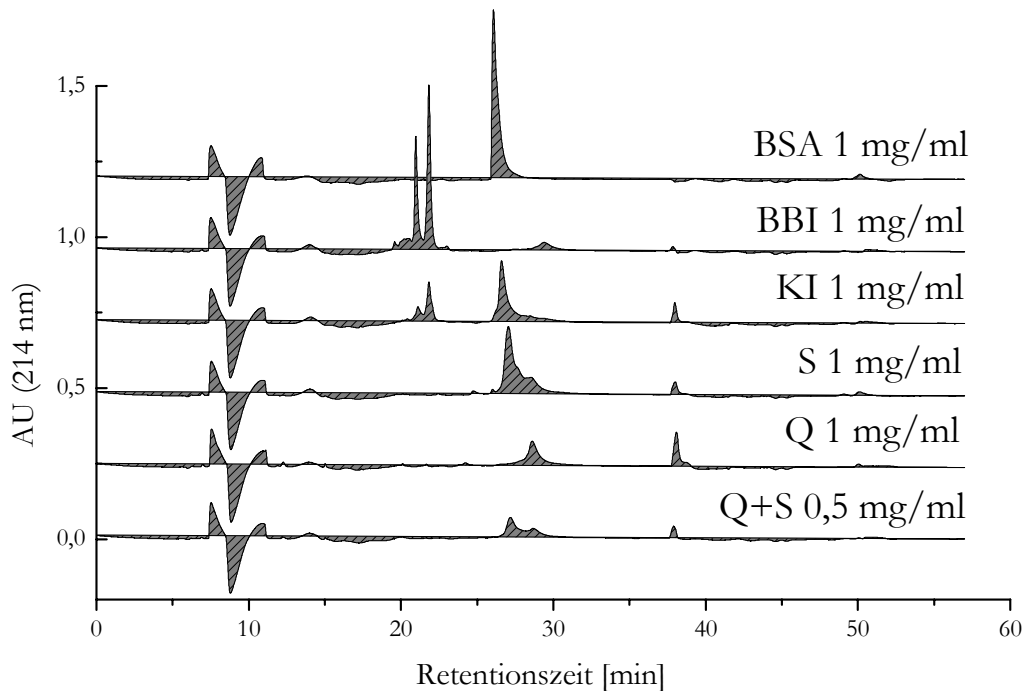


Abbildung 3.6 RP-HPLC-Chromatogramme; Säule: Jupiter Proteo, 4 μ m, 90 \AA , 250 x 4,6 mm; Proben: BSA = Bovine Serum Albumin, BBI = Bowman-Birk-Inhibitor, KI = Kunitz-Inhibitor, lyophilisierte S/Q/S+Q-Fraktion (gelöst in bidest. H_2O); Methode: F aus Abbildung 3.1; Temperatur: 30 $^\circ\text{C}$; Injektionsvolumen: 20 μ l

Zunächst lässt sich aus Abbildung 3.6 erkennen, dass die Retentionszeit und die Fläche der Peaks aus der S-Fraktion sehr gut mit der des Kunitz-Inhibitors übereinstimmt. In der S-Fraktion könnte damit der Kunitz-Inhibitor vorhanden sein. Da für die anderen in der Kartoffel (siehe Tabelle 2.3) enthaltenen Protease-Inhibitoren keine käuflichen Standards existieren, kann über deren Anwesenheit in der S-Fraktion keinerlei Aussage gemacht werden. Für eine Quantifizierung wurden Modellproteine wie der Bowman-Birk-Inhibitor (BBI) und der Kunitz-Inhibitor (KI) für die S-Fraktion und BSA für die Q-Fraktion zur Kalibration verwendet. Die aus den Standardkalibrationen von BBI, KI und BSA ermittelten Konzentrationen für die S- und Q-Fraktion sind gegen die tatsächlich eingesetzten Konzentrationen der S- und Q-Fraktion aufgetragen worden. Die Kalibrationsgeraden sind durch Auswertung der Flächen erstellt worden und sind in Abbildung 6.1 im Anhang 6.1.1

dargestellt. Die Auftragungen liefern für alle drei Geraden Regressionskoeffizienten von 0,99. Die Kalibration des Kunitz-Inhibitors versus der S-Fraktion ergibt eine Steigung von 1,098 und verdeutlicht damit die gute Übereinstimmung der Flächen. Der Kunitz-Inhibitor kann folglich mittels externer Kalibration für eine Quantifizierung der S-Fraktion eingesetzt werden. Die Geradengleichung der Kalibration des Bowman-Birk-Inhibitors versus S-Fraktion erzielt eine Steigung von 0,752 und stimmt damit weniger gut überein. Dies bestätigt allerdings die bereits beim Vergleich der Retentionszeiten gemachte Aussage. Die Kalibration des BSA versus Q-Fraktion gibt mit einer Steigung von 0,099 eine schlechte Übereinstimmung. BSA kann daher im Gegensatz zum Lowry-Test nicht für eine externe Kalibration (Quantifizierung) der Q-Fraktion verwendet werden.

Als weitere Aussage kann man aus Abbildung 3.6 entnehmen, dass sich ein Gemisch aus Q- und S-Fraktion nicht optimal mit der verwendeten HPLC-Methode trennen lässt. Die Mischung hat zwar zwei Peakmaxima, allerdings sind die beiden Peaks nicht basisliniengetrennt. Eine Flächenberechnung kann folglich nur in der separaten Fraktion, nicht jedoch in der Mischung vorgenommen werden. Für eine genauere Bestimmung der Bestandteile der S- und Q-Fractionen sind Messungen mittels MALDI-MS notwendig (siehe Kapitel 3.2).

KOMMERZIELL ERHÄLTICHE KARTOFFELPROTEIN-PRODUKTE

Auf dem amerikanischen Markt befindet sich bereits ein Appetitzügler (Satisse, Kemin Consumer Care, Des Moines, Iowa, USA), der den Protease-Inhibitor II aus der Kartoffel enthält. Der pulverförmige Kapselinhalt wurde gelöst und mittels HPLC-Analytik untersucht. Zur Vergleichbarkeit sind der Kunitz-Inhibitor, der Bowman-Birk-Inhibitor und der Carboxypeptidase-Inhibitor in der Abbildung 3.7 mit dargestellt.

Bei dem Appetitzügler kann man erkennen, dass sich neben einigen Peaks ein erhebliches Grundrauschen messen lässt. Zurückführen kann man diesen Sachverhalt möglicherweise auf Hilfsmittel (z.B. Stabilisatoren o.ä.), die in den Präparaten enthalten sind. Aufgrund der Vielzahl an Peaks in dem Chromatogramm für den Appetitzügler kann man davon ausgehen, dass es sich um eine Mischung mehrerer Substanzen handelt. Der Appetitzügler weist Peaks auf, die die gleiche Retentionszeit wie BBI und CPI zeigen. Für eine genauere Bestimmung sind Messungen mittels MALDI-MS notwendig. Diese werden im folgenden Kapitel beschrieben.

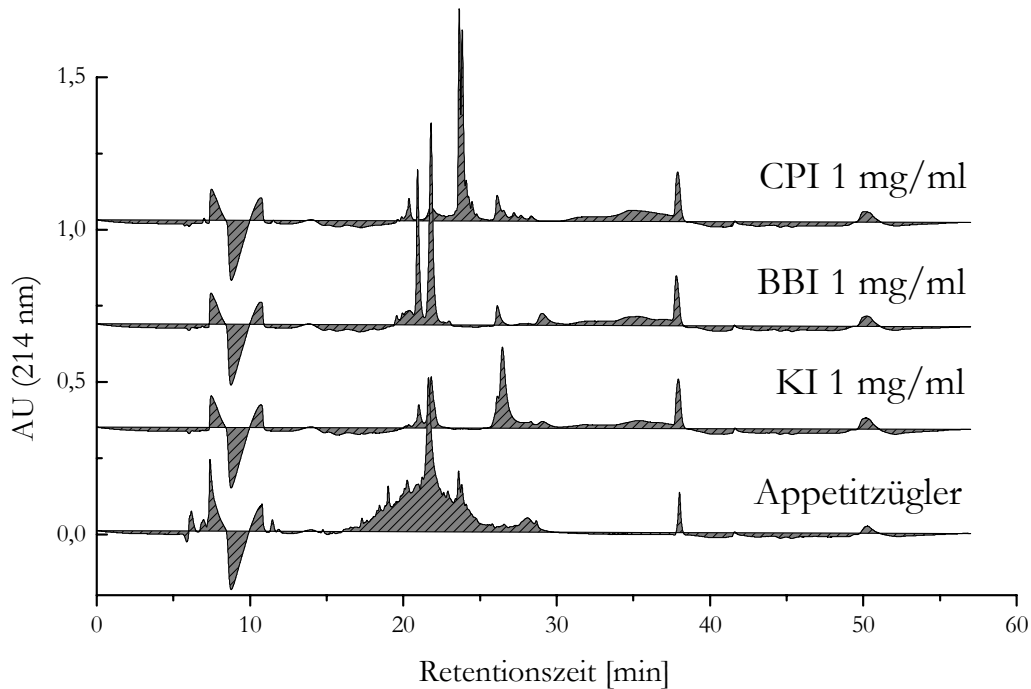


Abbildung 3.7 RP-HPLC-Chromatogramme; Säule: Jupiter Proteo, 4 μ m, 90 Å, 250 x 4,6 mm; Proben: Appetitzügler, KI = Kunitz-Inhibitor, BBI = Bowman-Birk-Inhibitor, CPI = Carboxypeptidase-Inhibitor; Methode: F aus Abbildung 3.1; Temperatur: 30 °C; Injektionsvolumen: 20 μ l

3.2 MALDI-MS

S-FRAKTION, STANDARD PROTEASE-INHIBITOREN, APPETITZÜGLER

Zur massenspektrometrischen Analyse der mittels Ionenaustausch gewonnenen S- und Q-Fractionen sowie der Standardsubstanzen und kommerziell erhältlichen Kartoffelprotein-Produkte diente ein MALDI 3 (Kratos Analytical, A Shimadzu Group Company, Shimadzu Deutschland GmbH, Duisburg, Deutschland) mit einem Stickstofflaser (337 nm). Für diesen Laser eignen sich als Matrix α -Cyano-4-hydroxymizinsäure, Sinapinsäure (3,5-Dimethoxy-4-hydroxymizinsäure) und 1,4-Dihydroxybenzoesäure. Es stellte sich heraus, dass sich die Sinapinsäure (10 mg/ml; Herstellung siehe Anhang 6.6) für die hier verwendeten Proben am besten eignet.

Zur MALDI-MS-Analytik wurden die Proben auf einem MALDI-Slide nach der „Dried-droplet-Methode“ aufgetragen (siehe Kapitel 3.1.3). Zur externen Kalibration des MALDI-Gerätes diente das Standardprotein Insulin. Das MALDI-MS-Spektrum von Insulin ist im Anhang 6.1.2 in Abbildung 6.2 dargestellt. Die Q- und S-Probe waren bedingt durch ihre Gewinnung (Ionenaustauschchromatographie) noch salzhaltig. Diese Pufferreste erschweren jedoch die Messungen erheblich. Für eine Entsalzung wurden die Proben zunächst lyophilisiert und anschließend in destilliertem Wasser (0,1 % TFA) gelöst. Diese so

vorbehandelten Proben wurden mit Pipettenspitzen-Aufsätzen, die mit C18-Material gefüllt sind, so genannten Ziptips, entsalzt und aufkonzentriert. Die dafür verwendete Arbeitsvorschrift ist im Anhang 6.2.1 beschrieben. Abbildung 3.8 zeigt MALDI-Messungen einer S-Fraktion ohne Aufreinigung und mit der oben beschriebenen Ziptip-Aufreinigung.

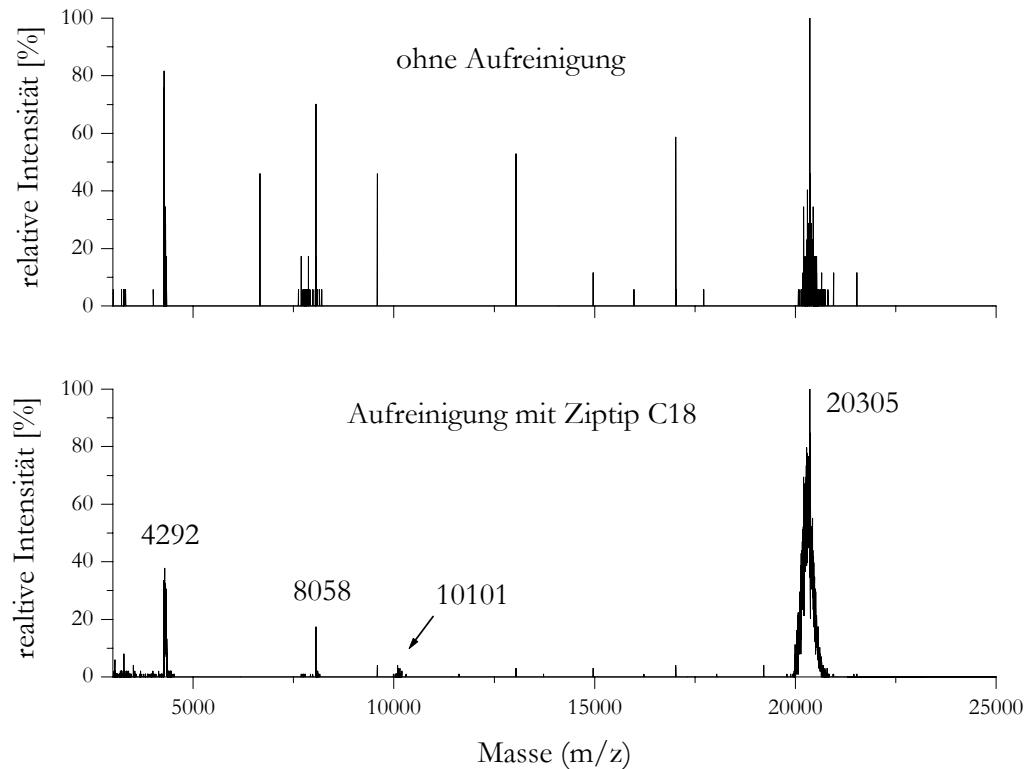


Abbildung 3.8 MALDI-MS-Spektren: S-Fraktion; oben: ohne Aufreinigung; unten: Ziptip-Aufreinigung (C18); Matrix: Sinapinsäure 10 mg/ml; 50 Einzelschüsse

Ein Vergleich der beiden Spektren in Abbildung 3.8 zeigt sehr deutlich eine Verbesserung bei Verwendung einer Ziptip-Aufreinigung der Probe. Die absolute Peak-Intensität ist höher und hebt sich damit vom „Grundrauschen“ ab. Eine Auswertung des Spektrums wird damit sehr gut möglich. Die S-Fraktion enthält Substanzen mit einem molekularem Gewicht von 4,3 kDa, 8 kDa und 20,3 kDa. Der 10,1 kDa-Peak stellt aller Wahrscheinlichkeit nach den M^{2+} -Peak des 20,3 kDa-Peaks dar. Um die gemessenen Massen den möglichen Kandidaten aus der Gruppe der Protease-Inhibitoren zuzuordnen, wurden kommerziell erhältliche Standard-Protease-Inhibitoren wie der Carboxypeptidase-Inhibitor, der Bowman-Birk-Inhibitor (Trypsin-Chymotrypsin-Inhibitor) und der Kunitz-Inhibitor (Trypsin-Inhibitor) als wässrige Lösungen hergestellt und ebenso mittels MALDI-MS gemessen. Ebenso wurde der Appetitzügler, der den Protease-Inhibitor II aus der Kartoffel enthält, der MALDI-Messung unterzogen. Dazu war wiederum eine Entsalzung mit Ziptip-Aufreinigung notwendig. Einen Vergleich der MALDI-Spektren der Protease-Inhibitoren, der S-Fraktion und des Appetitzüglers zeigt Abbildung 3.9.

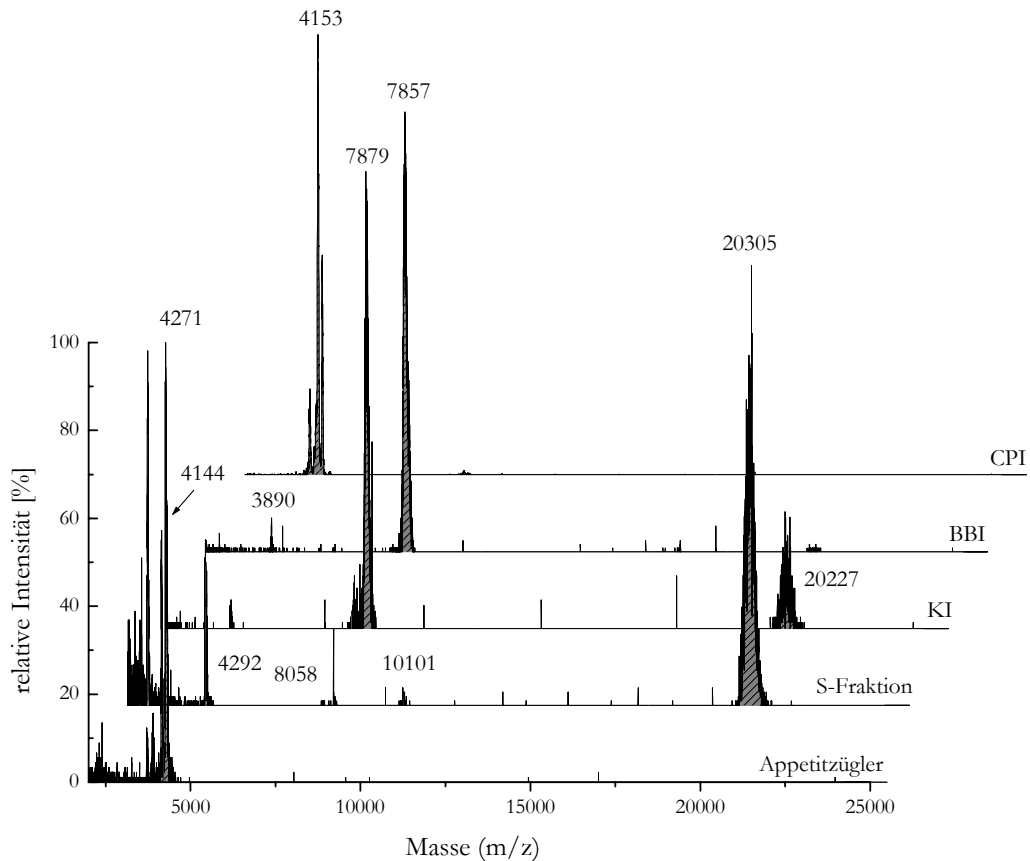


Abbildung 3.9 MALDI-MS-Spektren; Proben: CPI = Carboxypeptidase-Inhibitor, BBI = Bowman-Birk-Inhibitor, KI = Kunitz-Inhibitor, S-Fraktion (lyophilisiert, Aufreinigung: C18-Ziptip), Appetitzügler; Matrix: Sinapinsäure 10 mg/ml; 50 Einzelschüsse

Mit Hilfe der kommerziell erhältlichen Standard-Protease-Inhibitoren kann eine mögliche Zuordnung getroffen werden. Die S-Fraktion beinhaltet wahrscheinlich einen Carboxypeptidase-Inhibitor mit ca. 4,3 kDa, einen Kunitz-Inhibitor mit ca. 8 und ca. 20,3 kDa und evtl. auch einen Bowman-Birk-Inhibitor mit ca. 8 kDa. Im Spektrum des Appetitzüglers lässt sich mit dieser Messung der Protease-Inhibitor II (ca. 20 kD) allerdings nicht nachweisen.

Q-FRAKTION

Aus gelelektrophoretischen Untersuchungen (Dissertation F. Menzel [109]) ist bekannt, dass die Q-Fraktion eine ca. 40-44 kDa-Bande, wahrscheinlich das Patatin enthält. Zur massenspektrometrischen Analyse der Q-Fraktion wurde wie bereits oben beschrieben verfahren. Eine Ziptip-Aufreinigung der Q-Fraktion brachte allerdings im Gegensatz zur S-Fraktion keinerlei Verbesserung (kein Peak im MALDI-Spektrum). Vielmehr muss davon ausgegangen werden, dass das Patatin an das Ziptip-Material irreversibel gebunden wurde und nicht durch die verwendete Methode eluiert werden konnte. Demzufolge kann lediglich das Spektrum der Q-Fraktion ohne Ziptip-Aufreinigung gezeigt werden (Abbildung 3.10).

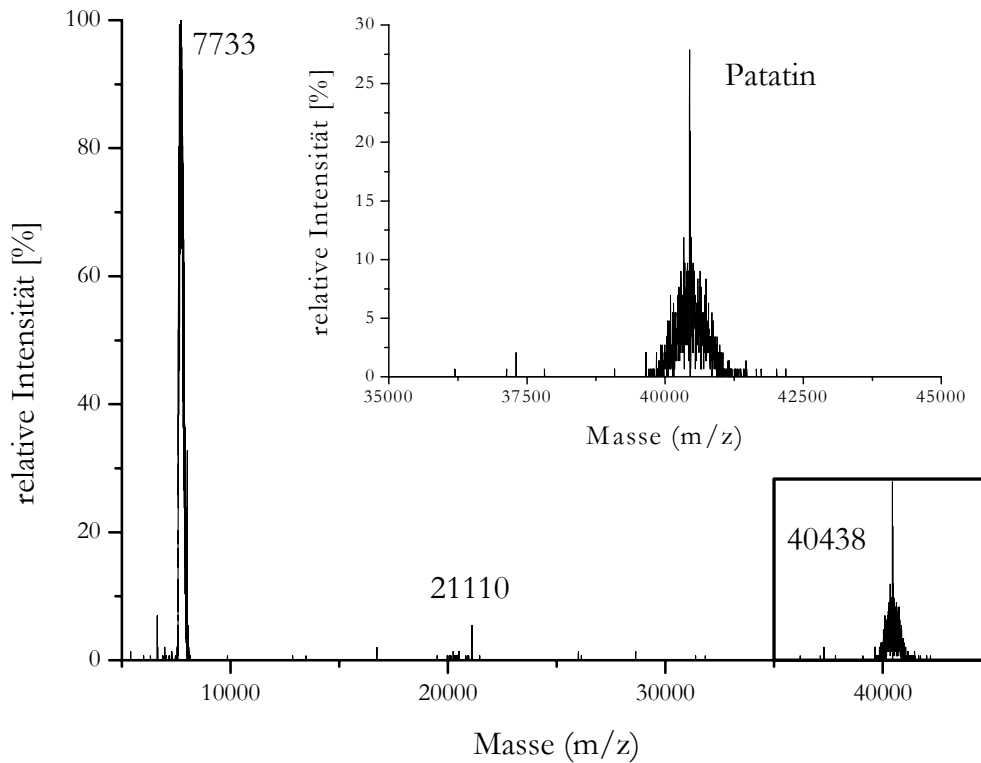


Abbildung 3.10 MALDI-MS-Spektrum; Q-Fraktion; Probe dialysiert gegen destilliertes Wasser; Matrix: Sinapinsäure 10 mg/ml; Laserpower 140; 50 Einzelschüsse

Es kann bestätigt werden, dass diese Fraktion ein 40-44 kDa-Protein, höchstwahrscheinlich das Patatin, enthält. Allerdings ist in der Fraktion noch eine Verunreinigung bei 7,7 kDa vorhanden. Der 21 kDa-Peak stellt wahrscheinlich den M^{2+} -Peak des 40-44 kDa-Bereichs dar. Zur genaueren Analyse der S- und Q-Fraktion wurde ein tryptischer Verdau der Proteine und Protease-Inhibitoren mit sich anschließender Sequenzbestimmung durchgeführt. Die Ergebnisse werden im nächsten Abschnitt dargestellt.

3.2.1 Tryptischer Verdau

Für eine endgültige Charakterisierung von Patatin und für eine genauere Zuordnung der Protease-Inhibitoren in der S-Fraktion wurden die entsprechenden Banden vom SDS-Gel ausgeschnitten und ein tryptischer Verdau vorgenommen. Die erhaltene Peptidmischung wurde am IPF Pharmaceuticals, Hannover mittels MALDI-TOF (Voyager DE Pro mass spectrometer, Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland) gemessen. Die Methodenbeschreibung zur Gelelektrophorese befindet sich im Anhang 6.2.4. Das erhaltene Gel ist ebenfalls im Anhang dargestellt (6.1.3, Abbildung 6.5). Spur drei zeigt die Q-Fraktion.

Die 40 kDa-Bande diente für den tryptischen Verdau. Das Protokoll dazu ist im Anhang 6.2.5 beschrieben. Das gemessene Peptidmuster ist in Abbildung 3.11 wiedergegeben.

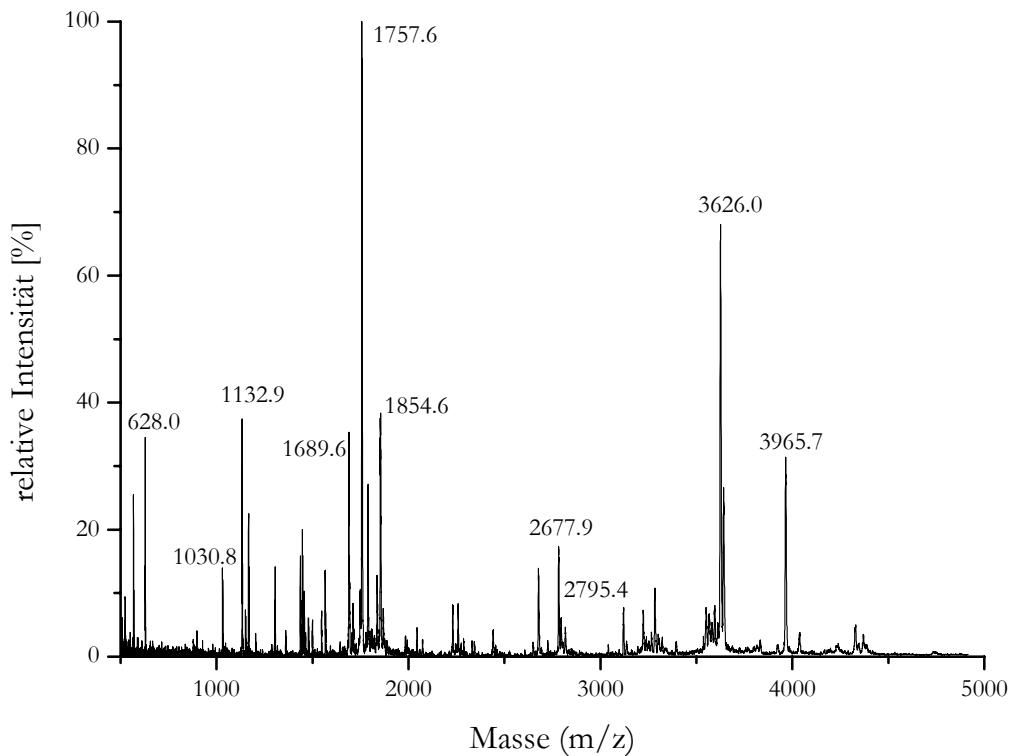


Abbildung 3.11 MALDI-MS-Spektrum einer mittels tryptischem Verdau von einer 40 kDa-Bande vom SDS-PAGE erhaltenen Peptidmischung; Matrix: α -Cyano-4-hydroxymizinsäure 5 mg/ml; in Kooperation mit: Dr. Harald John, IPF Pharmaceuticals, Hannover

Die in Abbildung 3.11 dargestellten Peptidmassen wurden in die Datenbank Mascot (www.matrixscience.com) für eine Bestimmung des ursprünglichen Proteins eingegeben. Es konnten zehn Peptide (Massen) identifiziert werden. Die mit der höchsten Trefferwahrscheinlichkeit (score 98) gefundenen Proteine sind S05592 patatin precursor (clone pPATB2) -potato und B26017 patatin T58 precursor -potato. Eine Protein-Zuordnung ist signifikant bei einem score > 76, so dass hier von einer eindeutigen Identifizierung des Patatins gesprochen werden kann. Die identifizierten Massen weichen von denen des theoretischen Verdau mit einer Massendifferenz von maximal $\pm 1,6$ Da ab. Tabelle 3.2 gibt darüber hinaus die Aminosäuresequenzen der identifizierten Peptidmassen und ihre Start- und Endpunkte in der Aminosäuresequenz des Patatin an. Die Spalte „Missed Cleavage“ (MC) gibt an, ob Trypsin definitionsgemäß C-terminal nach Arginin (R) und Lysin (K) das Protein gespalten hat (MC = 0) oder eine Schnittstelle beim Verdau übersprungen hat (MC = 1). MC = 1 wird in Tabelle 3.2 fett und blau dargestellt.

Tabelle 3.2 Zusammenfassung der Daten für gemessene und berechnete Massen, die Abweichung der berechneten von den gemessenen Massen des tryptischen Verdaus einer 40 kDa-Bande und die Aminosäuresequenzen der gemessenen Peptide für die gefundenen Proteine ((S05592) patatin precursor (clone pPATB2) – potato und (B26017) patatin T58 precursor – potato), theoretische Werte: (S05592, pI = 5,46; Molekulargewicht = 42586 Da; B26017, pI = 5,38; Molekulargewicht = 42612 Da)

gemessene Massen [Da]	berechnete Massen [Da]	Δ Masse [Da]	Missed cleavage (MC)	Start – Ende	Aminosäuresequenz
3965,7	3964,1	1,6	1	209 – 246	YEFNLVDGAVATVGDPELLLSVAT R LAQEDPAFSSIK
3626,0	3625,8	0,2	0	66 – 100	LADYFDVIGGTSTGGLLTAMITTPNENNRPF A AAK
2795,4	2794,5	0,9	1	41 – 65	GIIPAILEFLEGQLQEVDNN K DAR
2677,9	2677,4	0,5	0	209 – 234	YEFNLVDGAVATVGDPELLLSVATR
1854,6	1852,9	1,6	0	252 – 268	QMLLSLGTGTNSEFDK
1757,6	1756,9	0,7	0	143 – 158	VHQALTEVAISSFDIK
1689,6	1689,0	0,7	1	129 – 142	YLLQVLQE K LGETR
1132,9	1132,7	0,2	0	129 – 137	YLLQVLQEK
1030,8	1030,5	0,3	0	311 – 318	HSQNNYLR
628,0	627,4	0,6	0	278 – 282	WGPLR

Die zehn identifizierten Peptidmassen aus Tabelle 3.2 decken die Aminosäuresequenz des Patatins zu 40 % ab (sequence coverage 40 %).

Abbildung 3.12 verdeutlicht dies durch die blau hervorgehobenen Aminosäuren.

<u>10</u>	<u>20</u>	<u>30</u>	<u>40</u>	<u>50</u>	<u>60</u>
MATTKSFLIL	FFMILATTSS	TCAKLEEMVT	VLSIDGGGIK	GIIPAILLEF	LEGQLQEVDN
<u>70</u>	<u>80</u>	<u>90</u>	<u>100</u>	<u>110</u>	<u>120</u>
NKDARLADYF	DVIGGTSTGG	LLTAMITTPN	ENNRPFAAAK	DIVPFYFEHG	PHIFNYSGSI
<u>130</u>	<u>140</u>	<u>150</u>	<u>160</u>	<u>170</u>	<u>180</u>
LGPMYDGKYL	LQVLQEKLGE	TRVHQALTEV	AISSFDIKTN	KPVIFTKSNL	AKSPELDAKM
<u>190</u>	<u>200</u>	<u>210</u>	<u>220</u>	<u>230</u>	<u>240</u>
YDICYSTAAA	PIYFPPHHFV	THTSNGAR YE	FNLVDGGVAT	VGDPALLSLS	VATRLAQEDP
<u>250</u>	<u>260</u>	<u>270</u>	<u>280</u>	<u>290</u>	<u>300</u>
AFSSIK SLDY	KQMLLLSLGT	GTNSEFDKTY	TAE EAAK WGP	LRWMLAIQQM	TNAASSYMTD
<u>310</u>	<u>320</u>	<u>330</u>	<u>340</u>	<u>350</u>	<u>360</u>
YYISTVFQAR	HSQNNYLRVQ	ENALTGTTTE	MDDASEANME	LLVQVGETLL	KKPVSKDSPE
<u>370</u>	<u>380</u>				
TYEEALKRFA	KLLSNRKKLR	ANKASY			

Abbildung 3.12 Aminosäuresequenz von Patatin (S05592 und B26017); blau hervorgehoben sind die identifizierten Peptide des tryptischen Verdaus; Quelle: www.matrixscience.com

Abschließend lässt sich festhalten, dass durch den tryptischen Verdau der 40 kDa-Bande aus einem SDS-Gel eine eindeutige Identifizierung von Patatin in der Q-Fraktion vorgenommen werden konnte.

Analog zur Q-Fraktion wurde auch die S-Fraktion dem tryptischen Verdau vom SDS-Gel unterzogen. Das SDS-Gel ist im Anhang gezeigt (6.1.3, Abbildung 6.5). Spur zwei zeigt die S-Fraktion. Die 20 kDa-Bande wurde für den tryptischen Verdau verwendet. Das dabei erhaltene Peptidmuster zeigt Abbildung 3.13.

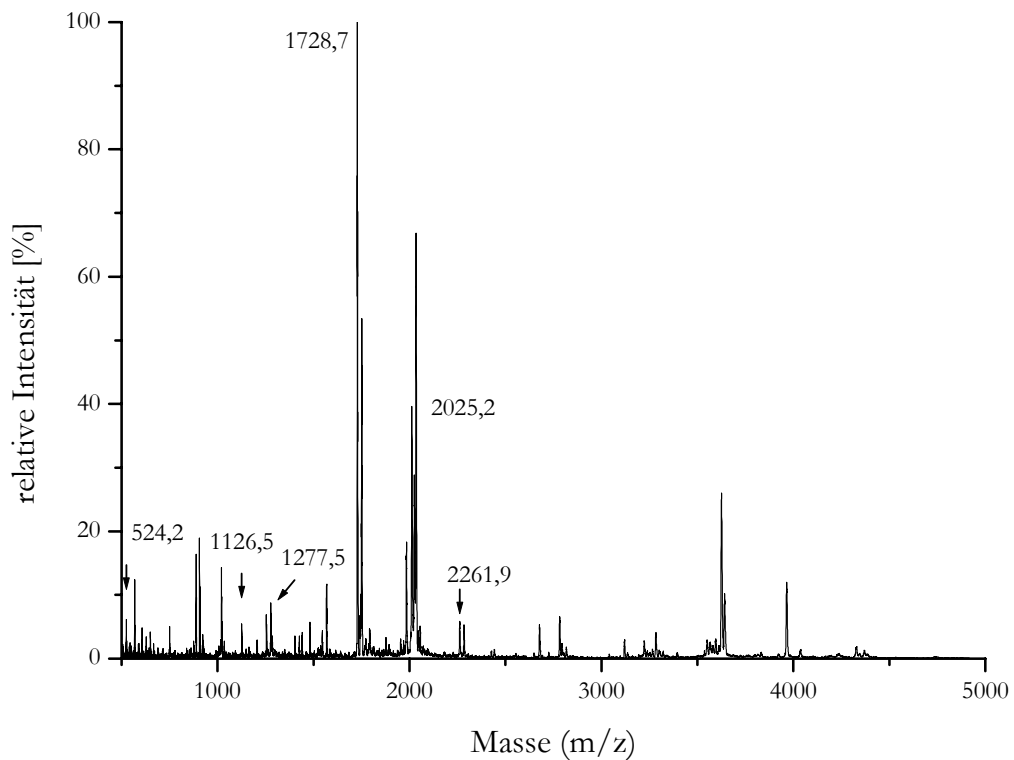


Abbildung 3.13 MALDI-MS-Spektrum einer mittels tryptischem Verdau von einer 20 kDa-Bande vom SDS-PAGE erhaltenen Peptidmischung; Matrix: α -Cyano-4-hydroxycimtsäure 5 mg/ml; in Kooperation mit: Dr. Harald John, IPF Pharmaceuticals, Hannover

Ebenso wie beim Patatin-Nachweis wurden die gemessenen Peptidmassen für eine Identifizierung in die Datenbank Mascot eingegeben. Auf diesem Weg ließ sich hierbei allerdings keine Zuordnung der Peptide vornehmen. Vielmehr musste auf dem umgekehrten Weg ein theoretischer tryptischer Verdau in der Datenbank ExPASy (www.expasy.org) von möglichen Proteinen vorgenommen werden. Die dabei erhaltenen Peptidmassen wurden dann mit den gemessenen Daten verglichen und somit eine Zuordnung vorgenommen. Es konnten letztlich Peptide des Putative Kunitz-type tuber invertase inhibitors (Q6PMR6_SOLTU (Q6PMR6)) und des Potato Cysteine protease inhibitors 10 precursor (PCPI-10) (CPI10_SOLTU (O24383)) identifiziert werden. Dabei weichen die Massen von denen des theoretischen Verdau mit einer Massendifferenz von maximal $\pm 1,7$ Da ab. Ein „Missed Cleavage“ von 1 wird in Tabelle 3.3 und Tabelle 3.4 fett und blau dargestellt.

Tabelle 3.3 Zusammenfassung der Daten für gemessene und berechnete Massen, die Abweichung der berechneten von den gemessenen Massen des tryptischen Verdaus einer 20 kDa-Bande; Aminosäuresequenzen der gemessenen Peptide für das gefundene Protein (CPI10_SOLTU (O24383) Potato Cysteine protease inhibitor 10 precursor (PCPI-10), betrachtete Kette: Cysteine protease inhibitor 10, (Aminosäure 8-186), theoretische Werte: pI = 8,83; Molekulargewicht = 20161,51 Da)

gemessene Massen [Da]	berechnete Massen [Da]	Δ Masse [Da]	Missed cleavage (MC)	Start – Ende	Aminosäuresequenz
524,2	523,3	0,9	0	142 – 145	NVYK
1126,5	1125,6	0,8	0	177 – 185	DFIPFVFIK
1126,5	1126,5	0,0	0	75 – 84	SESDYGDVVR
1728,7	1727,9	0,8	0	8 -22	LVLPEVYDQDGNPLR
2025,2	2024,1	1,1	1	169 – 185	LVTVNDEKDFIPFVFIK
2261,9	2260,1	1,7	0	109 – 129	VNNEQLVVTGGNVGNENDIFK

Tabelle 3.4 Zusammenfassung der Daten für gemessene und berechnete Massen, die Abweichung der berechneten von den gemessenen Massen des tryptischen Verdaus einer 20 kDa-Bande; Aminosäuresequenzen der gemessenen Peptide für das gefundene Protein (Q6PMR6_SOLTU (Q6PMR6) Putative Kunitz-type tuber invertase inhibitor, 221 Aminosäuren, theoretische Werte: pI = 8,21; Molekulargewicht = 24755,78 Da)

gemessene Massen [Da]	berechnete Massen [Da]	Δ Masse [Da]	Missed cleavage (MC)	Start – Ende	Aminosäuresequenz
524,2	523,3	0,9	0	177 – 180	NVYK
1126,5	1125,6	0,8	0	212 – 220	DFIPFVFIK
1126,5	1126,5	0,0	0	110 – 119	SESDYGDVVR
2025,2	2024,1	1,1	1	204 – 220	LVTVNDEKDFIPFVFIK
2261,9	2260,1	1,7	0	144 – 164	VNNEQLVVTGGNVGNENDIFK

Im Fall des Potato Cysteine protease inhibitors (Tabelle 3.3) können 6 Peptidmassen zugeordnet werden. In der Aminosäuresequenz Abbildung 3.14 sind diese blau hervorgehoben.

```

      10      20      30      40      50      60
TCHDDDNLVL PEVYDQDGNP LRIGERYIIK NPLLGAGAVY LDNIGNLQCP NAVLQHMSIP

      70      80      90      100     110     120
QFLGKGTPVV FIRKESDYG DVVRLMTAVY IKFFVKTTKL CVDETVWKN NEQLVVTGGN

      130     140     150     160     170     180
VGNENDIFKI KKTDLVIRGM KNVYKLLHCP SHLECKNIGS NFKNGYPRLV TVNDEKDFIP

```

FVFIKA

Abbildung 3.14 Aminosäuresequenz von O24383 Potato Cysteine protease inhibitor 10 precursor (PCPI-10); blau hervorgehoben sind die identifizierten Peptide der spezifischen Trypsinspaltung; Quelle: www.expasy.org

Mit der Aminosäuresequenz des Putative Kunitz-type tuber invertase inhibitor (Tabelle 3.4) stimmen 5 Peptidmassen überein. Diese sind in der folgenden Abbildung fett blau dargestellt.

```

      10      20      30      40      50      60
MKSINILSFL LLSSTLSLVA FARSFTSENP IVLPTTCHDD DNLVLPEVYD QDGNPLRIGE

      70      80      90      100     110     120
RYIIKNPLLG AGAVYLDNIG NLQCPNAVLQ HMSIPQFLGK GTPVVFIRKS ESDYGDVVRL

      130     140     150     160     170     180
MTAVYIKFFV KTKKLCVDET VWKVNNEQLV VTGGNVGNEN DIFKIKKTDL VIRGMKNVYK

      190     200     210     220
LLHCPSHLEC KNIGSNFKNG YPRLVTVNDE KDFIPFVFIK A

```

Abbildung 3.15 Aminosäuresequenz von Q6PMR6 Putative Kunitz-type tuber invertase inhibitor; blau hervorgehoben sind die identifizierten Peptide der spezifischen Trypsinspaltung; Quelle: www.expasy.org

Zusammenfassend kann man sagen, dass der Nachweis von Peptidmassen, die möglicherweise von den beiden Protease-Inhibitoren stammen, anhand von theoretischen Daten des tryptischen Verdaus möglich ist. In diesem Fall lässt sich aufgrund der indirekten Zuordnung aber keine Sequenzabdeckung (sequence coverage) angeben.

3.3 Kapillarelektrophorese

Nachdem mit chromatographischen Methoden (RP-HPLC) keine basisliniengetrennten Peaks für die S- und Q-Fraktion erzielt werden konnten, sollte anschließend eine bessere Trennung mittels Kapillarelektrophorese erreicht werden. Die Technik der elektrophoretischen Trennung in einer Kapillare bietet neben dem Vorteil des geringen Probe- und Lösungsmittelverbrauchs die Möglichkeit, kurze Trennzeiten bei hoher Auflösung zu erreichen [112, 113].

Für die Messung des nativen Kartoffelfruchtwassers und der S- und Q-Fraktionen kamen zunächst phosphat-, citrat- und borathaltige Puffer für die Kapillarezonenelektrophorese (CZE: Capillary Zone Electrophoresis) zur Anwendung. Dabei lieferten die Messungen im Boratpuffersystem die besten Ergebnisse (Abbildung 3.16).

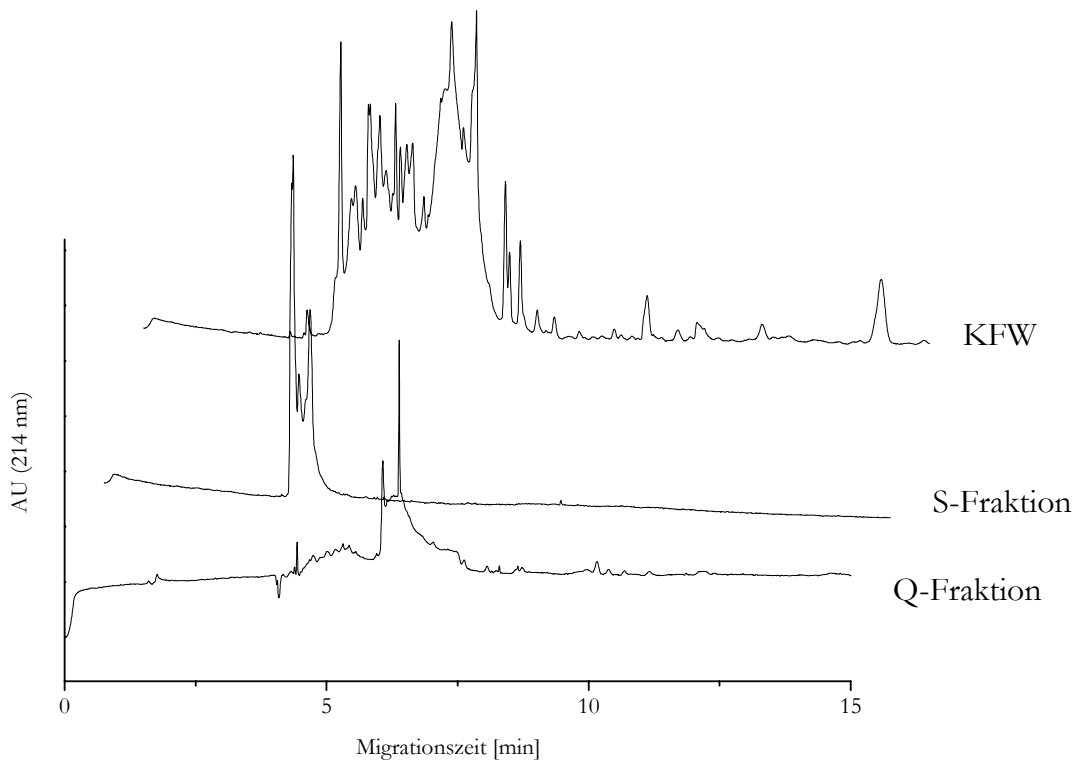


Abbildung 3.16 Elektropherogramme von KFW, S- und Q-Fraktion; Kapillare: 50 μm * 40 cm (30 cm eff. Länge) fused silica; Puffer: 40 mM Boratpuffer pH 10; Druckinjektion: 0,5 psi, 10 sec; Spannung: 20 kV; Temperatur: 25 $^{\circ}\text{C}$

Es ist ersichtlich, dass das Elektropherogramm von Kartoffelfruchtwasser eine Ansammlung von vielen Peaks aufweist, wie es auch für dieses komplexe Probenmaterial zu erwarten war. Demgegenüber wurden sowohl aus der S- als auch der Q-Fraktion nur zwei Peaks erhalten. Dadurch wird deutlich, dass in den beiden Fraktionen eine Abtrennung von einem oder mehreren ähnlichen Proteinen möglich war.

Allerdings muss auch gesagt werden, dass eine ideale Trennung mit guter Reproduzierbarkeit der verschiedenen postulierten Isoformen des Patatins in der Q-Fraktion oder auch eine Auftrennung der verschiedenen Protease-Inhibitoren in der S-Fraktion nicht erzielt werden konnte. Dafür verantwortlich ist die unvorteilhafte Eigenschaft der Proteine, an Oberflächen anzuhaften, so auch an der Innenseite der unbehandelten Kapillare. Es kommt dabei zu einer Adsorption der geladenen Seite der Proteine an die negativ geladene Kapillarwand (Silanol-Gruppen). Peakverbreiterung, Verschlechterung der Trennungseffizienz, Peaktailing und eine Verlängerung der Migrationszeiten im Verlauf einer Messreihe sind die Folge [114].

Proteinadsorption kann ebenso durch hydrophobe Kräfte verursacht werden, vor allem, wenn die Proteinstabilität in Lösung durch Veränderung in der Umgebung (pH-Wert, Temperatur) beeinflusst wird. Als Folge kommt es zur Entfaltung der Proteine (Denaturierung), wodurch hydrophobe Bereiche des Proteins ungeschützt vorliegen. Daraus resultiert eine Aggregation oder hydrophobe Adsorption der Proteine an die Kapillarwand. Eine Unterdrückung dieser Adsorption kann durch Mizellenbildner wie Harnstoff als Additiv im Trennpuffer erreicht werden. Pufferzusätze wie z.B. Harnstoff können ebenfalls den Prozess der Denaturierung zurückdrängen und damit eine Aggregation verhindern. Harnstoff erhöht zusätzlich die Löslichkeit hydrophober Komponenten und trägt so zur Verbesserung der Trennung bei. Als weiterer Pufferzusatz können Cellulose-Derivate verwendet werden. Dadurch wird ebenfalls eine ungewünschte Adsorption an der Kapillarwand unterdrückt und die Auflösung von Isomeren kann verbessert werden [114, 115].

Für weiterführende kapillarelektrophoretische Messungen wurde daher in Anlehnung an Pots et al. [15] ein Zitronensäurepuffer mit Harnstoff- und Methylhydroxyethyl-Cellulose-Zusätzen verwendet. Man spricht nun von einer Mizellaren Elektrokinetischen Kapillar-Chromatographie (MEKC: Micellar electrokinetic chromatography). Die dabei erhaltenen Elektropherogramme für die S- und Q-Fraktion enthält Abbildung 3.17.

Im Elektropherogramm der Q-Fraktion lässt sich eine Auftrennung von vier Peaks erkennen. Diese stellen möglicherweise die verschiedenen Isoformen des Patatins dar. Auch die S-Fraktion zeigt mehrere scharf getrennte Peaks, so dass die bereits vermutete Existenz verschiedener Protease-Inhibitoren bestätigt werden kann. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Pufferzusätze (Harnstoff und Methylhydroxyethyl-Cellulose) eine Protein-Adsorption an der Kapillarwand effektiv unterdrückt haben und dadurch eine Verbesserung der Trennung erzielt werden konnte.

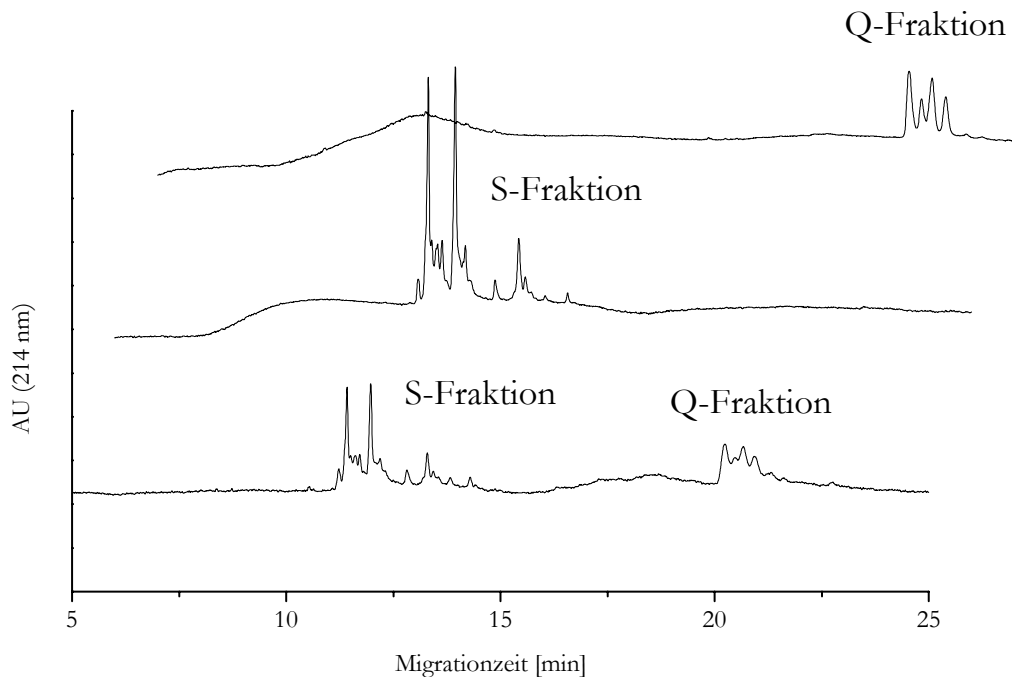


Abbildung 3.17 Elektropherogramme; S-Fraktion und Q-Fraktion; Kapillare: 50 μm * 50 cm (40 cm eff. Länge) fused silica; Puffer: 150 mM Zitronensäure, 6 M Harnstoff, 0,05 % Methylhydroxyethyl-Cellulose, pH 2,5; Druckinjektion: 0,5 psi, 10 sec; Spannung: 20 kV; Temperatur: 20 $^{\circ}\text{C}$

Zusätzlich wurde eine Kalibration mit BSA zur Quantifizierung der Q-Fractionen (wie beim Lowry-Test) durchgeführt. Die dabei erhaltene Korrelation mit der eingesetzten Konzentration der Q-Fraktion ist in Abbildung 6.6 (Anhang 6.1.4) dargestellt. Aus dieser Auftragung ergibt sich eine Gerade mit einer Steigung von 0,163. Der Wert verdeutlicht eine ungenügende Übereinstimmung der erhaltenen Peakflächen des BSA mit denen der Q-Fraktion. BSA kann daher unter den gewählten Bedingungen im Gegensatz zum Lowry-Test nicht für eine externe Kalibration (Quantifizierung) der Q-Fraktion verwendet werden.

3.4 Biologische Aktivität von Protease-Inhibitoren

Für eine Produktkontrolle bei der Gewinnung und Aufreinigung der S-Fraktion ist es unabdingbar, die biologische Aktivität der gewonnenen Protease-Inhibitoren zu verfolgen. Dafür wurde ein Test mit Trypsin als Enzym verwendet, das durch die Protease-Inhibitoren gehemmt wird. Dieses Messverfahren lässt einen Rückschluss auf die inhibierende Aktivität der Protease-Inhibitoren zu. Als Substrat des Enzymtests wird N- α -Tosyl-L-Argininmethylester (TAME) verwendet. Unter dem Einfluss von Trypsin erfolgt eine Hydrolyse der Esterbindung, wobei das freigesetzte Produkt photometrisch durch eine Zunahme der Absorption bei 247 nm detektiert werden kann (siehe Abbildung 6.7, Anhang 6.1.5). Die Versuchsbedingungen sind im Anhang 6.1.6 aufgeführt.

BESTIMMUNG DES MOLAREN EXTINKTIONSKOEFFIZIENTEN

Zur Bestimmung des molaren Extinktionskoeffizienten wurde die Substratkonzentration variiert. Anschließend wurde die bei den einzelnen Messungen erhaltene Endabsorption gegen die jeweilige Ausgangssubstratkonzentration aufgetragen (siehe Abbildung 6.8, Anhang 6.1.7). Aus der linearen Regression erhält man eine Steigung von 449,5 l/mol bei einem Regressionskoeffizienten von $R^2 = 0,99$. Nach dem Lambert-Beerschen-Gesetz entspricht die Steigung $dE/dc = \epsilon \cdot d$. Bei einer Schichtdicke $d = 1$ cm erhält man einen molaren Extinktionskoeffizienten ϵ von 449,5 L/(mol*cm). Der in der Literatur [116, 117] zu findende Wert bei allerdings leicht variierten Versuchsbedingungen beträgt $\epsilon = 540$ L/(mol*cm). Im Rahmen der Messungenauigkeiten kann man von einer guten Übereinstimmung sprechen. Für weitere Berechnungen und Auswertungen wurde der hier ermittelte molare Extinktionskoeffizient verwendet.

INHIBIERUNG DER TRYPSINAKTIVITÄT MIT TRYPSIN-INHIBITOREN

Der entwickelte Enzymtest wurde nun zur Bestimmung der Trypsin-Inhibitor-Aktivität der im KFW vorliegenden Protease-Inhibitoren verwendet. Dazu wurde zunächst mit einem kommerziell erhältlichen Trypsin-Inhibitor (Kunitz-Inhibitor) eine Inhibierung der Trypsinaktivität untersucht. Der Trypsin-Inhibitor wurde im molaren Anteil von 0-100 %, bezogen auf die Molarität des Trypsins, zur Inhibierung zugesetzt. Den dabei erhaltenen linearen Zusammenhang stellt Abbildung 6.9 (Anhang 6.1.8) dar. Bei einem Regressionskoeffizienten von 0,94 kann man davon ausgehen, dass ein linearer Zusammenhang der Inhibierung über den getesteten Konzentrationsbereich gegeben ist.

BESTIMMUNG DER TRYPSININHIBIERENDEN AKTIVITÄT VON PROBEN

Zur Untersuchung der S- und Q-Fractionen wurden diese lyophilisiert und anschließend Stammlösungen von 5 mg/ml erstellt. Die gleiche Konzentration wurde für den bereits in Pulverform vorliegenden Appetitzügler gewählt. Die Konzentration der Substanzen im Gesamtansatz betrug nach den Versuchsbedingungen (Anhang 6.1.6) 0,05 mg/ml. Abbildung 3.18 zeigt die Auftragung der gemessenen spezifischen Aktivität der inhibierenden Proben und des nicht-inhibierten Trypsins.

Trypsin besitzt eine spezifische Aktivität von ca. 220 TAME units/mg. Der weitaus geringere Wert von 42 TAME units/mg für die S-Fraktion beweist die Existenz von Trypsin-Inhibitoren. Der Appetitzügler, der ebenfalls Protease-Inhibitoren enthält, zeigt einen ähnlichen Wert mit 49 TAME units/mg. Allerdings enthält offensichtlich auch die Q-Fraktion, für die Patatin als Hauptbestandteil angenommen wird, noch Trypsin-Inhibitoren (132 TAME units/mg).

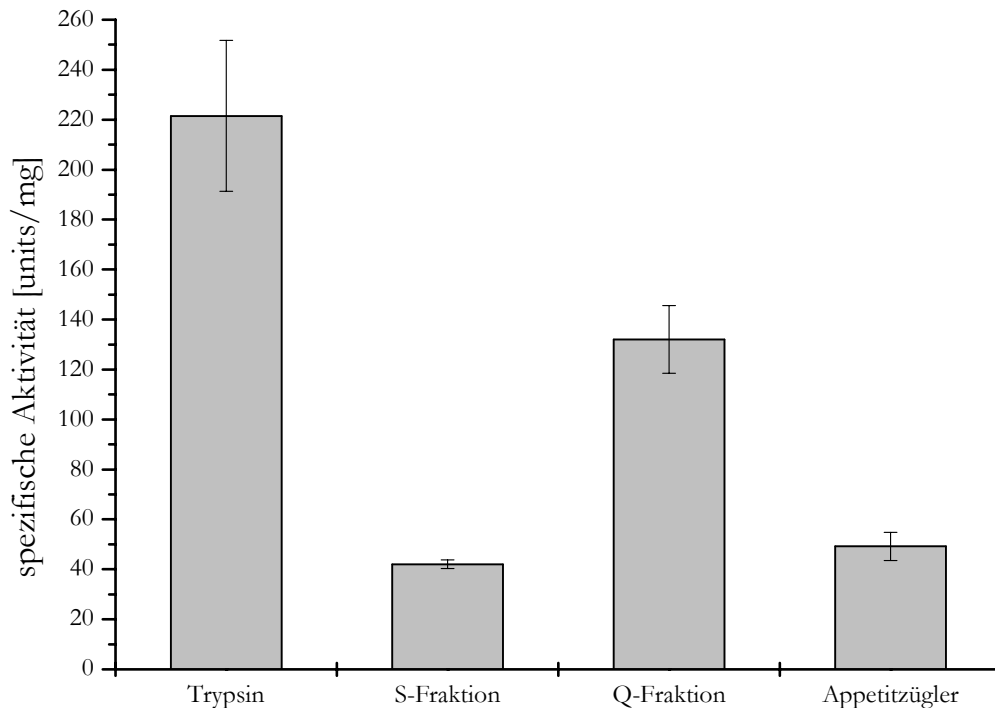


Abbildung 3.18 Spezifische Aktivität (Substrat TAME) von Trypsin, S- und Q-Fraktion und eines kommerziell erhältlichen Appetitzüglers (Mittelwerte mit Standardabweichung; $n = 3$)

Aus den ermittelten Werten erkennt man, dass die gewonnenen und aufkonzentrierten Protease-Inhibitoren (S-Fraktion) aus dem Kartoffelfruchtwasser mit der Kationenaustausch-Chromatographie nahezu die gleiche biologische Aktivität zeigen wie ein kommerziell erhältlicher Appetitzügler. Offen bleibt jedoch, ob die Protease-Inhibitoren aus der S-Fraktion ebenfalls appetitzügelnde Wirkung zeigen. Dafür müssten ernährungsphysiologische Studien durchgeführt werden, die im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich waren. Zusätzlich erhält man den Beweis, dass in der Patatin-Fraktion (Q-Fraktion) Verunreinigungen von Trypsin-Inhibitoren vorliegen. Diese konnten bisher mit den Methoden der Gelelektrophorese oder MALDI-MS bedingt durch die Auflösung bzw. durch salzhaltigen Verunreinigungen noch nicht nachgewiesen werden.

Abschließend kann man sagen, dass der verwendete Enzym-Assay auf Trypsin-Inhibitoren eine gute Möglichkeit bietet, die biologische Aktivität der gewonnenen Fraktion zu untersuchen und somit einen Rückschluss auf den Reinheitsgrad zu ziehen.

3.5 Biologische Aktivität von Patatin

Ebenso wie in der S-Fraktion wurde in der Q-Fraktion die biologische Aktivität gemessen. Patatin zeigt eine Acyl-Transferase und eine Lipid-Acyl-Hydrolase (LAH) Aktivität. Letztere kann durch die Hydrolyse des Substrats p-Nitrophenyldecanoat (p-Nitrophenolcaprat) und somit durch die photometrische Messung (bei 400 nm) des frei werdenden p-Nitrophenolats verfolgt werden (siehe Abbildung 6.10, Anhang 6.1.9). Die Messungen wurden in Anlehnung

an [23] durchgeführt. Die Versuchsbedingungen sind im Anhang 6.1.10 dargestellt. Bei der Gewinnung der Q-Fraktion werden zunächst die Eluate 1 und 2 gewonnen. Diese werden dann mittels Ultrafiltration (UF) und Diafiltration (DF) aufkonzentriert und entsalzt, bevor sie lyophilisiert wurden und die „Q-Probe“ erhalten wurde. Für weiterführende Details des Gewinnungs-Prozesses sei auf die laufende Dissertation R. Steinhof [110] verwiesen. Die während der Gewinnung gesammelten Proben wurden mit der oben beschriebenen Methode auf die Patatin-Aktivität geprüft. Abbildung 3.19 zeigt die dabei erhaltene spezifische Aktivität.

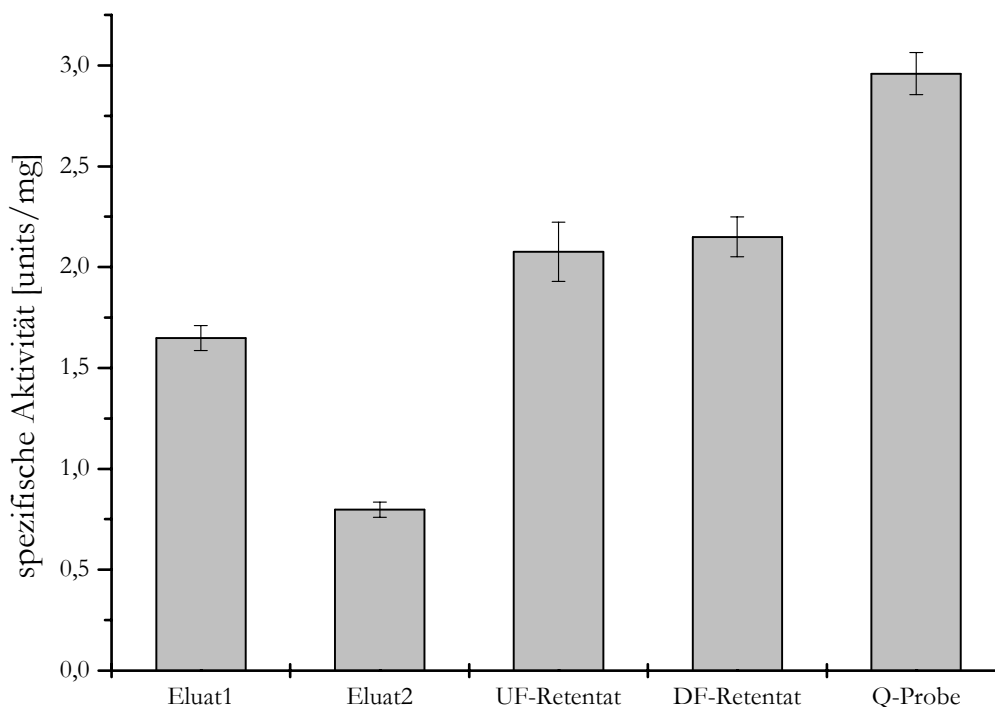


Abbildung 3.19 Spezifische Aktivität (Substrat Nitrophenyldecanoat) von Eluat1, Eluat2, Retentat der Ultrafiltration (UF-Retentat), Retentat der Diafiltration (DF-Retentat) und lyophilisierte Q-Probe (Mittelwerte mit Standardabweichung; $n = 3$)

Aus Abbildung 3.19 lässt sich die Zunahme der spezifischen Aktivität der Proteine in der Q-Fraktion während des Gewinnungs-Prozesses sehr gut erkennen. Das erste Eluat weist eine höhere Aktivität ($\sim 1,7$ u/mg) als das geringer konzentrierte Eluat 2 ($\sim 0,8$ u/mg) auf. Die Ultrafiltrations- und Diafiltrations-Schritte erhöhen die spezifische Aktivität auf 2,1 bzw. 2,2 /mg. Eine weitere Aktivitätssteigerung (~ 3 u/mg) kann durch das Lyophilisieren erreicht werden. Zusammenfassend kann man festhalten, dass dieser Aktivitätstest eine Verfolgung des Prozess-Fortschrittes und eine Kontrolle des Patatins im Endprodukt ermöglicht.

3.6 Hydrolyse von Kartoffelproteinen

Für die enzymatische Hydrolyse von Kartoffelfruchtwasser wurden verschiedene Proteasen verwendet, die Peptidbindungen unter moderaten pH- und Temperaturbedingungen hydrolysieren. Man unterscheidet zwischen Endoproteasen, die in der Mitte des Zielproteins spalten, und Exoproteasen, die das Protein von den Enden her abbauen. Die meisten Proteasen spalten spezifisch C-terminal nach bestimmten Aminosäuren, so spaltet zum Beispiel Trypsin C-terminal nach Arginin und Lysin. Eine weitere Unterscheidungsmöglichkeit der Proteasen beruht auf den Aminosäuren im aktiven Zentrum. Man unterscheidet hier zwischen Serinproteasen mit Asparaginsäure, Serin und Histidin im aktiven Zentrum (z.B. Trypsin), Cysteinproteasen mit Asparaginsäure, Histidin und Cystein im aktiven Zentrum (z.B. Papain), Aspartatproteasen mit zwei Asparaginsäureresten im aktiven Zentrum (z.B. Pepsin) und Metalloproteasen, die ein Metallion (meist Zn^{2+}) im aktiven Zentrum gebunden haben. Aus der Beschaffenheit des aktiven Zentrums ergeben sich Möglichkeiten, die Proteasen zu hemmen, so bewirken oxidative Substanzen z.B. eine Hemmung der Cysteinproteasen, da die Thiolgruppe des Cysteins oxidiert wird.

Die Hydrolysen wurden mit verschiedenen Proteasen (Alcalase, Flavourzyme, Papain, Trypsin (siehe Anhang 6.2)) sowie mit Salzsäure durchgeführt. Die Versuche wurden in einem pH-gesteuerten Reaktor mit Thermostat durchgeführt (siehe Anhang 6.3).

Für alle Hydrolysen wurden im Verlauf der Reaktion Proben zur Bestimmung des Aminosäuregehalts mittels HPLC und des Proteingehalts nach Mikrobiuret (siehe Anhang 6.2.3, 6.2.6) genommen. Das sich durch die pH-Regelung ändernde Volumen wird in die Berechnungen einbezogen.

HYDROLYSEGRAD

Der Hydrolysegrad ist ein Maß für die Vollständigkeit der durchgeführten Hydrolyse. Er lässt sich auf zwei Arten bestimmen. Zum Ersten über die Konzentration der freien Aminosäuren nach

$$\text{Hydrolysegrad} = \frac{m_t(A) - m_0(A)}{m_0(P)} \quad (\text{Gl. 3-1})$$

mit $m_t(A)$ als Aminosäuremenge zum Zeitpunkt t , $m_0(A)$ als Aminosäuremenge vor der Hydrolyse und $m_0(P)$ als Proteinmenge vor der Hydrolyse.

Als zweites lässt sich der Hydrolysegrad über die Proteinkonzentrationen nach

$$\text{Hydrolysegrad} = 1 - \frac{m_t(\text{P})}{m_0(\text{P})} \quad (\text{Gl. 3-2})$$

mit $m_t(\text{P})$ als Proteinmenge zum Zeitpunkt t und $m_0(\text{P})$ als Proteinmenge vor der Hydrolyse bestimmen.

SALZSAURE HYDROLYSE VON KFW

Es ist bekannt, dass die Peptidbindung von Proteinen bei hohen Temperaturen durch Salzsäure zu hydrolysieren ist. Diese Reaktion erfolgt nach einem säurekatalysierten Additions-Eliminierungs-Mechanismus, wie er von Carbonsäurederivaten bekannt ist [118]. Auf diese Weise erreicht man Hydrolysegrade von nahezu 100 %.

Die salzsaure Hydrolyse dient hier als Modell für die Totalhydrolyse der im Kartoffelfruchtwasser enthaltenen Proteine. Die Versuchsbedingungen sind im Anhang 6.2.8 beschrieben. Tabelle 3.5 zeigt die bei der salzsauren Hydrolyse erhaltenen Protein- und Aminosäurekonzentrationen.

Tabelle 3.5 Salzsaure Hydrolyse, Gesamtaminosäure- und Proteinkonzentrationen

Probe	c (Aminosäure) [mg/l]	c (Protein) [g/ml]	Volumen [ml]	m (Aminosäure) [mg]	m (Protein) [mg]
Vergleichsprobe	301,01	2,46	11	3,31	27,09
nach Hydrolyse	1623,19	0,41	11	17,86	4,50

Für die salzsaure Hydrolyse ergibt sich nach (Gl. 3-1) ein Hydrolysegrad von 54 % und nach (Gl. 3-2) ein Hydrolysegrad von 83 %. Da es sich hierbei eigentlich um eine Totalhydrolyse handeln sollte, erscheinen diese Werte sehr niedrig, was durch Fehler in der HPLC-Auswertung oder durch Störungen im Proteintest bedingt sein könnte.

ENZYMATISCHE HYDROLYSE

Wenn nicht anders dargestellt, wurden die enzymatischen Hydrolysen von KFW in einem pH-gesteuerten Reaktor (siehe Anhang 6.3) durchgeführt.

Es wurden bei jedem Experiment 80 ml Kartoffelfruchtwasser-Probe vorgelegt und das proteolytische Enzym zugegeben. Über den pH-Stat wurde der pH-Wert und über den Thermostaten die Temperatur im für die Hydrolyse idealen Bereich gehalten. Zur Regelung des pH-Wertes wurde 0,1 M NaOH verwendet.

KFW UND ALCALASE/FLAVOURZYME

Diese Hydrolyse wurde mit den Proteasen Alcalase und Flavourzyme durchgeführt. Die genauere Versuchsdurchführung ist im Anhang 6.2.8 aufgeführt. Für weitere Informationen zur enzymatischen Hydrolyse mit Alcalase und Flavourzyme sei auf die Dissertation C. Kamnerdpetch [111] verwiesen. Die Messergebnisse dieses Versuches zeigt Abbildung 3.20.

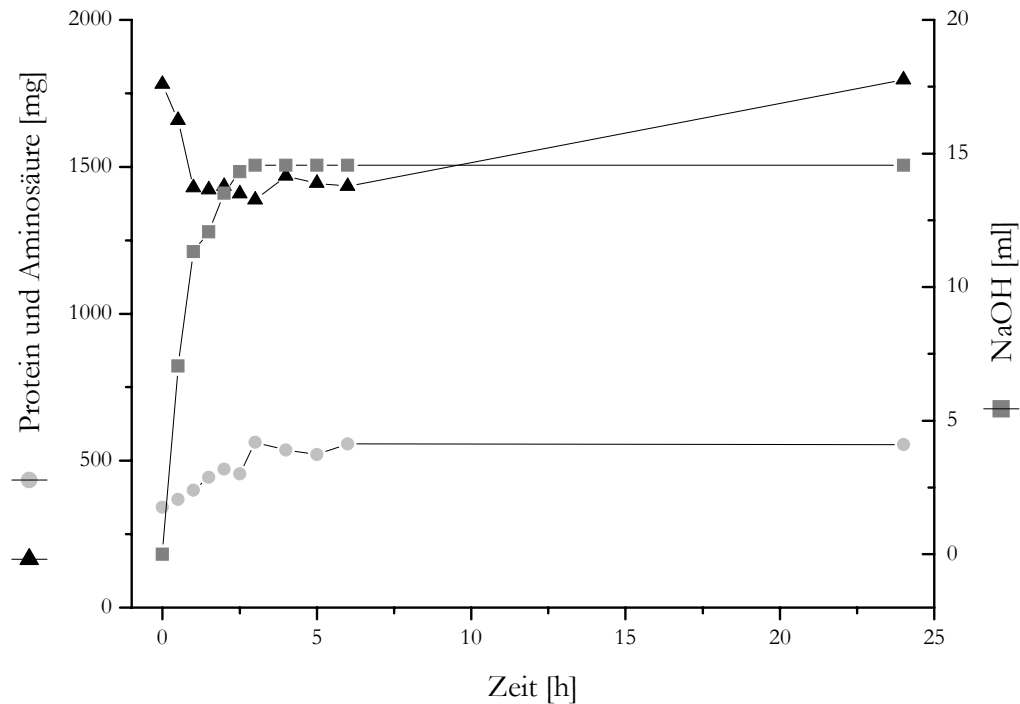


Abbildung 3.20 Hydrolyse von nativem Kartoffelfruchtwasser mit Alcalase/Flavourzyme; 0-1 h: 55°C, pH 7,0; ab 1 h: 50 °C, pH 6,0

Hier zeigt sich, dass der Proteingehalt während der ersten Stunde sinkt und dann 6 h konstant bleibt. Der Wert bei 24 h scheint hier wie bei der Papain-Hydrolyse nicht durch die Hydrolyse selbst, sondern durch sekundäre Effekte (z.B. zunehmendes Mikroorganismen-Wachstum oder eventuelle Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen) zu erklären zu sein. Der Aminosäuregehalt während der Hydrolyse steigt in den ersten 3 h an und bleibt dann konstant. Hier ist offensichtlich ein Teil der Proteine zu Aminosäuren hydrolysiert worden. Der Hydrolysegrad nach 6 h beträgt nach (Gl. 3-1) 12 % und nach (Gl. 3-2) 19 %. Die während des Versuches gesammelten Proben wurden auf ein 15 % Polyacrylamid-Gel aufgetragen. Die SDS-Gelelektrophorese zeigt Abbildung 3.21.

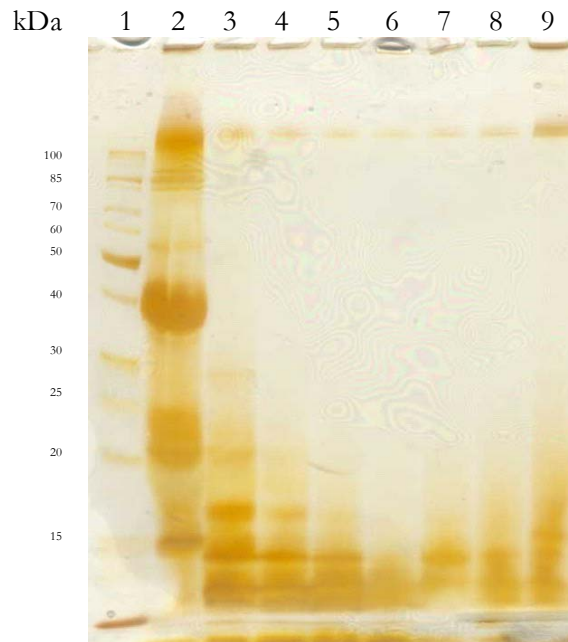


Abbildung 3.21 SDS-PAGE: Alcalase/Flavourzyme-Hydrolyse: Spur 1: Marker (4 μ l Protein Ladder); Spur 2: 0 h (vor Alcalase-Zugabe); Spur 3: 0 h (nach Alcalase-Zugabe); Spur 4: 0,5 h; Spur 5: 1 h (vor Flavourzyme-Zugabe); Spur 6: 1 h (nach Flavourzyme-Zugabe); Spur 7: 2 h; Spur 8: 5 h; Spur 9: 24 h; Proben der Spuren 2-9 1:20 in Wasser verdünnt, aufgetragen wurden 10 μ l der verdünnten Probe in 10 μ l Auftragspuffer

Aus Abbildung 3.21 lässt sich erkennen, dass bereits direkt nach Enzymzugabe die 40 kDa-Bande verschwindet und die Banden bei 20 kDa schwächer werden. Während des Reaktionsverlaufs nimmt diese Tendenz noch weiter zu. Bis zum Ende der Hydrolyse zeigt sich, dass alle Proteine in kleinere Fragmente hydrolysiert wurden, wenngleich nur ein Teil bis auf die Ebene der Aminosäuren, was aus den Hydrolysegraden hervorgeht. Dennoch ist es hier gelungen, die Kartoffelproteine zu Peptiden zu hydrolysieren, die eine Masse von unter 15 kDa besitzen.

HITZEKOAGULIERTES KARTOFFELPROTEIN UND ALCALASE/FLAVOURZYME

Diese Hydrolyse wurde ebenfalls mit den Proteasen Alcalase und Flavourzyme durchgeführt (Versuchsdurchführung siehe Anhang 6.2.8). Im Unterschied zu der vorher beschriebenen Hydrolyse wird hier hitzekoaguliertes Kartoffelprotein (Muster-Nr. 012358, Emsland-Stärke GmbH) verwendet. Die Ergebnisse dieses Versuches zeigt Abbildung 3.22.

Der Proteingehalt sinkt im Verlauf der Hydrolyse, während der Gehalt an freien Aminosäuren zunimmt. Ein Teil der Proteine ist zu Aminosäuren hydrolysiert worden. Der Hydrolysegrad nach 24 h beträgt nach (Gl. 3-1) 27 % und nach (Gl. 3-2) 57 %. Dies ist ein höherer Hydrolysegrad als beim Versuch mit nativem Kartoffelfruchtwasser. Nach der Gelelektrophorese ergibt sich ein vergleichbares Bild wie in Abbildung 3.21 (hier nicht gezeigt).

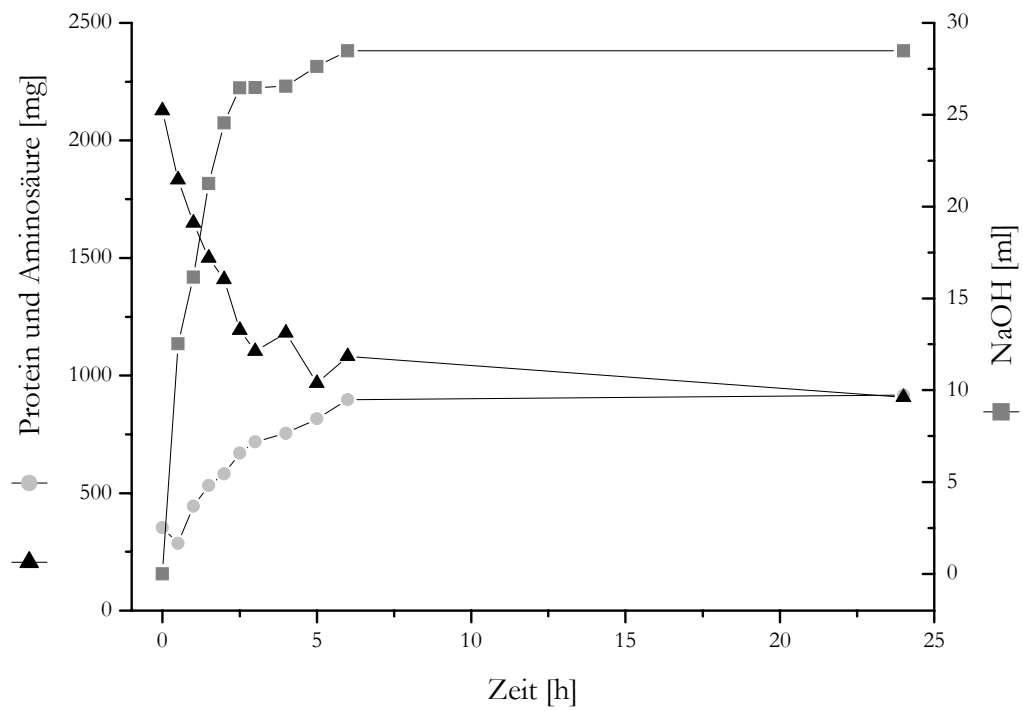


Abbildung 3.22 Hydrolyse von hitzecoagulierte Kartoffelprotein (Muster-Nr. 012358, Emsland-Stärke GmbH) mit Alcalase/Flavourzyme; 0-1 h: 55 °C, pH 7,0; ab 1 h: 50 °C, pH 6,0

HITZEKOAGULIERTES KARTOFFELPROTEIN UND MEHRFACHE ZUGABE
ALCALASE/FLAVOURZYME

Zum Erreichen eines möglich hohen Hydrolysegrads wurden Alcalase und Flavourzyme während des Versuches mehrfach zugesetzt (nach 0, 2, 4 und 6 h, Versuchsdurchführung siehe Anhang 6.2.8). Die Ergebnisse zeigt Abbildung 3.23.

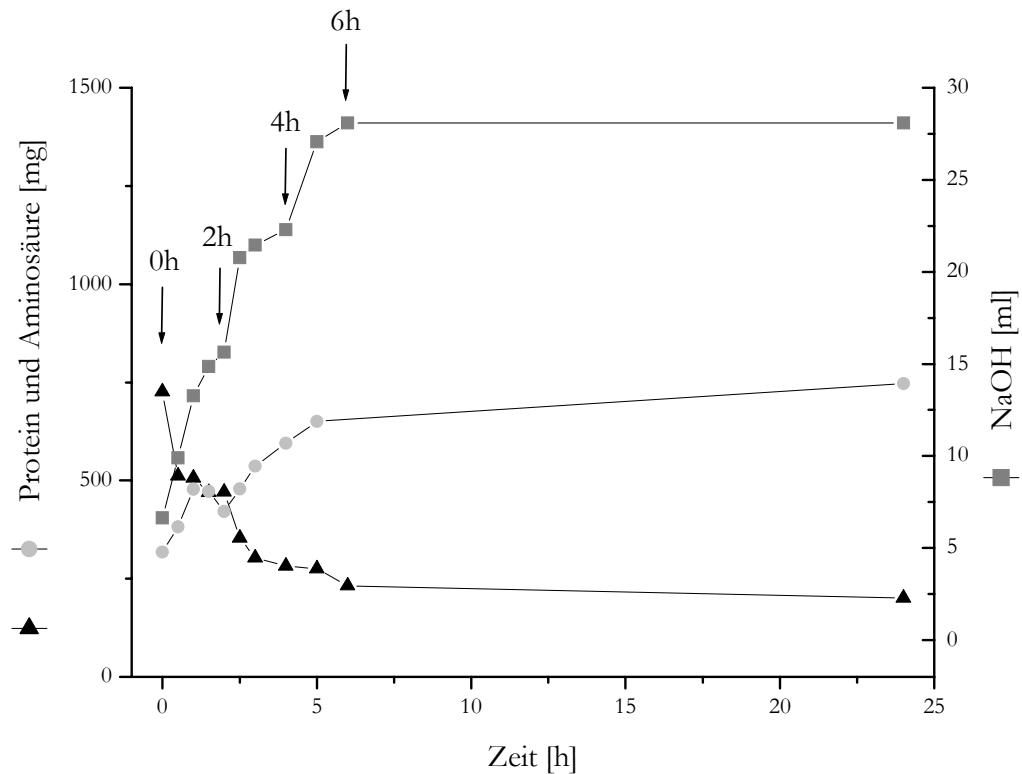


Abbildung 3.23 Hydrolyse von hitzekoagulierte Kartoffelprotein (Muster-Nr. 012358, Emsland-Stärke GmbH) durch mehrfacher Zugabe von Alcalase/Flavourzyme; 52,5 °C, pH 6,5; die Pfeile kennzeichnen den Zeitpunkt der Enzymzugabe

Der Proteingehalt nimmt im Verlauf der Reaktion ab und die Aminosäurekonzentration nimmt zu. Es ergeben sich nach 24 h Hydrolysegrade von 68 % (Gl. 3-1) bzw. 72 % (Gl. 3-2). Dies sind bereits beachtliche Hydrolysegrade, die den Ergebnissen der salzsauerer Hydrolyse sehr nahe kommen. Die SDS-Gelelektrophorese auf einem 15 % Polyacrylamid-Gel zeigt Abbildung 3.24.

Es ist erkennbar, dass im Verlaufe der Hydrolyse alle Proteinbanden vollständig abgebaut werden. Im Gegensatz zu den vorherigen Hydrolysen mit Alcalase/Flavourzyme sind hier auch keine kleineren Peptide mehr auf dem Gel erkennbar. Dies stimmt mit den Ergebnissen des hohen Hydrolysegrades überein.

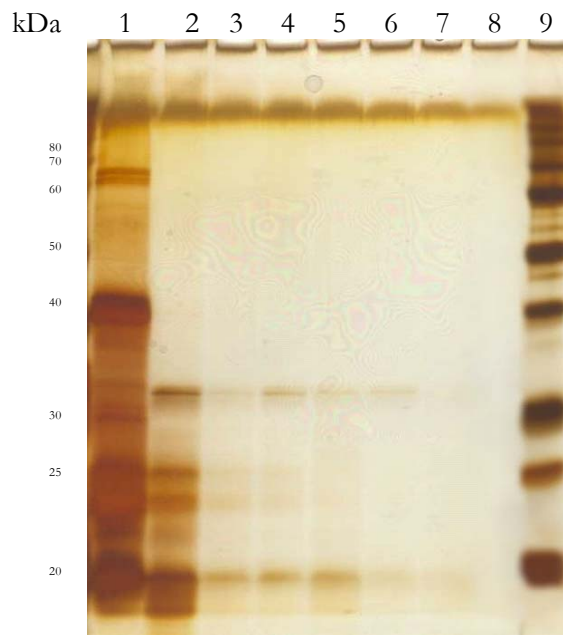


Abbildung 3.24 SDS-PAGE: Alcalase/Flavourzyme-Hydrolyse: Spur 9: Marker (4 μ l Protein Ladder); Spur 1: 0 h (vor Enzymzugabe); Spur 2: 0 h (nach Enzymzugabe); Spur 3: 0,5 h; Spur 4: 1 h (vor der Enzymzugabe); Spur 5: 1 h (nach der Enzymzugabe); Spur 6: 2 h; Spur 7: 5 h; Spur 8: 24 h; Proben der Spuren 2-8 1:25 in Wasser verdünnt, aufgetragen wurden 10 μ l der verdünnten Probe in 10 μ l Auftragspuffer

KEIMZAHLBESTIMMUNG

Es ist bekannt, dass Kartoffelbruchwasser auch als Medium zur Kultivierung von Mikroorganismen genutzt werden kann [119]. Daher ist damit zu rechnen, dass während der Versuche ein Mikroorganismenwachstum stattfindet. Um abzuschätzen, wie stark dieses Wachstum ist, wurde von verschiedenen Hydrolysen eine Keimzahlbestimmung durchgeführt. Für alle Experimente auf Plattenkulturen wurde Luria-Bertani-Agar (LB-Agar) verwendet. Die Zusammensetzung dieses Mediums ist im Anhang 6.6 beschrieben. LB-Agarplatten sind ein gutes Medium zur Bestimmung von coliformen Keimen und einigen Hefen. Anspruchsvolle Pilze wachsen auf diesem Medium nicht. Daher soll diese Keimzahlbestimmung eher einen Anhaltspunkt als eine wirklich quantitative Methode darstellen (Beschreibung der Methode siehe 6.2.7 und 6.2.8).

Es wurden Proben aus der Hydrolyse von KFW mit Papain, der Hydrolyse vom KFW mit Alcalase/Flavourzyme und der Hydrolyse von gelöstem, hitzegekochtem Kartoffelbruchwasser nach jeweils 0, 1, 3, 6 und 24 Stunden Versuchsdauer auf LB-Agarplatten aufgetragen. Aus der Anzahl der Kolonien ergeben sich die Keimzahlen im Kartoffelbruchwasser (siehe dazu Tabelle 6.1, Tabelle 6.2 und Tabelle 6.3 im Anhang 6.2.8). Trägt man den Logarithmus der Keimzahl pro ml Kartoffelbruchwasser gegen die Zeit auf, erhält man die Wachstumskurven von Mikroorganismen bei verschiedenen Bedingungen (Abbildung 3.25).

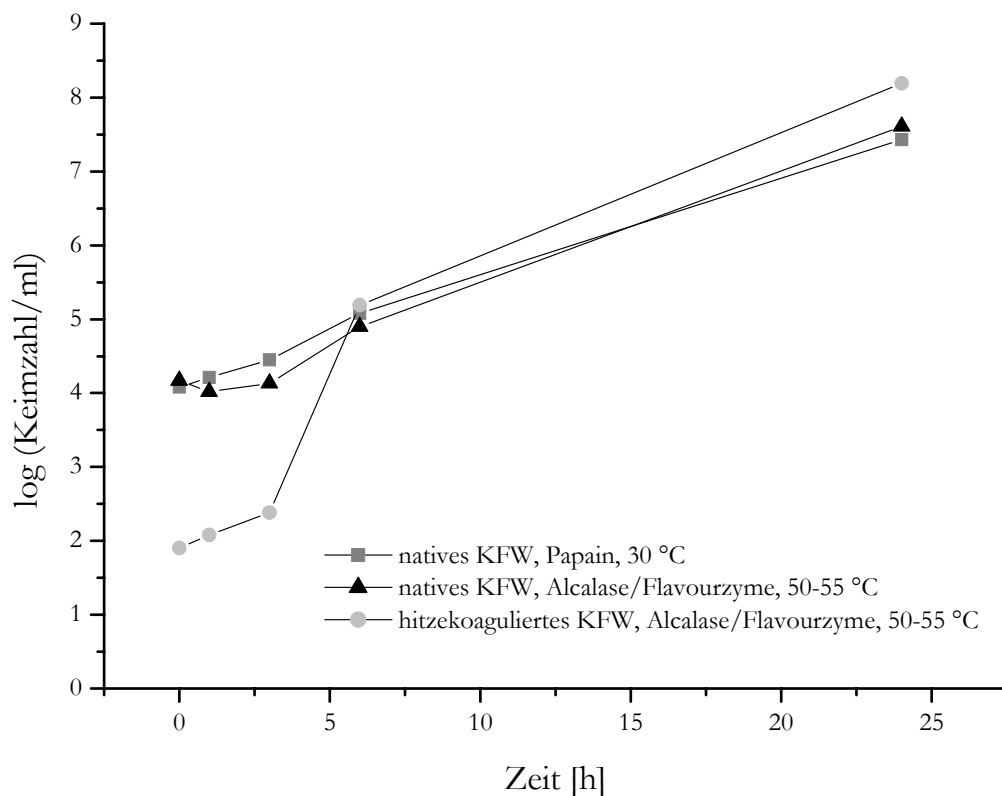


Abbildung 3.25 Wachstum von Mikroorganismen in Kartoffelfruchtwasser

Die Hydrolysen mit nativem Kartoffelfruchtwasser sind trotz der unterschiedlichen Temperaturen recht ähnlich. Die Keimzahl pro ml steigt im Verlauf des Versuches von 12.000 auf $26,8 \cdot 10^6$ bzw. von 14800 auf $40,4 \cdot 10^6$ Keime pro ml an. Interessant ist der Verlauf der Keimzahl bei dem Versuch mit gelöstem hitzeokoagulierte Kartoffelfruchtwasser. Hier sind in den ersten drei Stunden deutlich weniger Keime vorhanden. Bereits nach fünf Stunden allerdings befinden sich ebenso viele Keime in den Proben des hitzeokoagulierten Kartoffelfruchtwassers wie in den Proben des nativen Kartoffelfruchtwassers. Eine genauere mikrobiologische Betrachtung der Keime wie Gramfärbung oder eine mikroskopische Identifikation wurden nicht durchgeführt.

3.7 Zusammenfassung

In diesem Kapitel wurden verschiedene Methoden zur Analytik von Proteinen und Peptiden aus Kartoffelfruchtwasser (KFW) entwickelt. Zunächst stand als Ausgangsmaterial lediglich das unbehandelte KFW zur Verfügung. Im Verlauf dieser Arbeit wurden mittels Ionenaustausch-Membran-Adsorbentien (Q und S) zwei Fraktionen aus dem KFW gewonnen. Für die Entwicklung einer RP-HPLC-Methode wurde aber noch das unbehandelte KFW verwendet. Für erste Messungen kam ein klassisches Säulenmaterial (Nucleosil C18) zur

Anwendung. Mit dem Ziel, eine gute Trennung von möglichst vielen Signalen im Chromatogramm zu erhalten, wurde der Lösungsmittelgradient variiert. Nach dieser Optimierung wurden drei weitere Säulenmaterialien (Proteo (C12), C8 und C4) auf ihre Eignung zur Trennung getestet. Der Einsatz des neuartigen Proteo-Säulenmaterials erzielte hierbei die besten Ergebnisse in Hinblick auf Peaktrennung und –intensität.

Für eine weitergehende Charakterisierung der mittels Ionenaustausch-Chromatographie gewonnenen Fraktionen wurden dann massenspektrometrische Methoden mittels MALDI-MS angewendet. In der unbehandelten Q-Fraktion (Eluat von Anion-Austauscher) ließ sich ein ca. 40-kDa-Proteinpeak nachweisen. Eine eindeutige Zuordnung wurde allerdings erst nach einem tryptischen Verdau einer aus einem SDS-Gel ausgeschnittenen 40 kDa-Bande und anschließender MALDI-MS-Untersuchung möglich. Die molekularen Massen der gemessenen Peptid-Fragmente wurden in Datenbanken abgeglichen und es konnte eine Sequenzabdeckung von 40 % mit Patatin erreicht werden. Dies stellt in Anbetracht der Tatsache, dass das KFW als ein Gemisch aus verschiedenen Kartoffelsorten und somit möglicherweise auch verschiedenen Patatin-Isoformen anzusehen ist, ein gutes Ergebnis dar. Massenspektrometrische Messungen der S-Fraktion (Eluat nach Kationen-Austausch) ergaben verschiedene Massenpeaks, die sich auch möglichen Protease-Inhibitoren wie dem Carboxypeptidase-Inhibitor, dem Kunitz-Inhibitor und dem Bowman-Birk-Inhibitor zuordnen lassen. Nach dem tryptischen Verdau der 20 kDa-Bande des SDS-Gel konnte keine direkte Zuordnung getroffen werden. Indirekt konnten jedoch zwei mögliche Protease-Inhibitoren (Potato Cysteine protease inhibitor und Putative Kunitz-type tuber invertase inhibitor) identifiziert werden, die mit denen in der Literatur [4] beschriebenen Protease-Inhibitoren übereinstimmen.

Für eine mögliche Identifizierung der verschiedenen Isoformen des Patatins wurde eine micellare Kapillarelektrophorese-Methode mit einer dynamischen Beschichtung der Kapillarwand zur Unterdrückung der Protein-Adsorption angewendet. Als Resultat wurden vier Peaks für die Q-Fraktion im Elektropherogramm erhalten. Es ist damit ein qualitativer Nachweis für die Patatin-Isoformen gelungen. Ebenfalls wurde mittels Kapillarelektrophorese eine Trennung der verschiedenen Protease-Inhibitoren in der S-Fraktion erreicht.

Für die beiden Protein-Gruppen (S- und Q-Fraktion) wurden zusätzlich zwei Enzym-Assays für die Bestimmung der biologischen Aktivität erarbeitet. Für die S-Fraktion wurde ein Trypsin-Test mit N- α -Tosyl-L-Argininmethylester als Substrat entwickelt. Für die Messung wurde die Trypsin-Aktivität mit den Protease-Inhibitoren gehemmt. Im Umkehrschluss konnte somit die Aktivität der Protease-Inhibitoren ermittelt werden. Die Lipid-Acyl-Hydrolase-Aktivität des Patatins aus der Q-Fraktion wurde unter Verwendung des Substrats p-Nitrophenyldecanoat gemessen.

Durch die hier beschriebenen Methoden ist es möglich, eine umfassende Analytik der gewonnenen Fraktionen durchzuführen. Dadurch lässt sich der Verbleib und die Anreicherung der verschiedenen Komponenten während des Gewinnungsprozesses verfolgen und bestimmen.

4 Praktischer Teil – Glykoalkaloid-Analytik –

Viele verschiedene Extraktions- und Analyseverfahren für Glykoalkaloide sind bereits in der Literatur beschrieben (siehe Kapitel 2.3.7). Als gängige Methode erweist sich ein drei-stufiger Prozess, bestehend aus einer sauren oder nicht-wässrigen Extraktion, gefolgt von einer SPE-Aufreinigung und einer Analytik mittels HPLC. Bei dem in der Literatur verwendeten Probenmaterial handelt es sich überwiegend um Kartoffelknollen selbst oder um Nahrungsmittelprodukte aus Kartoffeln, wie z.B. Pommes frites oder Chips. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Analysestrategie für pulverige Kartoffelprotein-Proben, die bei der Emsland-Stärke GmbH aus Kartoffelfruchtwasser erzeugt worden sind, entwickelt. Die in der Literatur verwendeten Methoden konnten aufgrund der unterschiedlichen Probenbeschaffenheit nicht direkt auf die Kartoffelprotein-Proben angewendet werden. Bei der Methoden-Entwicklung wurden folgende Bedingungen an die gesamte Analyse-Methode gestellt:

- Parallele Behandlung von mehr als 10 Proben
- Schnelle Durchführbarkeit der Extraktion ohne großen apparativen Aufwand
- Entfernung von Störkomponenten aus der Extraktionslösung

In den folgenden Kapiteln werden Entwicklung und Optimierung der drei Prozessebenen (Extraktion, SPE-Aufreinigung, HPLC-Analytik) genauer erläutert und diskutiert.

4.1 HPLC-Methode für α -Chaconin und α -Solanin

Im Vorfeld der Entwicklung der Glykoalkaloid-Analytik wurden eine Nucleosil C18- (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) und eine Repronil-pur NH₂-Säule (Trentec Analystechnik, Gerlingen, Deutschland) unter identischen Bedingungen getestet. Zu Grunde gelegt wurde die Methode von Saito et al. [74]. Die dabei erhaltenen Chromatogramme zeigt Abbildung 6.12 im Anhang 6.1. Es wird deutlich, dass die Verwendung der Aminophase für die Glykoalkaloid-Analytik eine bessere Auflösung von α -Chaconin und α -Solanin erzielt. Ein Vorteil dieser aminofunktionalisierten Phase ist ihre Anwendbarkeit für Normal- und Umkehrphasen-Chromatographie, da sie in Wasserstoffbrücken-Bindungen sowohl als Protonenakzeptor wie auch als Protonendonator wirken kann [120]. Dieser Vorteil wird für die Glykoalkaloide, die eine gemischte Polarität besitzen (unpolarer steroidartiger Grundkörper und polare Zuckergruppen) erfolgreich zur Trennung ausgenutzt.

Im Verlauf der Entwicklung einer robusten HPLC-Analytik wurde die Methode von Saito et al. [74] modifiziert. Die Flußrate wurde erhöht, so dass eine kürzere Analysenzeit erreicht werden kann. Die Temperatur wurde von 30 auf 40 °C erhöht, um mit einem Säulenofen

ohne Gegenkühlung auch bei 30 °C Raumtemperatur konstant, d.h. ohne Überhitzung, arbeiten zu können. Es ergeben sich damit folgende Parameter für die verwendete HPLC-Analytik für α -Chaconin und α -Solanin:

Säule:	Reposil-pur NH ₂ , 5 μ m, 250 x 4 mm
Eluent A:	20 mM KH ₂ PO ₄ , pH 6
Eluent B:	Acetonitril
Temperatur:	40 °C
Detektion:	200 nm
Isokratisch:	25 % A und 75 % B
Flußrate:	1,3 ml/min
Injektionsvolumen:	20 μ l

Bei diesen Bedingungen hat α -Chaconin eine Retentionszeit von ca. 6,5 min und α -Solanin von ca. 12,2 min (siehe Abbildung 6.13).

HPLC-ELUTIONSREIHENFOLGE DER GLYKOALKALOIDE

Aus Abbildung 4.1 ist ersichtlich, dass α -Chaconin zeitlich vor α -Solanin von der HPLC-Phase eluiert. Diese Elutionsreihenfolge lässt sich durch die verschiedene Anzahl von freien OH-Gruppen in den Glykoalkaloid-Molekülen erklären. α -Chaconin enthält 8 freie OH-Gruppen, α -Solanin 9. α -Solanin besitzt somit eine höhere Polarität als α -Chaconin. Bei der verwendeten HPLC-Methode handelt es sich daher aufgrund der Elutionsreihenfolge um eine Normalphasen-Chromatographie, wobei das unpolare α -Chaconin vor dem polaren α -Solanin eluiert.

BERECHNUNG DER HPLC-KENNGRÖßEN

Aus einem HPLC-Chromatogramm lassen sich anhand von Kenngrößen verschiedene Angaben über die Güte der Trennung machen. Abbildung 4.1 zeigt ein HPLC-Chromatogramm von α -Chaconin und α -Solanin. Zusätzlich sind im Chromatogramm wichtige Kenngrößen eingetragen, die für die anschließenden Berechnungen verwendet werden.

Die Totzeit der Säule t_0 gibt die Zeit an, die die mobile Phase benötigt, um durch die Trennsäule zu wandern. Die Retentionszeit wird mit t_R bezeichnet. Es handelt sich dabei um die Zeit, die von der Injektion der Probe bis zur Registrierung des Peakmaximums verstreicht. Als Netto-Retentionszeit t'_R bezeichnet man die Differenz von Retentionszeit und Totzeit ($t'_R = t_R - t_0$). Die Basisbreite eines Peaks wird mit w bezeichnet. Sie wird durch die an den Wendepunkten des Peaks angelegten Tangenten ermittelt. Die Basisbreite ergibt sich durch die Schnittpunkte der Tangenten mit der Basislinie.

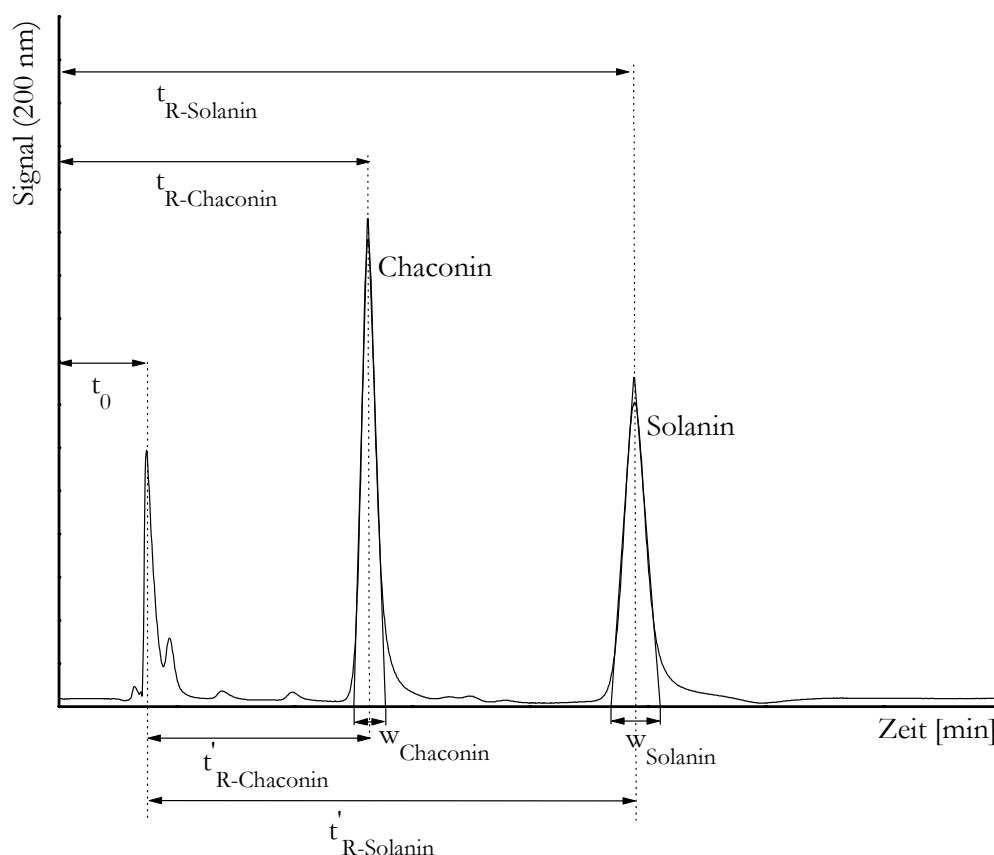


Abbildung 4.1 HPLC-Chromatogramm von α -Chaconin und α -Solanin (jeweils 0,25 mg/ml) und seine Kenngrößen

Für Abbildung 4.1 ergeben sich folgenden Kenngrößen:

t_0	= 1,85 min
$t_{R\text{-Chaconin}}$	= 6,55 min
$t_{R\text{-Solanin}}$	= 12,22 min
W_{Chaconin}	= 0,66 min
W_{Solanin}	= 1,07 min

Mit diesen Werten werden im folgenden verschiedene Berechnungen gemacht. Der Retentionsfaktor oder k-Wert ist eine Kenngröße für die Charakterisierung einer Substanz. k ist von der Säulenlänge und der Fließgeschwindigkeit der mobilen Phase unabhängig und stellt das Molverhältnis der Komponente in der stationären (n_{stat}) und mobilen (n_{mob}) Phase dar. Der Retentionsfaktor lässt sich ebenfalls über den Quotienten aus Netto-Retentionszeit und Totzeit berechnen.

Es ergibt sich damit:

$$k = \frac{n_{\text{stat}}}{n_{\text{mob}}} = \frac{t_{\text{R}}'}{t_0} = \frac{t_{\text{R}} - t_0}{t_0} \quad (\text{Gl. 4-1})$$

Für α -Chaconin erhält man somit: $k_{\text{Chaconin}} = \frac{6,55 \text{ min} - 1,85 \text{ min}}{1,85 \text{ min}} = 2,54$

Und für α -Solamin ergibt sich: $k_{\text{Solamin}} = \frac{12,22 \text{ min} - 1,85 \text{ min}}{1,85 \text{ min}} = 5,61$

Im Allgemeinen lässt sich sagen, dass Retentionsfaktoren zwischen 1,5 und 10 bei isokratischen Bedingungen optimal sind. Bei $k < 1,5$ ist die Wechselwirkung zwischen Substanz und stationärer Phase zu gering, bei sehr großen Werten für den Retentionsfaktor ($k > 10$) sind die Analysenzeiten zu lang, die Peaks zu breit oder es kommt zur Coelution von zwei Substanzen [121]. Zwei Komponenten einer Mischung werden nur dann getrennt, wenn sie sich in ihren k -Werten unterscheiden. Ein Maß dafür ist der Trennfaktor α .

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1} = \frac{k_{\text{Solamin}}}{k_{\text{Chaconin}}} = \frac{5,61}{2,54} = 2,21 \quad (\text{Gl. 4-2})$$

Bei $1 < \alpha < 5$ werden die beiden Komponenten optimal getrennt, $\alpha = 1$ wäre ein Maß dafür, dass die Komponenten nicht getrennt werden.

Als nächstes lässt sich die Auflösung R zweier benachbarter Peaks beschreiben. R ist definiert durch den Quotienten aus dem Abstand der beiden Peakmaxima, d.h. der Differenz der beiden Retentionszeiten t_{R} , und dem arithmetischen Mittel aus den beiden Basisbreiten w .

$$R = 2 \frac{t_{\text{R}2} - t_{\text{R}1}}{w_1 + w_2} = 2 \frac{t_{\text{R-Solamin}} - t_{\text{R-Chaconin}}}{w_{\text{Chaconin}} + w_{\text{Solamin}}} = 2 \frac{12,22 - 6,55}{0,66 + 1,07} = 6,55 \quad (\text{Gl. 4-3})$$

Eine Auflösung von $R = 1$ wäre für eine quantitative Trennung zu gering. Eine gute Basislinientrennung, beginnt ab ca. $R = 1,5$.

Letztlich lässt sich aus den Kenngrößen aus Abbildung 4.1 die Trennstufen- oder Bodenzahl N der Säule berechnen.

$$N = 16 \left(\frac{t_{\text{R}}}{w} \right)^2 \quad (\text{Gl. 4-4})$$

Da die Peaks aus Abbildung 4.1 keine Gauß-Form besitzen, liefert diese Gleichung keine korrekten Werte. Bei asymmetrischen Peaks, d.h. bei Peaks mit Tailing müsste für eine korrekte Berechnung der Bodenzahl die Momentenmethode verwendet werden [120]. Darauf soll hier allerdings verzichtet werden, da dies den Rahmen dieser Arbeit übersteigen würde.

KALIBRATION

Die Kalibration für α -Chaconin und α -Solanin ist im Bereich von 0,005 bis 0,25 mg/ml linear. Das Bestimmtheitsmaß R^2 für die lineare Regression ist sowohl für α -Chaconin als auch für α -Solanin 0,99. Für die Kalibration wurden Doppelbestimmungen aller Standard-Konzentrationen durchgeführt. Der mittlere Fehler der Einzelinjektionen wurde mit $1,6 \pm 0,8 \%$ für α -Chaconin und $1,8 \pm 0,9 \%$ für α -Solanin bestimmt. Der mittlere Fehler zwischen verschiedenen Kalibrationsserien ($n = 16$) berechnet sich zu 6,5 % für α -Chaconin und 6,2 % für α -Solanin.

Wenn nicht anders angegeben, werden alle HPLC-Injektionen in Doppelbestimmung durchgeführt.

4.2 Extraktionsmethode

Bereits in Kapitel 2.3.7 gibt Tabelle 2.5 eine Übersicht über die in der Literatur gängigen Extraktionsverfahren für Glykoalkaloide. Daraus geht hervor, dass die Extraktionen nahezu ausschließlich in nicht-wässrigen und/oder sauren Lösungsmitteln durchgeführt werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die essigsäure Extraktionsmethode nach Hellenäs et al. [72] (siehe auch linker Teil Abbildung 4.2) verwendet. Zum Vergleich wurde, basierend auf der großtechnischen Abtrennung der Glykoalkaloide bei der Emsland-Stärke GmbH, eine salzsaure Hitze-Extraktion getestet (siehe auch rechter Teil Abbildung 4.2).

Während der Bearbeitung der in Abbildung 4.2 dargestellten Strategien stellte sich schnell heraus, dass die salzsaure Hitze-Extraktion im Hinblick auf die gestellten Bedingungen, wie parallele Bearbeitung mehrerer Proben und schnelle Durchführbarkeit mit geringem apparativen Aufwand, nicht bestehen könnte. Dies ist zum einen durch die länger Extraktionszeit, zum anderen durch den aufwendigeren Versuchsaufbau mit Rundkolben, Rückflußkühler und Ölbad zurückzuführen. Dennoch wurden für einige Proben sowohl eine essigsäure Extraktion mit sich anschließender Homogenisation für 2 min als auch eine 2-stündige salzsaure Hitze-Extraktion zu Vergleichszwecken durchgeführt. Unter Verwendung der in Kapitel 4.3 beschriebenen SPE-Methode wurde die Aufarbeitung der erhaltenen Extrakte durchgeführt. Die HPLC-Analytik wurde wie in Kapitel 4.1 beschrieben angewendet.

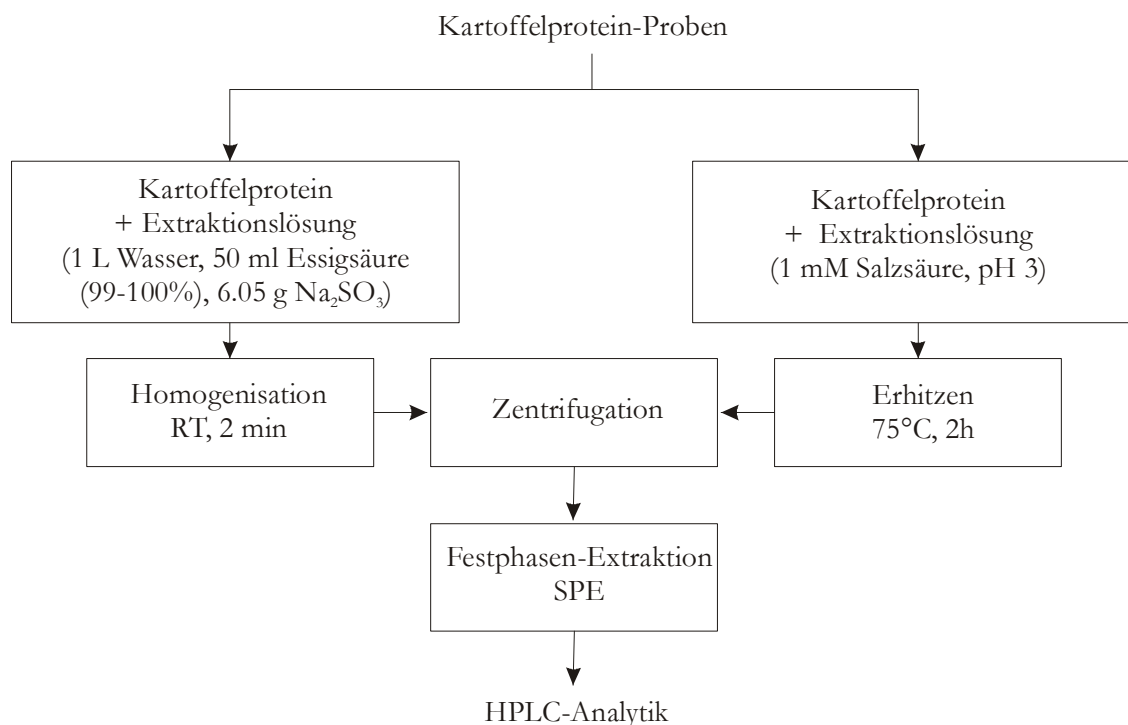


Abbildung 4.2 Flussdiagramm: Darstellung der beiden Strategien zur Extraktion der Glykoalkaloide aus den Kartoffelprotein-Proben

Während dieses Vergleichs der beiden Extraktionsmethoden wurde die Wiederfindung von α -Chaconin und α -Solanin unter identischen Bedingungen getestet. Sowohl unter den Homogenisations- als auch unter den Hitze-Extraktions-Bedingungen konnte eine gute Wiederfindung (ca. 90-100 %) von α -Chaconin und α -Solanin erreicht werden. Probleme hingegen traten bei der Auswertung der HPLC-Chromatogramme von den salzsauren Extrakten auf. Es konnte aufgrund des unterschiedlichen Retentionsverhaltens und der schlechten Peakform keine Auswertung vorgenommen werden. Ebenso war die Glykoalkaloid-Ausbeute, soweit zu beurteilen, bei der salzsauren Hitzeextraktion wesentlich schlechter als bei der essigsäuren Extraktion. Letzterer wurde aus den genannten Gründen und wegen der schnelleren Durchführbarkeit der Vorzug gegeben. Alle weiteren Versuche wurden demnach nur noch mit der essigsäuren Extraktion durchgeführt.

4.3 Entwicklung einer SPE-Methode

Zunächst wurden drei verschiedene Sorbens-Materialien auf ihre Eignung zur Aufreinigung von Glykoalkaloiden getestet. Ein klassisches RP-Material (C18, Phenomenex, Aschaffenburg, Deutschland) und zwei Polymermaterialien Strata X (Phenomenex, Aschaffenburg, Deutschland) und Oasis HLB (Waters GmbH, Eschborn, Deutschland) kamen zur Anwendung (physikalische Parameter siehe Kapitel 6.4, Tabelle 6.7). Es wurde eine Standard-Methode zur Aufreinigung mit SPE-Kartuschen verwendet. Abbildung 4.3 zeigt die dabei anfallenden Arbeitsschritte. Zu Beginn wird das Kartuschen-Sorbens mit Methanol befeuchtet, dadurch wird das Material für den Gebrauch aktiviert, man spricht vom

Konditionieren. Als zweites muss das Sorbens-Material mit Wasser äquilibriert werden, um ein Durchfließen ohne Binden des wässrigen Probenmaterials zu verhindern. Anschließend wird die Probe aufgegeben und als letztes wird mit Methanol eluiert. Für alle beschriebenen SPE-Schritte wird 1 ml Volumen verwendet.

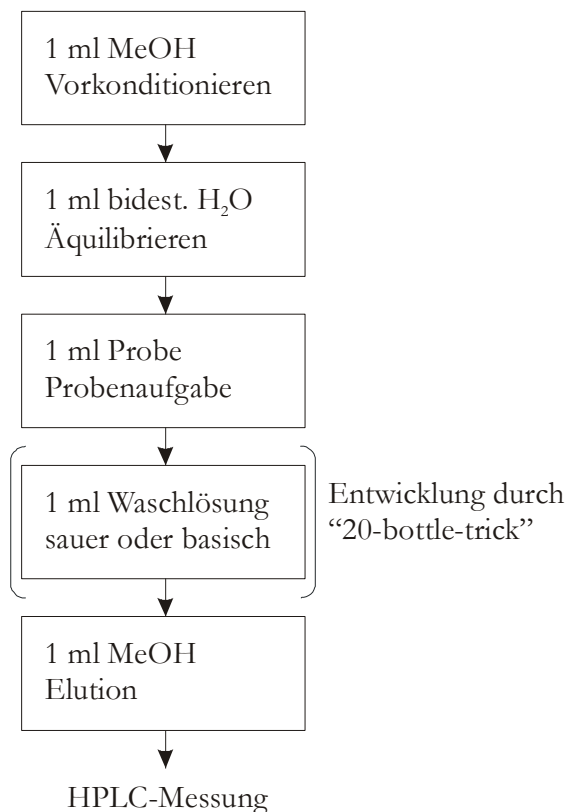


Abbildung 4.3 Flussdiagramm: Standard-Methode für SPE-Aufreinigungen

Für die Auswahl eines SPE-Materials ist vor allem eine reproduzierbare SPE-Aufreinigung mit hohen Wiederfindungsraten als wichtiges Kriterium zu nennen. Zur Beurteilung der drei oben genannten Sorbens-Materialien wurden zwei verschiedene Standard-Konzentrationen von einem Gemisch aus α -Chaconin und α -Solaniin als Probe aufgegeben. Verfahren wurde nach der in Abbildung 4.3 dargestellten SPE-Standard-Methode. Die erhaltenen Eluate wurden der HPLC-Analyse unterzogen und die Wiederfindung bezogen auf die eingesetzten Konzentrationen berechnet. Die dabei erhaltenen Wiederfindungsraten enthält Tabelle 4.1.

Tabelle 4.1 Wiederfindung von zwei Standardkonzentrationen (0,1 und 0,25 mg/ml) von α -Chaconin und α -Solanin bei Verwendung von verschiedenen Kartuschenmaterialien

Standard-Konzentration [mg/ml]	Standard-Konzentration [mg/ml]	Wiederfindung α -Chaconin [%]	Wiederfindung α -Solanin [%]
C18 (Phenomenex)	0,1	21,0	13,0
	0,25	37,6	31,6
Strata X (Phenomenex)	0,1	86,0	76,0
	0,25	81,2	75,6
Oasis HLB (Waters)	0,1	83,0	80,0
	0,25	75,6	72,0

Das C18-Material eignet sich aufgrund der schlechten Wiederfindungsraten zwischen 13 und 37,6 % nicht für die Aufreinigung von Glykoalkaloiden. Es ist ein SPE-Material, das für hydrophobe Substanzen, die nach dem RP-Mechanismus aufgereinigt werden können, verwendet wird. Die schlechten Wiederfindungsraten lassen sich anhand der Strukturformel der Glykoalkaloide erklären: Neben dem hydrophoben Steroid-Rest enthält das Molekül die hydrophilen Zucker-Reste. Dieses gemischte hydrophobe-hydrophile Molekül lässt sich nicht mit einem klassischen RP-Material aufreinigen.

Das Strata X-Material liefert hingegen gute Wiederfindungsraten von 75,6 bis 86 %. Ebenso verhält es sich mit dem Oasis HLB-Material. Die Wiederfindungsraten liegen zwischen 72 und 83 %. Beide Materialien haben zusätzlich den Vorteil, dass ein „Trockenlaufen“ nicht zu Sensitivitäts- oder Wiederfindungsverlust führt.

Wenn auch diese SPE-Standard-Methode sehr gut für die kommerziellen Standard-Glykoalkaloide anwendbar ist, weist sie hingegen bei Kartoffelprotein-Proben deutliche Defizite auf. Die HPLC-Auswertungen werden durch zahlreiche Störpeaks und schlechte Peakform beeinträchtigt. Für eine zuverlässige und vor allem quantitative Auswertung war es daher nötig, diese Störkomponenten zu minimieren. Die Entscheidung zu Gunsten des Oasis-HLB-Kartuschenmaterial ist daher unter diesem Kriterium gefallen. Für die Kartuschen existiert eine bereits vielfach erfolgreich angewendete SPE-Methoden-Entwicklungsstrategie zur Modifikation des Waschschrilles, der „20-bottle-trick“.

4.3.1 „20-bottle-trick“

Die Glykoalkaloide liegen in den Kartoffelprotein-Proben nur im ppm-Bereich vor, demzufolge ist es enorm wichtig, Komponenten, die die HPLC-Analytik stören, vorher abzutrennen. Für diese Abtrennung wurde das Elutionsverhalten von α -Chaconin und α -Solanin vom Sorbens-Material getestet.

Im allgemeinen hängt das Elutionsverhalten vom pH-Wert und von der Konzentration der organischen Komponente ab. Eine Erhöhung der organischen Konzentration verringert die

Retention des Analyten. Ein pH-Wert-Wechsel führt je nach Komponente zu unterschiedlichem Retentionsverhalten der Analyten. Basische Analyten werden vorzugsweise bei hohem pH-Wert auf dem Sorbens-Material festgehalten, saure Analyten bei niedrigem pH-Wert. Für die Entwicklung effizienter Waschschriffe für die SPE-Methode müssen sowohl der pH-Wert als auch die Konzentration der organischen Komponenten optimiert werden.

Basierend auf dieser Theorie wurde der Elutionstest mit Methanol als organischem Lösungsmittel in Kombination mit 1 mM Salzsäure als saure und 0,5 % Ammoniumhydroxid als basische Komponenten durchgeführt. Das Elutionsverhalten von bekannten, definierten Standard-Konzentrationen von α -Chaconin und α -Solanin wurde mit einem stufenweisen Methanol-Gradient getestet. Jede aufeinanderfolgende Stufe erhöht die Methanol-Konzentration um 10 %. Der Gradient beginnt sowohl bei der sauer modifizierten Elution als auch bei der basisch modifizierten Elution bei 0 und endet bei 90 % Methanol. Dieser Elutionstest wird auch als „20-bottle-trick“ bezeichnet (siehe Abbildung 4.4).

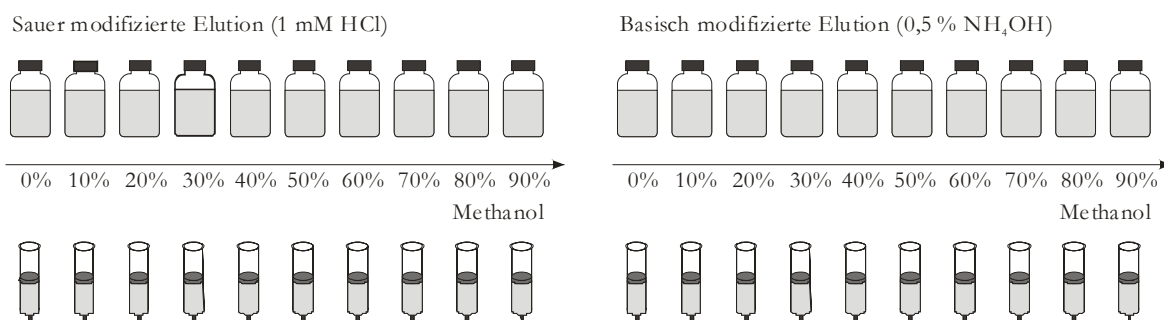


Abbildung 4.4 „20-bottle-trick“: Sauer (1 mM HCl) und basisch (0,5 % NH_4OH) modifizierte Elution zur Bestimmung des Elutionsverhalten von α -Chaconin und α -Solanin

Die sauren und basischen Eluate wurden für die HPLC-Messungen auf pH-Werte zwischen 3 und 6 gebracht. Zusätzlich wurde eine Elution der Standard-Konzentration mit 100 % Methanol durchgeführt. Die Konzentration von α -Chaconin und α -Solanin in den Eluaten wurde mittels HPLC bestimmt. Daraus wurden die Wiederfindungen von α -Chaconin und α -Solanin bezogen auf die eingesetzten Konzentrationen berechnet. Der „20-bottle-trick“ wurde in Doppelbestimmung durchgeführt, in der Abbildung 4.5 und Abbildung 4.6 sind entsprechend die Fehlerbalken eingetragen. Abbildung 4.5 zeigt die Wiederfindung von α -Chaconin und α -Solanin bei sauer modifizierten Elution.

Es lässt sich erkennen, dass die Elution der Analyten bereits bei einer Methanol-Konzentration von 20 % beginnt. Für einen sauer modifizierten Waschschrift muss demnach die Methanol-Konzentration unter 20 % liegen, um keinen Verlust des Analyten durch den Waschschrift zu erleiden. Unter Berücksichtigung eines gewissen Sicherheitsspielraums wurde ein saurer Waschschrift mit 0 % Methanol festgelegt.

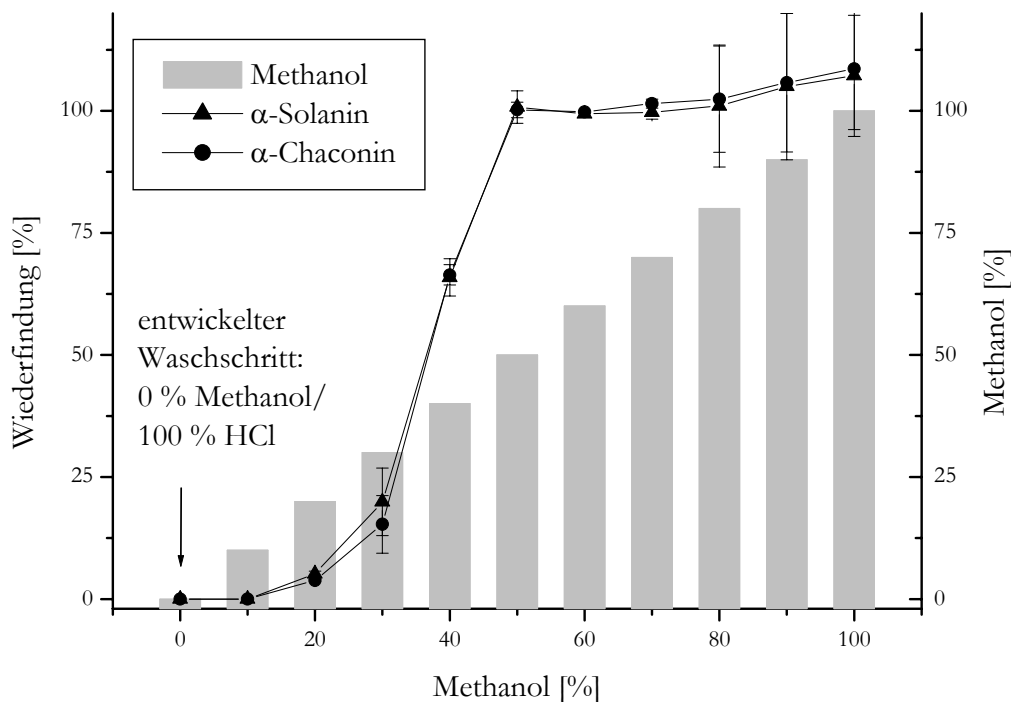


Abbildung 4.5 Wiederfindung von α -Chaconin und α -Solanin bei sauer modifizierter Elution; Kartusche: Oasis HLB 60 mg; Mittelwerte mit Standardabweichung; n = 2; nach Alt [122]

Die Wiederfindungen von α -Chaconin und α -Solanin bei dem basisch modifizierten Elutionstest sind in Abbildung 4.6 dargestellt.

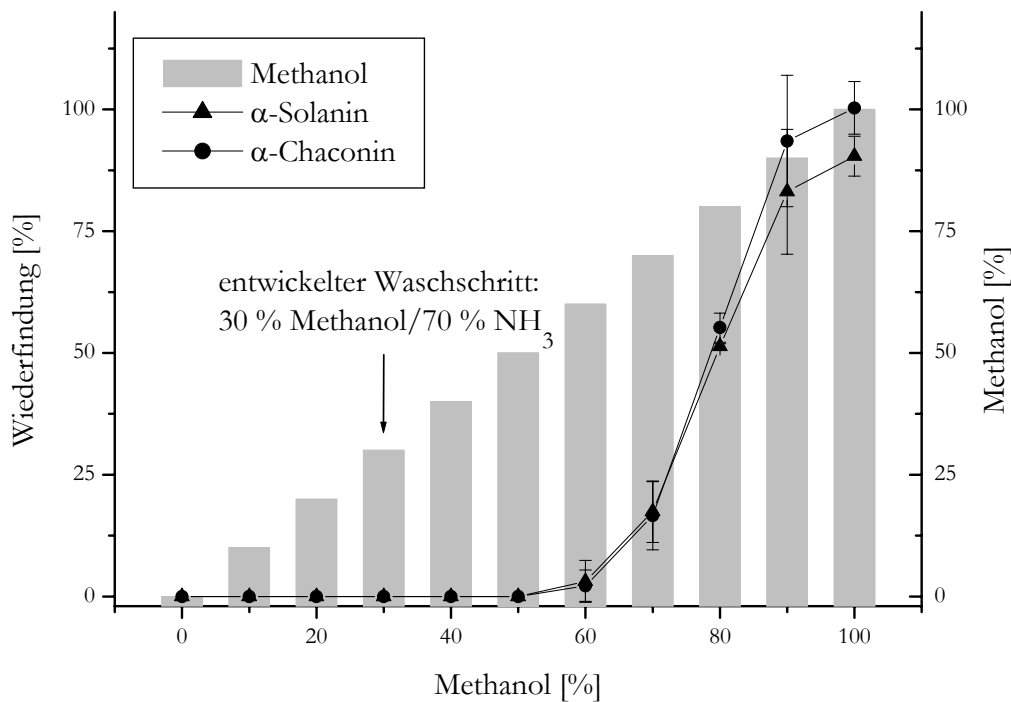


Abbildung 4.6 Wiederfindung von α -Chaconin und α -Solanin bei basisch modifizierter Elution; Kartusche: Oasis HLB 60 mg; Mittelwerte mit Standardabweichung; n = 2; nach Alt [122]

Die Elution der Analyten von dem Sorbens-Material setzt bei 60 % Methanol ein. Folglich muss ein basisch modifizierter Waschschrift unterhalb von 60 % Methanol erfolgen. Auch hier wird ein gewisser Sicherheitsspielraum eingehalten, so dass der basisch modifizierte Waschschrift mit 30 % Methanol festgesetzt wird.

Zusätzlich zur Entwicklung des sauren und des basisch modifizierten Waschschriftes kann auch noch eine Kombination der beiden Waschschriftre herausgearbeitet werden. Dazu beginnt man nach der Probenaufgabe mit dem sauren Waschschrift (0 % Methanol/100 % HCl). Daraufhin wird der pH-Wert variiert, indem man die Kartusche mit 0 % Methanol/100 % NH₄OH wäscht. Anschließend wendet man den basisch modifizierten (30 % Methanol/70 % NH₄OH) Waschschrift an. Abbildung 4.7 gibt eine Zusammenfassung der aus dem „20-bottle-trick“ entwickelten drei möglichen Waschschriftre.

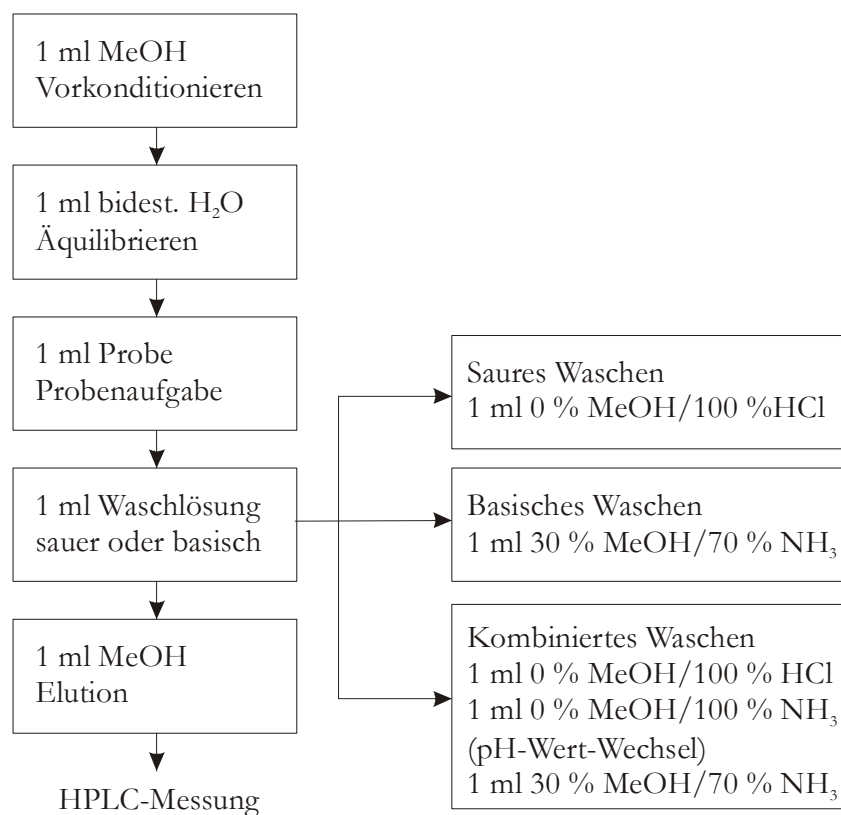


Abbildung 4.7 Flussdiagramm: Schema zur Entwicklung drei verschiedener Waschschriftre für die Aufreinigung von α -Chaconin und α -Solanin aus Kartoffelprotein-Proben; Ergebnis des „20-bottle-trick“

4.3.2 Vergleich der verschiedenen Waschschrirte

Die drei aus dem „20-bottle-trick“ entwickelten Waschschrirte wurden anschließend für die SPE-Aufreinigung von essigsaurer Extrakten aus Kartoffelprotein-Proben angewendet. Abbildung 4.8 zeigt Chromatogramme einer Probe, die mit den drei entwickelten Waschschrirten für SPE aufgearbeitet wurden. Zusätzlich sind ein Chromatogramm einer SPE-Aufreinigung ohne Waschschrirte und eine Standardkonzentration von α -Chaconin und α -Solanin gezeigt.

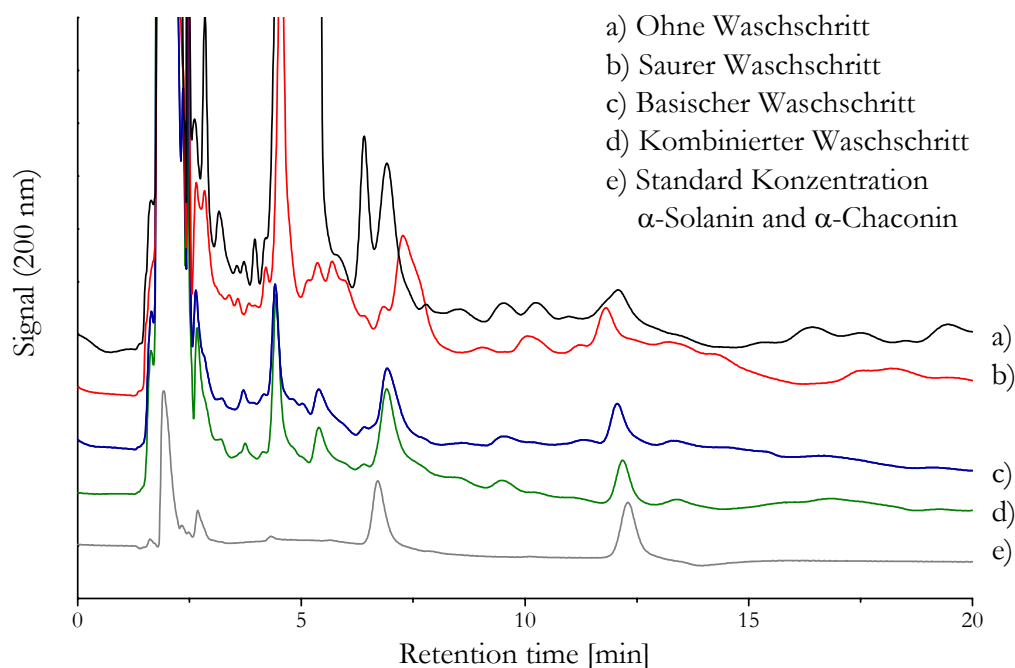


Abbildung 4.8 HPLC-Chromatogramme von 1 Probe, die durch verschiedene Waschschrirte für SPE aufgereinigt wurde; Säule: Reprosil-pur NH_2 (5 μm , 250 x 4 mm); Temperatur: 40 °C; Injektionsvolumen: 20 μl ; Eluenten: 25 % A: 20 mM KH_2PO_4 , pH 6, 75 % B: ACN; nach Alt [122]

Vergleicht man die Chromatogramme miteinander, erkennt man, dass bei dem basischen und kombinierten Waschschrirte deutlich weniger Basislinienschwankungen und Störpeaks auftreten. Hinzu kommt, dass die Peaksymmetrie und –form deutlich verbessert worden sind. Bei den Chromatogrammen hingegen, die ohne und mit saurem Waschschrirte erstellt wurden, ist die Zuordnung der Peaks zu den Standardsubstanzen sowohl durch die leicht veränderte Retentionszeit als auch durch die Peakaufspaltung erschwert. Ein quantitativer Vergleich zwischen den entwickelten Waschschrirten ist nur schwer möglich, da sowohl die ohne Waschen als auch die mit saurem Waschen erhaltenen Chromatogramme aufgrund von Peakunförmigkeiten und –verschiebungen nicht auswertbar sind.

Der basische und kombinierte Waschschrift unterscheiden sich nur geringfügig. Für alle weiteren SPE-Aufreinigungen wurde der kombinierte Waschschrift für die SPE-Aufreinigungen verwendet.

4.3.3 Wiederfindungsraten

Die Qualität der entwickelten SPE-Methode mit kombiniertem Waschschrift wurde hinsichtlich der Wiederfindungen von α -Chaconin- und α -Solanin-Standard-Konzentrationen getestet. Dazu wurden zunächst zwei Konzentrationen von α -Chaconin und α -Solanin unter Verwendung des kombinierten Waschschrifts aufgereinigt. Die Konzentration von α -Chaconin und α -Solanin in den Eluaten wurde mittels HPLC bestimmt. Daraus wurden bezogen auf die eingesetzten Konzentrationen die Wiederfindungen von α -Chaconin und α -Solanin berechnet. Die dabei erhaltenen Wiederfindungsraten sind in Tabelle 4.2 zusammengefasst.

Tabelle 4.2 Wiederfindungsraten von α -Chaconin und α -Solanin nach kombiniertem Waschen bei der SPE-Aufreinigung

Substanzen	Standard-Konzentration [mg/ml]	Wiederfindung α -Chaconin [%]	Wiederfindung α -Solanin [%]
α -Solanin	0,05		92,3
	0,1		84,3
α -Chaconin	0,05	92,7	
	0,1	92,9	
α -Chaconin +	0,05	88,0	89,1
α -Solanin	0,1	91,8	92,4

Die Wiederfindungsraten liegen zwischen 84,3 und 92,9 %. Unter Berücksichtigung, dass sich der gesamte Prozess zur Erlangung der Ergebnisse in die Extraktion, die SPE-Aufreinigung und HPLC-Analytik unterteilt und jeder einzelne Schritt seinerseits fehlerbehaftet ist, sind die erzielten Wiederfindungsraten in einem guten Bereich.

Zusätzlich wurden die Wiederfindungsraten von α -Chaconin- und α -Solanin-Standard-Konzentrationen nach Homogenisation in der Probenmatrix der Kartoffelproteine untersucht. Die dabei verwendeten Probenlösungen wurden gemäß Tabelle 6.4 und Tabelle 6.5 im Anhang 6.2.9 hergestellt. Die SPE-Aufreinigung wurde mit kombiniertem Waschen durchgeführt. Die Konzentration von α -Chaconin und α -Solanin in den Eluaten wurde mittels HPLC bestimmt. Daraus wurden bezogen auf die eingesetzten Konzentrationen die Wiederfindungen von α -Chaconin und α -Solanin berechnet.

Die bereits in der Probenmatrix vorliegenden Konzentrationen von α -Chaconin und α -Solanin wurden separat bestimmt und von den erhaltenen Wiederfindungen gemäß ihrer Konzentration in der Gesamt-Mischung subtrahiert. Tabelle 4.3 zeigt die erhaltenen Ergebnisse.

Tabelle 4.3 Wiederfindungsraten von α -Chaconin und α -Solanin nach Homogenisation in der Probenmatrix und kombiniertem Waschen bei der SPE-Aufreinigung

Substanzen	Standard-Konzentration [mg/ml]	Wiederfindung α -Chaconin [%]	Wiederfindung α -Solanin [%]
α -Solanin	0,05		76,1
	0,1		75,8
α -Chaconin	0,05	95,8	
	0,1	85,1	
α -Chaconin + α -Solanin	0,05	86,1	93,1
	0,1	91,3	86,0

Auch hier liegen die Wiederfindungen für α -Chaconin und für die Mischung von α -Chaconin und α -Solanin mit Werten zwischen 85,1 und 95,8 % in einem guten Bereich. Etwas geringere Wiederfindungsraten erhält man hingegen bei α -Solanin mit 75,8 und 76,1 %. Als Ursache dafür kommt eine etwas zu hoch bestimmte α -Solanin-Konzentration in der Probenmatrix in Frage, die dann bei der Berechnung der Wiederfindung durch Differenzbildung bei α -Solanin einen größeren Fehler erzeugt. In der Mischung aus α -Chaconin und α -Solanin wirkt sich der Fehler weit weniger aus. Dies liegt an der Herstellung der Probenlösung, die bei der Mischung aus α -Chaconin und α -Solanin weniger Probenmatrix enthält als bei α -Solanin allein (siehe Anhang 6.2.9).

4.3.4 Optimierung der Nachweisgrenze

Die Grenze für die quantitative Auswertung der verwendeten HPLC-Methode liegt bei je 5 μ g/ml für α -Chaconin und α -Solanin. Für die gesamte Glykoalkaloid-Extraktion wird 1 g Kartoffelprotein in 20 ml Extraktionslösung suspendiert. Davon wird ein Aliquot von 1 ml als Probenvolumen für SPE-Aufreinigung verwendet. Die SPE-Methode liefert 1 ml Eluat, das mittels HPLC-Messung quantifiziert wird. Daraus ergibt sich die untere Nachweisgrenze zu jeweils 100 ppm ($5 \mu\text{g/ml} \cdot 20 \text{ ml} = 100 \mu\text{g}$; bezogen auf 1 g Probe \rightarrow 100 ppm) für α -Chaconin und α -Solanin.

Für die Detektion von geringeren Konzentrationen in den Kartoffelprotein-Proben wurde das Probenvolumen für die SPE-Aufreinigung auf 5 ml erhöht. Das Volumen für die Elution wurde bei 1 ml konstant gehalten, wodurch es zu einer Aufkonzentrierung des Analyten bei der SPE-Aufreinigung kommt. Zusätzlich wurde eine zweite Elution durchgeführt, um bei

höheren Glykoalkaloid-Konzentrationen eine vollständige Desorption zu gewährleisten. Die beiden Eluate wurden getrennt voneinander analysiert und die jeweiligen Ergebnisse addiert. Die Konzentration in dem zweiten Eluat war deutlich geringer oder sogar null. Durch diese Erhöhung des Probenvolumens für die SPE-Aufreinigung konnte die geringste quantifizierbare Konzentration auf jeweils 20 ppm ($5 \mu\text{g}/\text{ml} * 4 \text{ ml} = 20 \mu\text{g}$; bezogen auf 1 g Probe \rightarrow 20 ppm) für α -Chaconin und α -Solanin gesenkt werden. Dies gilt für den Fall, dass das zweite Eluat keine Glykoalkaloide mehr enthält. Im anderen Fall senkt sich die niedrigste detektierbare Konzentration lediglich auf 40 ppm (2 Eluate je à 20 ppm). Ein graphische Darstellung dieser optimierten Nachweisgrenze zeigt Abbildung 4.9.

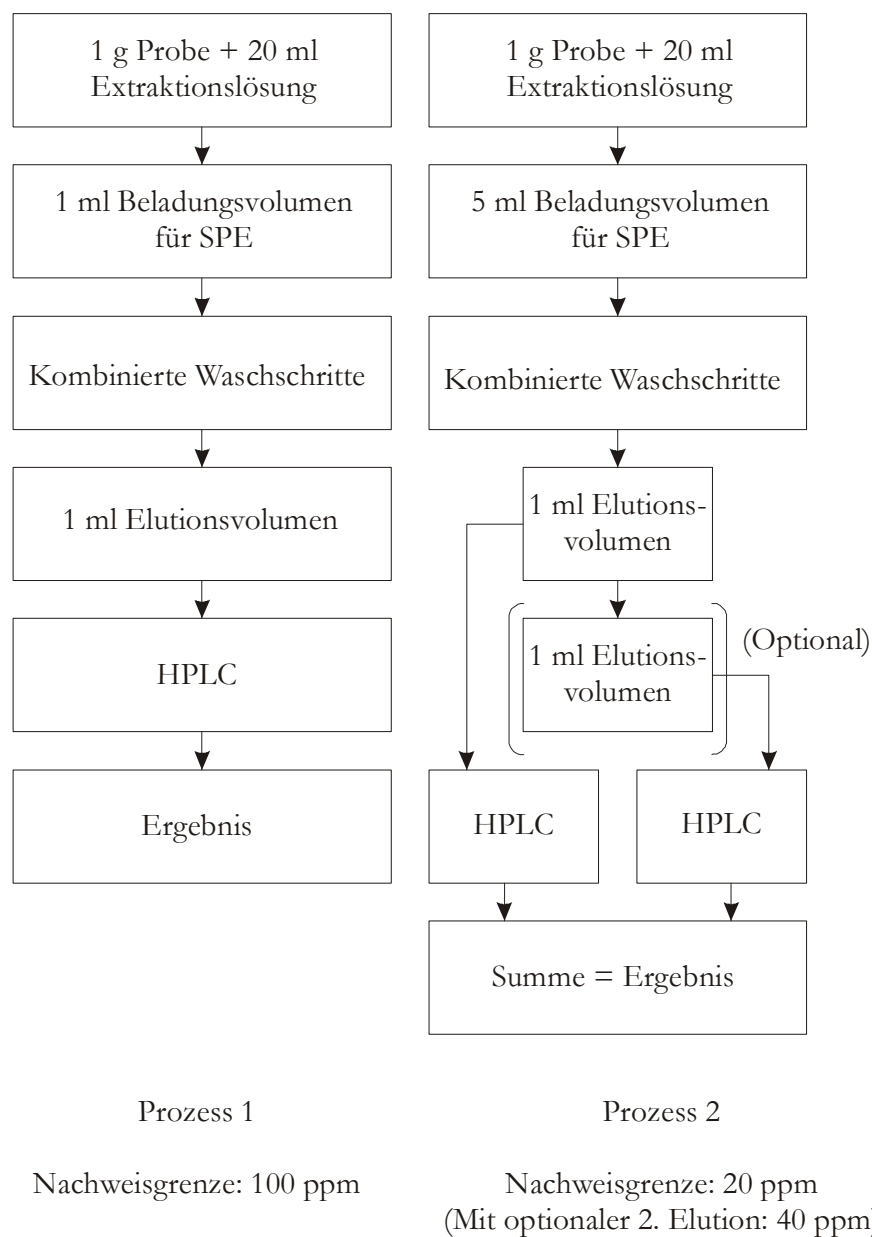


Abbildung 4.9 Flussdiagramm: Vergleich von 2 Prozessen zur Extraktion, Aufreinigung und Analytik von Glykoalkaloiden; nach Alt [122]

Die Verwendung von 10 ml Probe für die SPE-Aufreinigung ist ebenfalls durchführbar und führt zu einer unteren Quantifizierungsgrenze von 10 ppm (optional: 20 ppm). Allerdings wurde bei größeren Probenvolumina das „Handling“ der SPE-Aufreinigung mit Kartuschen, die lediglich ein Volumen von 3 ml aufweisen, mehr und mehr unpraktikabel.

4.4 Glykoalkaloid-Bestimmungen in verschiedenen Proben

Die untersuchten Kartoffelprotein-Proben der Emsland-Stärke GmbH, die für Lebensmittelprodukte verwendet werden sollen, wiesen Glykoalkaloid-Konzentrationen von 20 bis ca. 400 ppm auf. Proben mit Futtermittelqualität enthielten Glykoalkaloid-Konzentrationen bis zu 1700 ppm.

VERHÄLTNIS VON α -SOLANIN ZU α -CHACONIN

Aus Kapitel 2.3.1 ist bekannt, dass α -Chaconin und α -Solanin im Verhältnis 3:2 vorliegen. Trägt man die α -Chaconin- gegen die α -Solanin-Konzentration von 19 Kartoffelprotein-Proben (20 bis ca. 400 ppm) auf, erhält man die Darstellung in Abbildung 4.10.

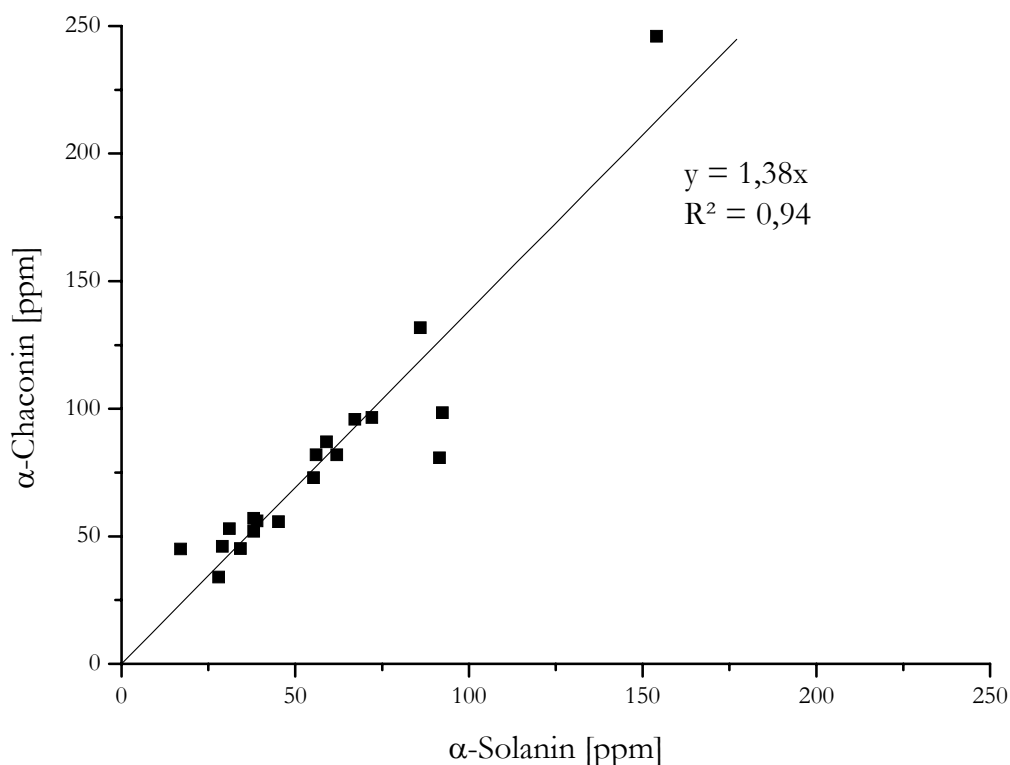


Abbildung 4.10 Verhältnis von α -Chaconin zu α -Solanin in 19 Kartoffelprotein-Proben von der Emsland-Stärke GmbH; lineare Regression ergibt Geradengleichung und Bestimmtheitsmaß R^2

Anhand der linearen Regression ergibt sich ein Verhältnis von α -Chaconin zu α -Solanin in den 19 untersuchten Kartoffelprotein-Proben von 1,38:1. Dies stimmt sehr gut mit dem in der Literatur [40, 41] enthaltenen Wert (3:2) überein.

VERGLEICH VON MESSERGEBNISSEN MIT DATEN EINES AUFTRAGSLABORS (AL)

Zur Überprüfung der Messergebnisse (TCI) wurden die Kartoffelprotein-Proben zur Glykoalkaloid-Bestimmung in ein Auftragslabor (AL) gegeben. Abbildung 4.11 zeigt den Vergleich von denen im TCI gemessenen Werten mit denen des Auftragslabors.

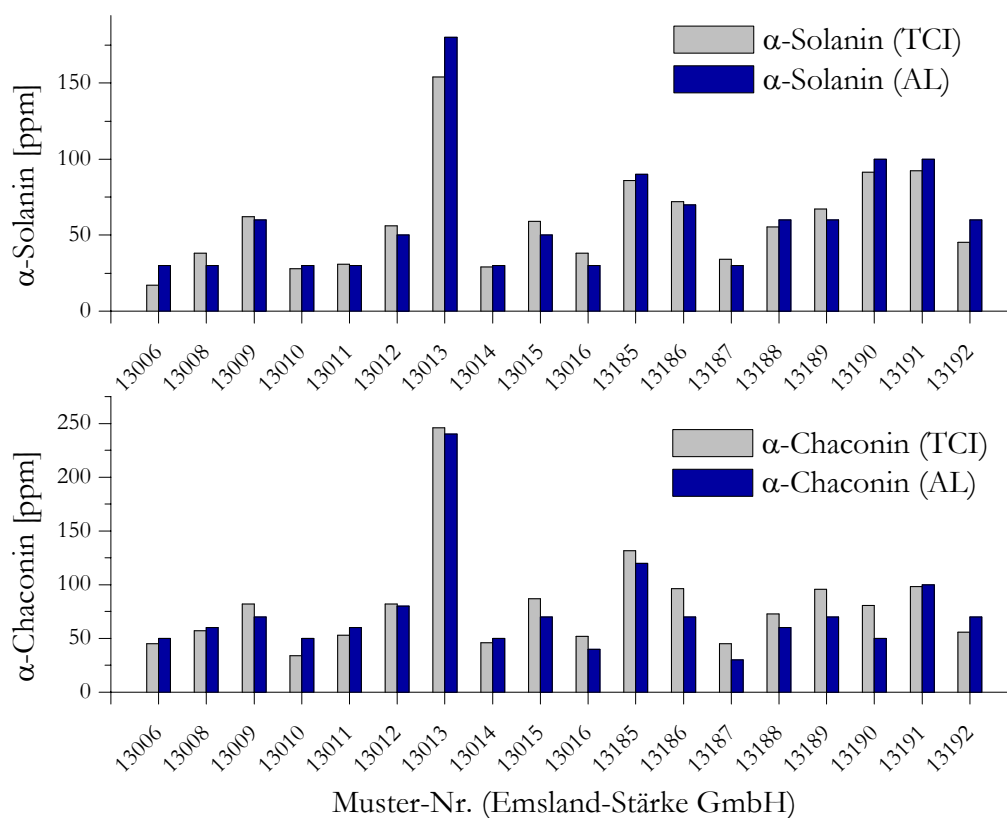


Abbildung 4.11 Vergleich der α -Chaconin- und α -Solaninkonzentrationen (TCI) in 19 Kartoffelprotein-Proben von der Emsland-Stärke GmbH mit den Werten eines Auftragslabors (AL)

Abbildung 4.11 zeigt eine gute Übereinstimmung der α -Chaconin- und α -Solaninkonzentrationen mit den Daten des Auftragslabors. Der mittlere Fehler über alle Einzelabweichungen beträgt 12,4 ppm für α -Chaconin und 7,2 ppm für α -Solanin. Dies ist im Rahmen der möglichen Fehlerquellen (Extraktion, SPE, HPLC) ein sehr gutes Ergebnis. Die Meßmethode des Auftragslabors ist nicht ausreichend bekannt, um mögliche Fehlerquellen oder Messungenauigkeiten auf dieser Seite zu suchen.

KOMMERZIELL ERHÄLTICHE PRODUKTE AUS KARTOFFELN

Auf dem deutschen Markt sind bereits Protein-Produkte aus Kartoffeln verfügbar. Dazu zählt das hier verwendete Produkt zur Unterstützung des Muskelaufbaus (Perfect Mass Caps, Powerstar Food, Hamburg, Deutschland). Der amerikanische Markt bietet bereits proteinhaltige Diät-Produkte (Appetitzügler), die aus Kartoffeln hergestellt worden sind.

Tabelle 4.4 gibt die α -Chaconin- und α -Solanin-Konzentrationen in diesen kommerziell erhältlichen Proben wieder.

Tabelle 4.4 Glykoalkaloid-Konzentrationen von kommerziell erhältliche Proben aus Kartoffeln¹

Proben	α -Chaconin [ppm = $\mu\text{g/g}$]	α -Solanin [ppm = $\mu\text{g/g}$]
Appetitzügler	2064,1 \pm 2,9 %	2712,45 \pm 2,9 %
Muskelaufbaupräparat	211,3 \pm 3,9 %	364 \pm 2,1 %

¹Die Ergebnisse sind Mittelwerte mit Standardabweichung, n = 2.

Die Toxizität der Glykoalkaloid-Konzentration beginnt für den Menschen bei 1 mg/kg Körpergewicht. Sowohl das Muskelaufbaupräparat als auch der Appetitzügler liegen bei Verzehr von lediglich einigen wenigen Kapseln (je ca. 0,5 g) noch deutlich unterhalb der Toxizitätsgrenze. Dennoch sind die Glykoalkaloid-Konzentrationen für den Nahrungsmittelbereich bemerkenswert hoch, wenn man die Werte mit den empfohlenen Sicherheitsrichtlinien von ca. 60-70 ppm vergleicht.

4.5 Bestimmung von β -Chaconin

Die für die Kartoffelprotein-Proben entwickelte Glykoalkaloid-Methode wurde im Verlauf dieser Arbeit auch für das Kartoffelfruchtwasser und andere flüssige Proben angewendet. Insbesondere bei diesen flüssigen Proben ist auffällig, dass neben den beiden Peaks für α -Chaconin und α -Solanin zwei unbekannte Peaks (gekennzeichnet mit x und y) auftreten (siehe Abbildung 4.12).

Die beiden unbekanntenen Peaks haben eine Retentionszeit von 4,5 und 8,3 min. Zur weiteren Analyse wurden die beiden Fraktionen durch sechsfaches Fraktionieren gesammelt und die vereinten Fraktionen lyophilisiert. Für die MALDI-Messungen wurden die lyophilisierten Proben über mit C18-Material gefüllten Ziptips entsalzt und aufkonzentriert. Die dafür verwendete Arbeitsvorschrift ist im Anhang 6.2.1 dargestellt. Die Proben wurden auf einem MALDI-Slide nach der „Dried-droplet-Methode“ aufgetragen (siehe Kapitel 3.1.3).

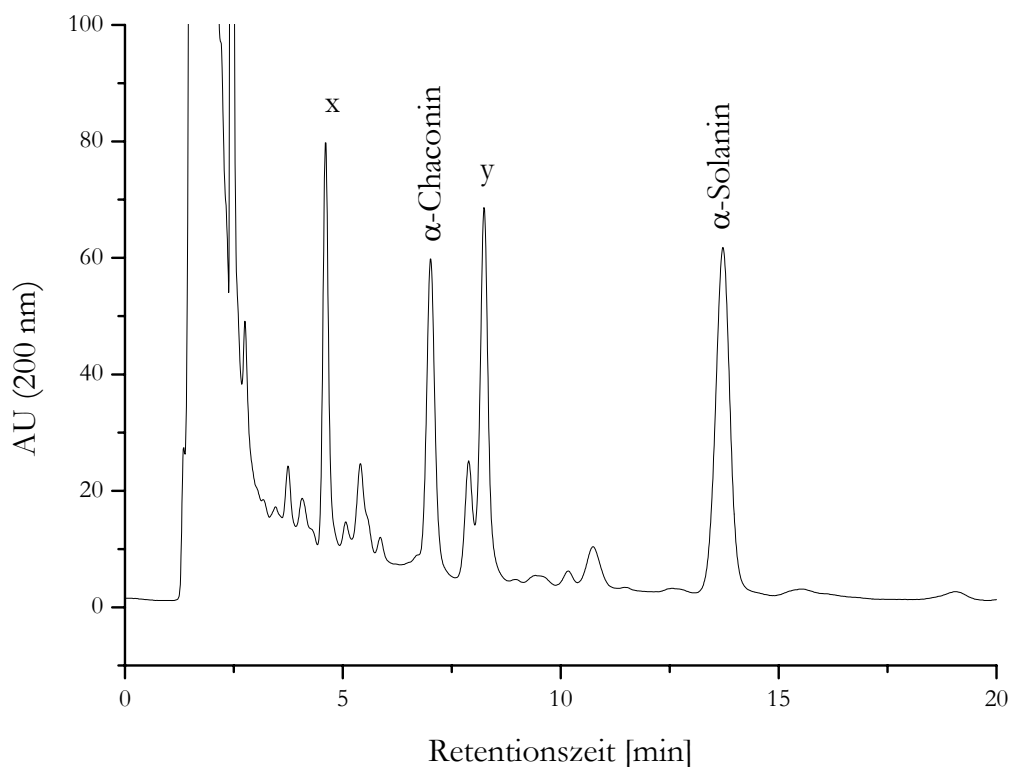


Abbildung 4.12 HPLC-Chromatogramm von KFW; SPE-Aufreinigung durch kombinierten Waschschritt; Fraktionierung von 2 unbekanntem Peaks (4,5 min und 8,3 min) zur weiteren Analyse; Säule: Reprisil-pur NH₂ (5 µm, 250 x 4 mm); Temperatur: 40 °C; Injektionsvolumen: 20 µl; Eluenten: 25 % A: 20 mM KH₂PO₄, pH 6, 75 % B: ACN

Die nach dem HPLC-Chromatogramm in dem Peak bei 4,5 min (x) enthaltene Substanz resultiert dabei im MALDI-MS-Spektrum in Abbildung 4.13.

Zur Identifizierung der Substanz lassen sich unter Betrachtung der Massen möglicher Hydrolyseprodukte von α-Chaconin und α-Solanin (Abbildung 2.6, Kapitel 2.3.1) drei mögliche Kandidaten ermitteln. Sowohl β1-Chaconin als auch β2-Chaconin und β1-Solanin weisen ein Molekulargewicht von 705,9 g/mol auf. Folglich repräsentiert der 4,5min-Peak aus Abbildung 4.12 eine der drei letztgenannten Substanzen. Aufgrund der hier durchgeführten Messung lässt sich allerdings keine eindeutige Zuordnung treffen. Aus der Literatur ist bekannt, dass in der Kartoffel-Spezies aber lediglich das Disaccharid β-Chaconin in größeren Mengen vorliegt [40]. Da auch das Auftragslabor lediglich β-Chaconin in den Kartoffelprotein-Proben nachweist, wird davon ausgegangen, dass es sich auch bei dem 4,5min-Peak um β-Chaconin handelt.

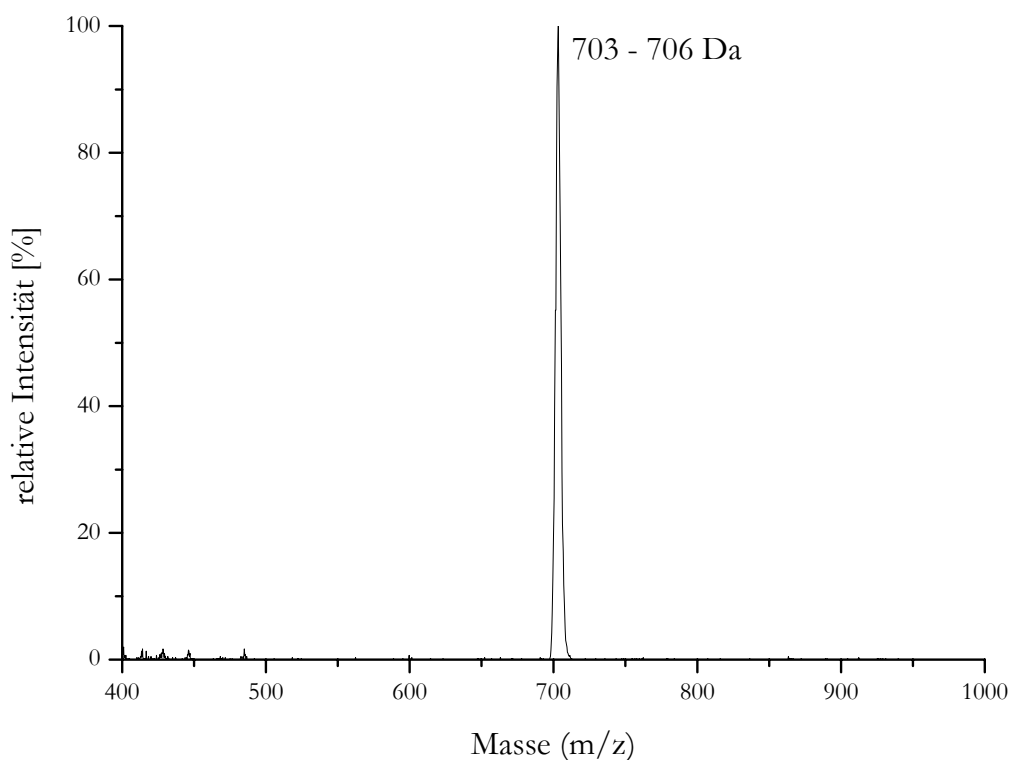


Abbildung 4.13 MALDI-MS-Spektrum; 4,5min-Fraktion; nach Lyophilisieren gelöst in destilliertem Wasser (0,1 % TFA), Aufreinigung: C18-Ziptip; Elution mit 100 % ACN (0,1 % TFA); Matrix: Sinapinsäure 10 mg/ml; Laserpower 100; 50 Einzelschüsse

Eine Kalibration von β -Chaconin mit Standardsubstanzen ist im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich. Die Daten des Auftragslabors können aber dahingehend genutzt werden, um die gemessenen Flächeneinheiten von β -Chaconin einiger Proben gegen die ermittelten β -Chaconin-Konzentrationen des Auftragslabors aufzutragen. Die sich daraus ergebende Gerade ist im Anhang 6.1.15 (Abbildung 6.15) gezeigt und dient der Kalibration von β -Chaconin. Die lineare Regression ergibt für die Geradengleichung $y = 2,75x$. Das Bestimmtheitsmaß R^2 beträgt 0,99 und gibt somit eine gute Übereinstimmung der gemessenen Flächeneinheiten von β -Chaconin mit der ermittelten β -Chaconin-Konzentration des Auftragslabors wieder. Es ist damit gelungen, eine indirekte Kalibration von β -Chaconin vorzunehmen.

Die nach dem HPLC-Chromatogramm in dem Peak bei 8,3 min (y) enthaltene Substanz resultiert in einem MALDI-MS-Spektrum mit der Masse von 844 Da (siehe Abbildung 6.4 im Anhang 6.1.2). Es konnte im Rahmen dieser Arbeit allerdings keine Zuordnung dieser Substanz ermittelt werden.

4.6 Zeit- und Kostenabschätzung

Der Zeitbedarf, der nötig ist, um einmal den gesamten Prozess zu durchlaufen, beträgt ca. 80 min. Dabei entfallen 35 min auf die Extraktion mit anschließender Zentrifugation, 5 min auf die SPE-Aufreinigung und 40 min auf die Doppelbestimmung mittels HPLC. Es ist möglich, ca. 20 Proben parallel zu extrahieren und die SPE-Vorreinigungen durchzuführen, so dass sich der gesamte Zeitbedarf pro Probe verringert. Für 20 Proben sind ca. 2,5 h für die Extraktion (inkl. Zentrifugation), 1 h für die SPE-Aufreinigung und 20 h für die HPLC-Messungen (inkl. 10 Standardkonzentrationen) zu veranschlagen.

Die Gesamtkosten für die Durchführung der Glykoalkaloid-Analytik unterteilen sich in die Kosten für Chemikalien und in die Verbrauchsmittel. Tabelle 4.5 gibt einen Überblick über die Kosten bei 20 Extraktionen.

Tabelle 4.5 Kostenbedarf für die Glykoalkaloid-Analytik von 20 Proben (inkl. 10 Standardkonzentrationen)

Materialien und Chemikalien	Kosten [€]
Zentrifugenröhrchen	2
SPE-Kartuschen	66
HPLC-Gefäße mit Deckel	5
ACN (HPLC-Messung)	26
Essigsäure, MeOH	4
Standards für Kalibration	5
Summe	106

Zu der berechneten Summe von 106 € kommen noch die Kosten für die HPLC-Säule (Refill 200 €) und die Vorsäulen (100 €/5 Stck). Erfahrungsgemäß muss diese Säule nach ca. 900 Injektionen ausgetauscht werden. Für 20 Proben und 10 Standardkonzentrationen sind bei Doppelbestimmung 60 Injektionen nötig, daraus ergibt sich, dass nach 15 Extraktionszyklen ($900/60 = 15$) eine neue HPLC-Säule inkl. Vorsäule angeschafft werden muss. Die Kosten für die HPLC-Säule verteilen sich damit auf die 15 Extraktionszyklen ($300 \text{ €}/15 = 20 \text{ €}$). Für 20 Proben sind demnach 20 € für das Säulenmaterial zusätzlich zu veranschlagen. Es ergibt sich eine Gesamtsumme für die Materialien und Chemikalien bei der Bestimmung von 20 Proben von 126 €.

4.7 Wiederverwendung der SPE-Kartuschen

Für eine weitere Reduktion der Kosten für die Glykoalkaloid-Analytik wurde eine Mehrfachverwendung der SPE-Kartuschen Oasis HLB getestet. Dazu wurde eine Extraktionslösung einer Kartoffelprotein-Probe dreimal hintereinander mit der gleichen SPE-Kartusche aufgereinigt. Zusätzlich wurde dieser Versuch zur Überprüfung der Ergebnisse

dreimal durchgeführt ($n = 3$). Die ermittelten Wiederfindungsraten von α -Chaconin und α -Solanin sind in Tabelle 4.6 dargestellt.

Tabelle 4.6 Wiederfindungsraten von α -Chaconin und α -Solanin bei Dreifachverwendung der SPE-Kartuschen Oasis HLB¹

Verwendung	Wiederfindung α -Chaconin [%]	Wiederfindung α -Solanin [%]
1	100,0 \pm 4,3	100,0 \pm 7,2
2	101,0 \pm 10,1	102,5 \pm 4,2
3	101,2 \pm 10,8	100,7 \pm 1,3

¹Die Ergebnisse sind Mittelwerte mit Standardabweichung, $n = 3$.

Aus diesen Werten lässt sich keine Verschlechterung der Wiederfindung von α -Chaconin und α -Solanin nach dreimaliger Verwendung der SPE-Kartuschen Oasis HLB feststellen. Die leichten Schwankungen um einige Prozentpunkte liegen im Rahmen der Meßgenauigkeiten. Die Kapazität des Sorbens-Materials kann auch nach dreifacher Verwendung als unverändert eingestuft werden. Es könnten folglich die Kosten für die Glykoalkaloid-Analytik durch Mehrfachverwendung der SPE-Kartuschen weiter gesenkt werden.

4.8 Adsorption von α -Solanin an Bentonite

Für eine präparative Abreicherung der Glykoalkaloide im KFW oder Proteinfractionen aus dem KFW können nicht mehr die für analytische Zwecke eingesetzten SPE-Kartuschen verwendet werden. Eine Glykoalkaloid-Abreicherung im Technikums-Maßstab ist beispielsweise durch einen Batch-Prozess oder einen kontinuierlich geführten Prozess denkbar. Im Rahmen dieser Arbeit wurden einige Vorversuche im Labormaßstab zur Adsorption an Bentonite durchgeführt. Das hierbei verwendete Bentonit EXM 0926 I von der Firma Süd Chemie AG gehört zur Gruppe der sauer aktivierten Bentonite und ist aufgrund seiner kleinen Korngröße für eine Säulenpackung ungeeignet. Die Experimente wurden daher im Batch-Verfahren durchgeführt.

Zunächst wurden das Adsorbermaterial mit Methanol und Wasser vorkonditioniert. Daraufhin sind 10 mg des Materials (EXM 0926 I) mit 1 ml 0,1 mg/ml α -Solanin (gelöst in 1 mM HCl, pH 3) 24 h bei Raumtemperatur bei 1.000 rpm im Thermoschüttler inkubiert worden. Anschließend wurde das abzentrifugierte Adsorbermaterial mit den kombinierten Waschschritten behandelt (5 min, 1.000 rpm, 1 ml Lösung je Waschschrift). Die verschiedenen Waschlösungen wurden bei 1.000 rpm für 10 min abzentrifugiert. Als letztes wurde mit 1 ml Methanol eluiert. Das Vorkonditionieren, Waschen und Eluieren der Adsorbermaterialien wurde mit den in Kapitel 4.3.1 beschriebenen entwickelten SPE-Methode inklusive der kombinierten Waschschriffe durchgeführt. Tabelle 4.7 zeigt die Ergebnisse zum Adsorptionsverhalten von α -Solanin an das verwendete Bentonit.

Tabelle 4.7 Adsorptionsverhalten von α -Solanin an ein Bentonit¹

Bentonit	α -Solanin-Konzentration [mg/ml]	Adsorption α -Solanin [%]
EXM 0926 I	0,1	93,6 \pm 2,6

¹Die Ergebnisse sind Mittelwerte mit Standardabweichung, n = 4.

Das verwendete Bentonit zeigt sehr gute Adsorptionseigenschaften für α -Solanin. Es können 93,6 % der eingesetzten Menge gebunden werden. Für weitere Untersuchungen wurden im Folgenden zwei Kartoffelprotein-Proben (Muster-Nr. Emsland-Stärke GmbH: 13183 und 13191) für die Adsorptionsversuche verwendet. Dazu wurde die unter Kapitel 4.2 beschriebene essigsäure Extraktionsmethode verwendet. Das Vorkonditionieren, Waschen und Eluieren der Adsorbentmaterialien wurde mit den oben beschriebenen Bedingungen und der in Kapitel 4.3.1 beschriebenen entwickelten SPE-Methode inklusive der kombinierten Waschschriffe durchgeführt. In Tabelle 4.8 sind die dabei erhaltenen Ergebnisse dargestellt.

Tabelle 4.8 Adsorptionsverhalten von α -Solanin aus zwei Proben (Muster-Nr. Emsland-Stärke GmbH: 13183 und 13191) an ein Bentonit¹

Bentonit	Probe	Adsorption α -Solanin [%]
EXM 0926 I	13183	99,1 \pm 0,8
EXM 0926 I	13191	96,1 \pm 0,7

¹Die Ergebnisse sind Mittelwerte mit Standardabweichung, n = 2.

Es ist ersichtlich, dass auch bei der Verwendung von Kartoffelprotein-Proben eine Adsorption von α -Solanin an das Bentonit sehr gut möglich ist. Mit Werten zwischen 96,1 und 99,1 % Adsorption kann man von einer hervorragenden Abreicherung von α -Solanin aus den Extrakten der Kartoffelprotein-Proben sprechen. Unter der verwendeten Methode scheint das α -Solanin nahezu irreversible an das Bentonit zu adsorbieren. Die Adsorption an Bentonite stellt folglich eine sehr gute Methode dar, um die Glykoalkaloide aus KFW oder sonstigen flüssigen Kartoffelprotein-Proben zu entfernen.

Neben der Bindung der Glykoalkaloide an die Bentonite stellt möglicherweise die Adsorption von Proteinen einen unerwünschten Nebeneffekt dar. Es ist bekannt, dass Proteine ebenfalls an Bentonite binden und sich teilweise nur unter extremen pH-Werten wieder eluieren lassen [32, 123]. Für eine Glykoalkaloid-Abreicherung bei der Gewinnung von proteinhaltigen Proben müsste daher im Vorfeld eine Studie über das Adsorptions- und Elutions-Verhalten der Kartoffelproteine an die Bentonite durchgeführt werden.

4.9 Biologische Aktivität von α -Solanin

Bereits in Kapitel 2.3.6 wurde die Toxizität der Glykoalkaloide diskutiert. In diesem Abschnitt wurde nun die Toxizität von α -Solanin auf Zellkulturen getestet. In Anlehnung an Literatur [65] wurde die Zelllinie Hep-G2 (humanes Leberkarzinom) verwendet. Die Zellen wachsen adhärent und haben eine Verdopplungszeit von etwa 50–60 Stunden. Die Kultivierungsbedingungen sind im Anhang 6.2.10 beschrieben. Die Vitalität der verwendeten Zellen wurde nach Behandlung mit α -Solanin mit dem MTT-Assay (Anhang 6.2.11) bestimmt. Es wurde eine Verdünnungsreihe von α -Solanin hergestellt und 6 verschiedene Konzentrationen für den MTT-Test verwendet. Die α -Solanin-Konzentrationen wurden wie in Tabelle 6.6 im Anhang 6.2.11 hergestellt. Abbildung 4.14 zeigt die erhaltenen Ergebnisse.

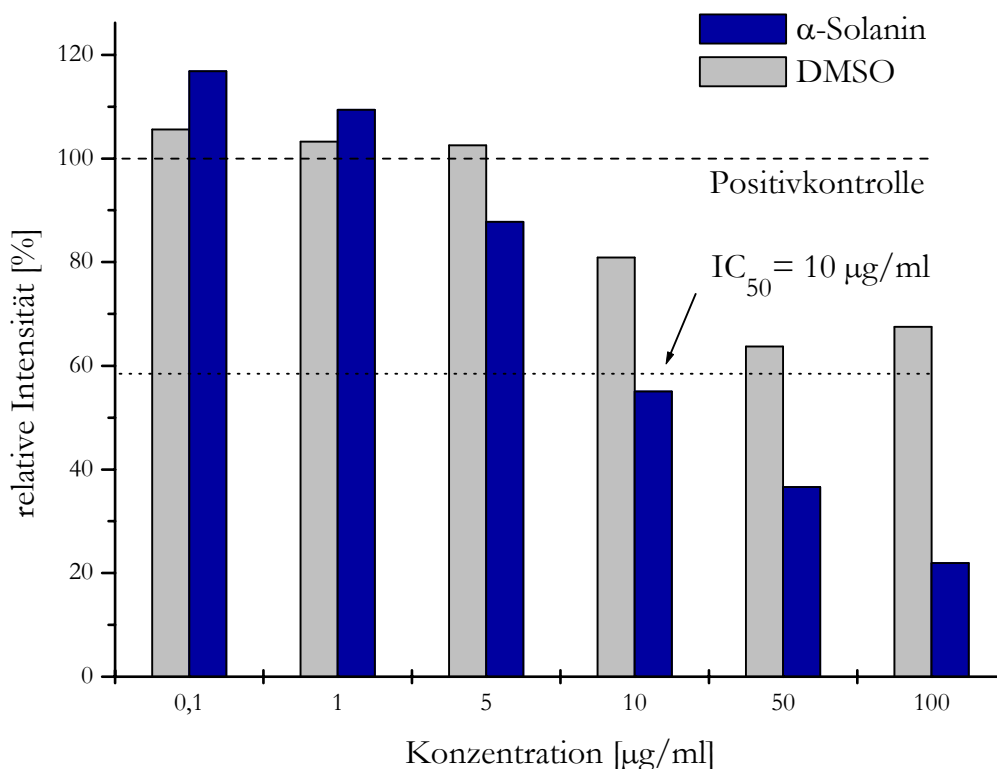


Abbildung 4.14 Wirkung von verschiedenen α -Solanin-Konzentrationen auf Hep-G2-Zellen; MTT-Assay zur Ermittlung der Vitalität

Auf der Ordinate ist zu besserer Veranschaulichung die relative Intensität statt der gemessenen Extinktion aufgetragen. Die Positivkontrolle stellt den Wert dar, der nur durch die Hep-G2-Zellen ohne Einfluss von Glykoalkaloiden und/oder DMSO beim MTT-Assay erhalten wird. Dieser wird als 100 % gesetzt. Alle weiteren Messwerte werden in Relation dazu berechnet. Aus Abbildung 4.14 lässt sich erkennen, dass mit steigender α -Solanin-Konzentrationen die relative Intensität und damit die Vitalität der Zellen sinkt. DMSO dient

als Lösungsmittel für α -Solanin und wird in den bei den α -Solanin-Konzentrationen eingesetzten Verdünnungen für weitere Positivkontrollen eingesetzt. Der Einfluss der DMSO-Konzentration ist besonders bei den höheren Konzentrationen größer und muss daher berücksichtigt werden. Die Wirkung des α -Solanins auf die Zellen scheint aber nicht vom DMSO überlagert zu werden. Der IC_{50} -Wert, der die Inhibierungskonzentration angibt, bei der 50 % der maximalen Extinktion gemessen werden, liegt in Abbildung 4.14 bei einer α -Solanin-Konzentrationen von ca. 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$. α -Solanin zeigt damit eine Zytotoxizität gegenüber dem humanen Leberkarzinom Hep-G2 mit einem IC_{50} -Wert von 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Abschließend kann man sagen, dass der MTT-Assay eine qualitative Aussage über die Toxizität von α -Solanin gibt, eine quantitative Bestimmung allerdings aufgrund des großen Messfehlers und vor allem des nichtlinearen Verhaltens hingegen nicht möglich ist.

4.10 Zusammenfassung

In dieser Arbeit konnte eine erfolgreiche Strategie zur Extraktion und Analytik von α -Solanin und α -Chaconin aus Kartoffelprotein-Proben der Emsland-Stärke GmbH entwickelt werden. Für die HPLC-Analytik wurde eine sehr gute Trennung (Trennfaktor $\alpha = 1,87$) der beiden Glykoalkaloide α -Solanin und α -Chaconin mittels einer Normalphasen-Chromatographie unter Verwendung einer Reprosil-NH₂-Säule erreicht.

Für die Extraktion wurde eine essigsäure Methode unter Verwendung eines Ultra-Turrax zur Homogenisation des festen Probenmaterials angewendet. Die dabei erhaltenen Homogenisate wurden mittels SPE aufgereinigt. Zusätzlich wurden drei verschiedene Waschschritte für die SPE-Aufreinigung ausgearbeitet und für die Anwendung mit der Probenmatrix getestet. Als Ergebnis wurde zur optimalen Entfernung der Störkomponenten ein kombinierter Waschschritt aus sauren und basischen Bestandteilen etabliert.

Das relative geringe Absorptionsverhalten der Glykoalkaloide limitiert die Nachweisgrenze der HPLC-Analytik bei 200 nm auf 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ bzw. 100 ppm unter den verwendeten Extraktionsbedingungen. Für die Quantifizierung geringerer Konzentrationen wurde eine Aufkonzentrierung während der SPE-Aufreinigung entwickelt, so dass eine Verringerung des Quantifizierungslimits auf 20 ppm erreicht werden konnte. Darüberhinaus konnte ein unbekannter Peak des Glykoalkaloid-Chromatogramms mittels MALDI-MS-Analyse als β -Chaconin identifiziert werden. Ebenso wurde eine indirekte Kalibration des β -Chaconins anhand von Konzentrationswerten eines Auftragslabors möglich.

Zusätzlich zu der entwickelten Extraktions- und SPE-Methode für die quantitative Analyse wurde in Hinblick auf eine Abreicherung der Glykoalkaloide im Technikumsmaßstab eine Absorption an Bentonite untersucht. α -Solanin konnte dabei zwischen 93,6 und 99,1 % an das verwendete Bentonit adsorbiert werden.

Die biologische Aktivität der Glykoalkaloide wurde durch Einwirkung auf die humane Leberkrebszelllinie (Hep-G2) getestet. Die Vitalität wurde anschließend unter Verwendung des MTT-Assay bestimmt. Es wurde eine Zytotoxizität von α -Solanin gegenüber dem humanen Leberkarzinom Hep-G2 von einem IC_{50} -Wert von ca. 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ermittelt.

5 Zusammenfassung, Diskussion und Ausblick

Im Rahmen des gesamten Projektes ist es gelungen, die Proteine im Kartoffelfruchtwasser mittels Ionenaustausch-Chromatographie in zwei große Gruppen aufzutrennen. In Hinblick auf ein mögliches Up-Scaling in den Industrie-Maßstab kamen dafür Membran-Adsorber mit Kationenaustauscher (S)- und Anionenaustauscher (Q)-Funktionalität zur Anwendung. Mit den S-Modulen konnte eine Fraktion von Protease-Inhibitoren und mit dem Q-Modul das Patatin aus dem Kartoffelfruchtwasser sowohl im Labor als auch im Technikums-Maßstab abgetrennt werden. In dieser Arbeit wurden für diese Protein-Fractionen wie auch für das Kartoffelfruchtwasser verschiedene Analysemethoden entwickelt, die eine umfangreiche Analytik der während des Gewinnungs-Prozesses erhaltenen Proben zulassen.

RP-HPLC

Für eine chromatographische Analytik des Kartoffelfruchtwassers mittels RP-HPLC wurden verschiedene Lösungsmittelgradienten zunächst für ein Nucleosil-C18-Material entwickelt und getestet. Drei weitere Säulenmaterialien kamen anschließend mit dem bestauflösenden Gradient zur Anwendung. Ein neuartiges Säulenmaterial (Proteo) erzielte dabei die schärfsten Peaks bei bester Trennleistung. Die so entwickelte RP-HPLC-Methode für das Kartoffelfruchtwasser wurde anschließend auf die beiden Protein-Fractionen angewendet. Der Peak für die S-Fraktion eluiert dabei allerdings nur kurz vor dem für die Q-Fraktion, eine Basislinientrennung der beiden Fractionen konnte daher nicht erreicht werden. Verdünnungsreihen der lyophilisierten Proben aus dem Technikums-Prozess erlauben jedoch eine Kalibration von 5 bis 0,5 mg/ml. Das Detektionslimit ist sicherlich nicht zufriedenstellend, eine Optimierung ist im Rahmen dieser Arbeit allerdings nicht erreicht worden. In folgenden Arbeiten sollte versucht werden, Gründe für das geringe UV-Absorptionsvermögen der S- und Q-Fraktion zu finden. Möglicherweise sind weitere Aufreinigungsstrategien zur Entfernung von Störkomponenten notwendig, um die „ungetrübte“ UV-Aktivität der Proteine während der HPLC-Messungen zu detektieren.

MALDI

Massenspektrometrische Untersuchungen mittels MALDI-MS erfordern möglichst salzfreie Probenmaterialien. Die mittels Vivaflow 50 aufkonzentrierten und entsalzten Proben genügen dem Anspruch jedoch nicht. Für die S-Fraktion wurde ein auf der Umkehrphasen-Chromatographie basierendes C18-Material für Pipettenspitzen-Aufsätze (Ziptips) erfolgreich angewendet, um die Probe zu entsalzen und aufzukonzentrieren. Die Peakintensität im MALDI-Spektrum konnte damit deutlich gesteigert werden, und eine Interpretation des gemessenen Spektrums wurde dadurch verbessert. Der Vergleich mit kommerziell erhältlichen Protease-Inhibitoren machte eine Zuordnung der erhaltenen Peaks möglich. In der S-Fraktion befinden sich demnach mit 4,3 kDa ein Carboxypeptidase-Inhibitor, mit 8 kDa ein Bowman-

Birk-Inhibitor und mit 20,3 kDa ein Kunitz-Inhibitor. Nach tryptischem Verdau vom SDS-Gel einer 20 kDa-Bande aus der S-Fraktion ließen sich mittels MALDI-MS-Messungen indirekt zwei Proteine aus der Kartoffel nachweisen. Nach Datenbank-Analyse können der Potato Cysteine protease inhibitor und der Putative Kunitz-type tuber invertase inhibitor als mögliche Proteine in der S-Fraktion angenommen werden.

In der Q-Fraktion konnte ebenfalls eindeutig ein 40 kDa-Peak für das Patatin gemessen werden, eine Ziptip-Aufreinigung brachte jedoch keine zusätzliche Optimierung des Spektrums bezüglich der Peakschärfe und -intensität. Zur eindeutigeren Identifizierung wurde eine 40 kDa-Bande eines SDS-Gels tryptisch verdaut und die erhaltenen Peptide mittels MALDI-MS bestimmt. Elf Massenpeaks konnten beim Datenbank-Abgleich eindeutig der Aminosäure-Sequenz des Patatins zugeordnet und damit eine Sequenz-Abdeckung von 40 % erzielt werden. Eine Kombination des tryptischen Verdaus einer Bande nach Auftrennung mittels 2D-Gelelektrophorese könnte sicherlich eine deutliche Steigerung der Sequenzabdeckung des Patatins und weitere eindeutige Zuordnungen der Protease-Inhibitoren der S-Fraktion ermöglichen.

KAPILLARELEKTROPHORESE

Bei der kapillarelektrophoretischen Trennung von Proteinen muss die mögliche Adsorption der Proteine an die Kapillarwand berücksichtigt bzw. unterbunden werden. Bei der Trennung der Kartoffelproteine konnte eine gute Unterdrückung dieser Adsorption durch Mizellenbildung mit Harnstoff als Additiv im Trennpuffer erreicht werden. Harnstoff konnte zusätzlich eine Protein-Denaturierung und eine damit verbundene Aggregation der Proteine unterdrücken. Dieses Puffersystem erzielte dadurch eine Auftrennung der Patatin-Fraktion (Q) in vier aufeinander folgende Peaks, mögliche Isoformen des Patatins. In der S-Fraktion wurden unter diesen Bedingungen mehrere getrennte Peaks erhalten, so dass auch hier die Existenz verschiedener Protease-Inhibitoren als belegt gelten kann. Eine Verwendung von kommerziell erhältlichen Protease-Inhibitoren als Referenzsubstanz könnte hier möglicherweise eine genauere Identifizierung ergeben.

PROTEIN- ENZYM-ASSAYS

Für die Messung der biologischen Aktivität der Protease-Inhibitoren wurde ein Protease-Inhibitor-Assay mit N- α -Tosyl-L-Arginmethylester als Substrat verwendet. Unter Abspaltung von Methanol aus dem Substrat-Molekül kann die Aktivität des Trypsins beobachtet werden. Unter Hemmung der Aktivität des Trypsin mittels Protease-Inhibitioren lässt sich somit auch indirekt deren Aktivität verfolgen. Für die Bestimmung der Patatin-Aktivität der Q-Fractionen wurde ein Enzym-Test unter Verwendung des Substrats p-Nitrophenyldecanoat verwendet. Die Lipid-Acyl-Hydrolase-Aktivität des Patatins spaltet das Substrat und lässt eine photometrische Messung des entstehenden p-Nitrophenols zu. Die an sich recht einfachen Enzym-Assays weisen durch schwankende Konzentrationen in den gewonnenen Proben aufgrund unterschiedlicher Lagerungsbedingungen und damit verbundener Präzipitationen

erschwerte Messbedingungen auf. In folgenden Arbeiten sollte dieser Test für eine Reinheitskontrolle daher schon während der Gewinnung und Aufarbeitung der Fraktionen verwendet werden, um somit den Verlauf der biologischen Aktivität bewerten zu können. Ein limitierender und entscheidender Faktor könnte dabei die Probenbeschaffenheit sein: Lyophilisierte Proben bieten den Vorteil, dass definierte Konzentrationen durch genaue Einwaage in den Proben eingesetzt werden können. Konzentrationsschwankungen durch Lagerungsbedingungen (z.B. Temperatur) können somit ebenfalls ausgeschlossen werden. Ebenso bieten lyophilisierte Proben den Vorteil, dass zur Vergleichbarkeit mehrerer Proben immer das gleiche Lösungsmittel verwendet werden und eine für den Test geeignete Konzentration eingewogen werden kann.

ENZYMATISCHE HYDROLYSE

Erste Versuche zur enzymatischen Hydrolyse von Kartoffelfruchtwasser mit Trypsin und Papain konnten keine Spaltung der Proteine erreichen. Daraufhin wurde eine bereits bei Kartoffelkleber [111] erfolgreich angewendete Kombination der Proteasen Alcalase und Flavourzyme auch für die enzymatische Hydrolyse der Kartoffelproteine genutzt. Die höchsten Hydrolysegrade konnten bei der Verwendung des hitzecoagulierten Kartoffelproteins erreicht werden: Nach (Gl. 3-1) 27 % und nach (Gl. 3-2) 57 %. Eine Steigerung der Hydrolysegrade konnte anschließend noch durch eine mehrfache Zugabe von Alcalase und Flavourzyme während des Versuchs erzielt werden. Es wurden so Hydrolysegrade von 68 % (Gl. 3-1) und 72 % (Gl. 3-2) erhalten. Als störende Nebenreaktion während der Hydrolysen wurde das Wachstum von Mikroorganismen beobachtet und untersucht. Dieses könnte für eine Aufreinigung der erhaltenen Hydrolysate mittels z.B. RP-HPLC ebenso hinderlich sein wie für eine Verwendung der dabei gewonnenen Peptide und Aminosäuren. Eine Sterilfiltration des Kartoffelfruchtwassers wäre eine denkbare, aber aufgrund des hohen Feststoffgehalts unpraktikable Möglichkeit, die Filtration der erhaltenen Hydrolysate für weitere Anwendungen eine bessere Möglichkeit. Mit einem Zusatz wie z.B. Natriumazid zum KFW könnte das mikrobielle Wachstum möglicherweise verhindert werden.

GLYKOALKALOID-ANALYTIK

Die quantitative Analytik der Glykoalkaloide α -Solanin und α -Chaconin wurde unter Verwendung einer Reprosil-NH₂-Säule und der Methodik der Normalphasen-Chromatographie durchgeführt. In dem Bereich von 5 bis 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ konnte eine Linearität der Kalibration mit Standardsubstanzen mit einem Regressionskoeffizienten von $R^2 = 0,99$ erzielt werden. Für die Extraktion der Glykoalkaloide aus der Kartoffelprotein-Matrix kam eine essigsäure Extraktion mit Homogenisation zu Anwendung, die den Kriterien nach schneller Durchführbarkeit und geringem apparativem Aufwand genügt. Diese essigsäure Extraktion lässt sich einfach für bis zu 30 Proben in kürzester Zeit in einer „Batch-Reaktion“ durchführen: Das Probenmaterial wird im Zentrifugenröhrchen abgewogen, in Lösung gebracht, homogenisiert und zentrifugiert. Dadurch kann viel Zeit und ein großer apparativer

Aufbau gespart und vor allem die quantitative Ausbeute erhöht werden.

Zur Aufreinigung der essigsauren Homogenisate ist eine effiziente SPE-Methode unter Entfernung einiger Störkomponenten entwickelt worden. Zur Entwicklung dieser Methode diente der sogenannte „20-bottle-trick“, der das Elutionsverhalten der Analyten α -Solanin und α -Chaconin sowohl unter sauren als auch unter basisch modifizierten Elutions-Bedingungen untersucht. Aus den daraus erhaltenen Ergebnissen wurden dann verschiedene Waschschriffe entwickelt und auf ihre Anwendbarkeit in der Kartoffelprotein-Matrix getestet. Als bestgeeigneter Waschschriff wurde eine Kombination aus sauer und basisch modifizierten Waschschriffen etabliert. Für diesen kombinierten Waschschriff wurden die Wiederfindungsraten für α -Solanin und α -Chaconin untersucht. Nach Anwendung des entwickelten kombinierten Waschschriffes auf Konzentrationen von Standardsubstanzen konnte eine Wiederfindung im Bereich von 84-93 % für α -Solanin und α -Chaconin gewährleistet werden. Darüber hinaus wurden Wiederfindungsraten von 85-96 % für α -Chaconin und 76-93 % für α -Solanin nach der Durchführung der essigsauren Extraktion und sich anschließender SPE-Aufreinigung mit kombiniertem Waschschriff erreicht. Trotz gewisser Fehler und Schwankungen (HPLC) konnte mit den erreichten Wiederfindungsraten eine verlässliche Quantifizierung der Glykoalkaloide durchgeführt werden.

Durch das geringe Absorptionsverhalten der Glykoalkaloide wird die Quantifizierungsgrenze für HPLC-Messungen mit UV-Detektion auf 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ limitiert. Bedingt durch die entwickelte Extraktionsstrategie ist damit ein gesamter Nachweis lediglich bis zu 100 ppm möglich. Die Aufkonzentrierung geringerer Konzentrationen konnte während der SPE-Aufreinigung erreicht werden, so dass die Nachweisgrenze auf 20 ppm gesenkt werden konnte. Eine weitere Senkung dieser Grenze ist durchaus denkbar, stellt aber in Hinblick auf das kleine Volumen der hier verwendeten Kartuschen eine unpraktikable Lösung dar. Vielmehr wäre dafür die Verwendung größerer SPE-Kartuschen ratsam. Eine andere Möglichkeit, geringe Glykoalkaloid-Konzentrationen zu detektieren, wäre der Einsatz eines MS-Detektors anstelle des UV-Detektors. In der Literatur [107, 108] sind HPLC-MS-Methoden beschrieben, die eine deutlich niedrigere Quantifizierungsgrenze (ppb-Bereich) zulassen.

Der für in Pulverform vorliegende Proben erarbeitete dreistufige Extraktions- und Analytikprozess wurde anschließend auch für das Kartoffelfruchtwasser und verschiedene Fraktionen des Gewinnungsprozesses der Q- und S-Fraktion verwendet. Dafür war teilweise eine große Aufkonzentrierung bei der SPE-Aufreinigung notwendig, um in den stark verdünnten Proben eine Quantifizierung zu erlangen. Im Falle des Kartoffelfruchtwassers wurden im Chromatogramm dabei zwei unbekannte Peaks detektiert. Nach mehrfacher Fraktionierung und MALDI-MS-Messungen konnte einer der Peaks als β -Chaconin identifiziert werden. Eine indirekte Kalibration wurde unter Zuhilfenahme der Konzentrationsangaben für β -Chaconin eines Auftragslabors möglich und könnte für zukünftige Messungen als Grundlage dienen.

Darüber hinaus wurde das Adsorptionsverhalten von α -Solanin an Bentonite untersucht. Eine Standardkonzentration von α -Solanin konnte dabei zu 94 %, α -Solanin aus der

Kartoffelprotein-Matrix zwischen 96 und 99 % adsorbiert werden. Diese Glykoalkaloid-Abreicherung stellt damit eine sehr gute Methode zur Entfernung der Glykoalkaloide aus KFW oder sonstigen flüssigen Kartoffelprotein-Proben dar. Da der Prozess im Batch-Verfahren angewendet wurde, würde sich auch leicht ein up-scaling durchführen lassen. Eine Adsorption der Kartoffelproteine an die Bentonite muss allerdings für eine Anwendung bei der Gewinnung von Kartoffelprotein-Fractionen noch berücksichtigt und gegebenenfalls durch geeignete Versuchsbedingungen verhindert werden.

Die biologische Aktivität der Glykoalkaloide wurde durch Experimente mit einer humanen Leberkrebszelllinie untersucht. Es konnte eine Zytotoxizität von α -Solanin ermittelt werden. Für weiterführende Aussagen über den Wirkmechanismus der Toxizität der Glykoalkaloide wären jedoch weitere Studien, z.B. über die Auswirkungen der Glykoalkaloid-Exposition auf den Zellzyklus oder zum Aulösen von Apoptose („programmierter Zelltod“) durchzuführen.

6 Anhang

6.1 Abbildungen

6.1.1 Kalibration für RP-HPLC

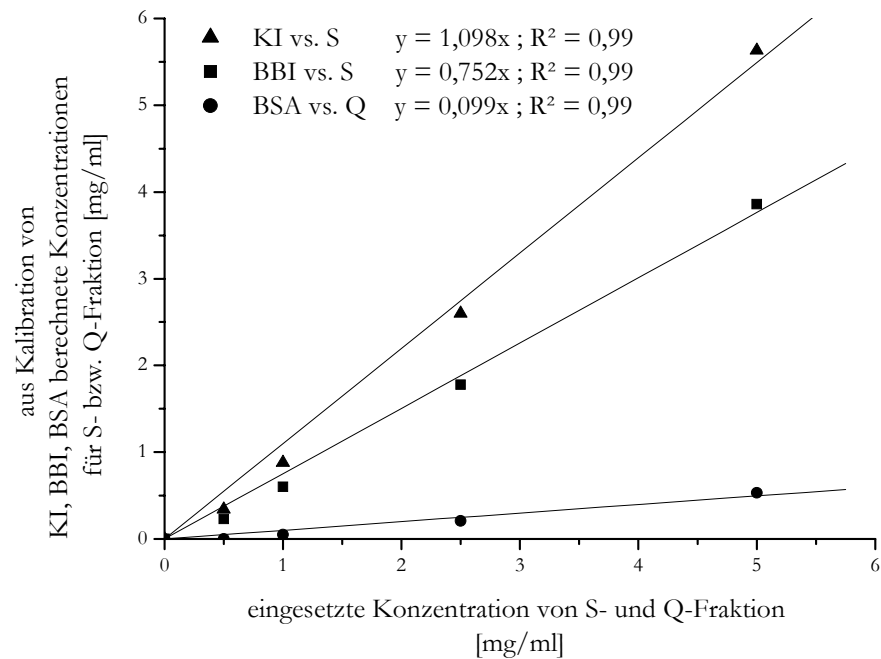


Abbildung 6.1 Kalibration/Korrelation von Standardkonzentrationen (BSA = Bovine Serum Albumin, BBI = Bowman-Birk-Inhibitor, KI = Kunitz-Inhibitor) mit S bzw. Q Fraktionen bei Messungen mit RP-HPLC

6.1.2 MALDI-Spektren

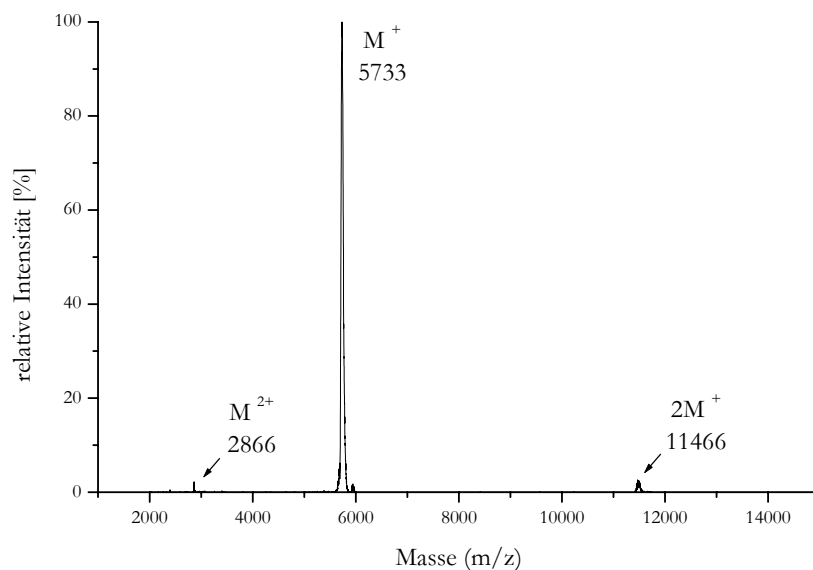


Abbildung 6.2 MALDI-MS-Spektrum von Insulin (Kalibrationssubstanz)

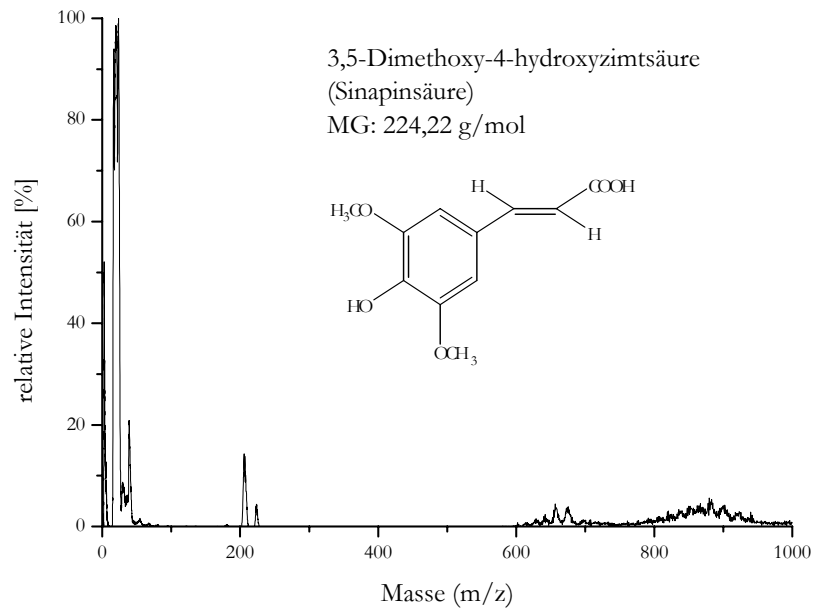


Abbildung 6.3 MALDI-MS-Spektrum von Sinapinsäure (Matrix)

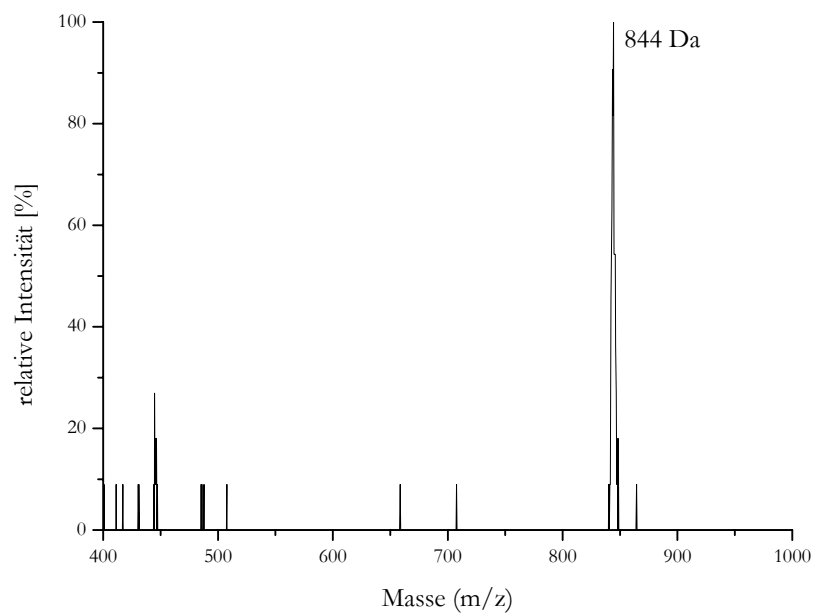


Abbildung 6.4 MALDI-MS-Spektrum; 8,3min-Fraktion aus Abbildung 4.12; nach lyophilisieren gelöst in destilliertem Wasser (0,1 % TFA), Aufreinigung: C18-Ziptip; Elution mit 100 % ACN (0,1 % TFA); Matrix: Sinapinsäure 10 mg/ml; Laserpower 150; 50 Einzelschüsse

6.1.3 Tryptischer Verdau vom SDS-Gel

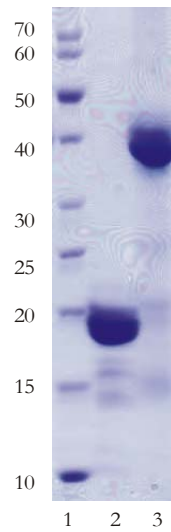


Abbildung 6.5 SDS-Gel; Spur 1: Marker, Spur 2: S-Fraktion (Ionenaustausch-Membran-Chromatographie); Spur 3: Q-Fraktion (Ionenaustausch-Membran-Chromatographie); gefärbt mit Coomassie Blue

6.1.4 Kalibration für CE

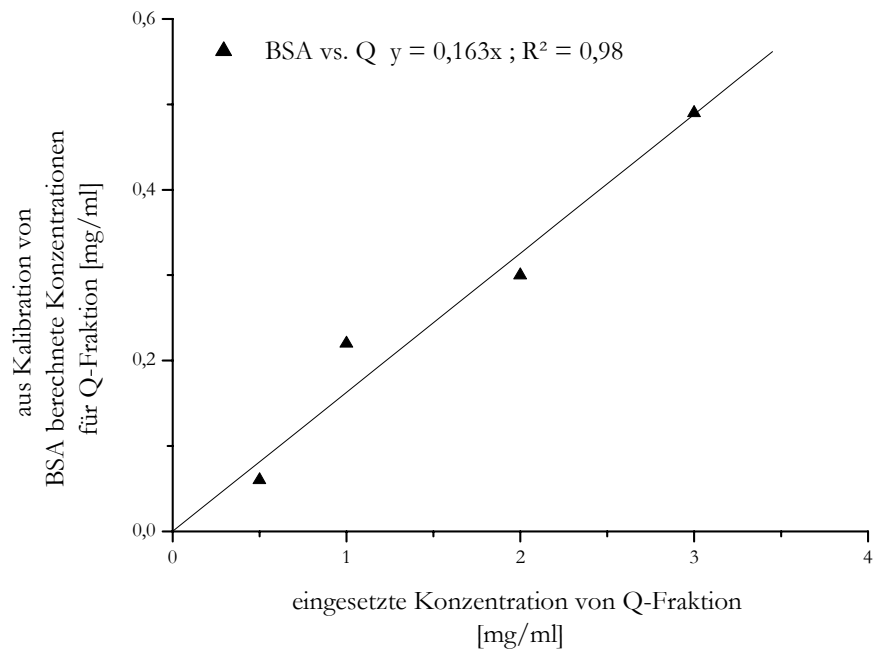


Abbildung 6.6 Kalibration/Korrelation von Standardkonzentrationen (BSA = Bovine Serum Albumin) mit Q Fraktionen bei Messungen mit CE

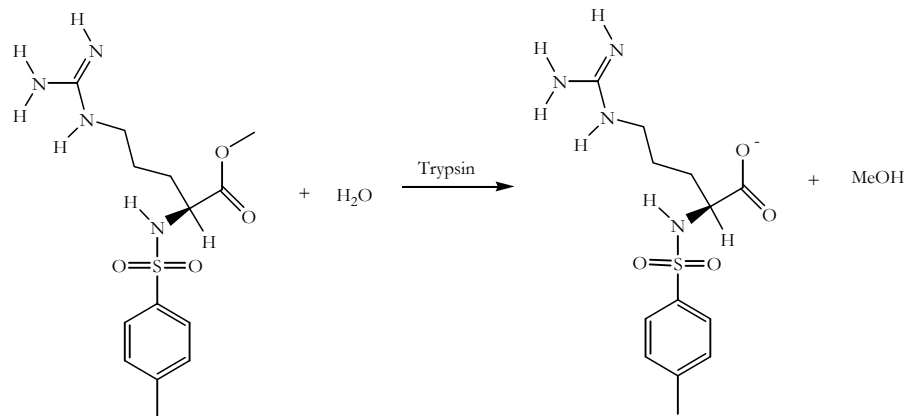
6.1.5 Enzymreaktion N- α -Tosyl-L-ArgininmethylesterN- α -Tosyl-L-Argininmethylester (TAME)

Abbildung 6.7 Reaktionsgleichung der Enzymreaktion von N- α -Tosyl-L-Argininmethylester (TAME) mit Trypsin

6.1.6 Reaktionsbedingungen für Protease-Inhibitor-Assay

IN DURCHFLUSSKÜVETTEN

Puffer:	50 mM TRIS-HCl, pH 8,3 mit 10 mM Calciumchlorid
Substrat-Stammlösung:	0,5 mg/ml TAME
Substrat-Konzentration im Ansatz:	0,4 mg/ml (~ 1mM)
Trypsin-Stammlösung:	1 mg/ml
Trypsin-Konzentration im Ansatz:	0,001 mg/ml
Reaktionsvolumen:	10 ml
Schichtdicke:	1 cm
Temperatur:	Raumtemperatur (RT)
Wellenlänge:	247 nm

8 ml Substrat-Stammlösung und 1,98 ml TRIS-Puffer in der Durchflussküvette vorlegen. Trypsin und Trypsin-Inhibitor bzw. Probe (1:1; v:v; hier 0,05 ml) für 15 min inkubieren und 20 μ l davon zu der restlichen Reaktionslösung in die Küvette geben um die Reaktion zu starten.

IN HALBMIKROKÜVETTEN

Puffer:	50 mM TRIS-HCl, pH 8,3 mit 10 mM Calciumchlorid
Substrat-Stammlösung:	1,0 mg/ml TAME
Substrat-Konzentration im Ansatz:	0,4 mg/ml (~ 1mM)
Trypsin-Stammlösung:	0,1 mg/ml
Trypsin-Konzentration im Ansatz:	0,001 mg/ml
Reaktionsvolumen:	1 ml
Schichtdicke:	1 cm
Temperatur:	25 °C
Wellenlänge:	247 nm

0,58 ml TRIS-Puffer und 0,4 ml TAME-Lösung werden in UV-Halbmikroliterküvetten bei 25 °C 15 Minuten lang vortemperiert. Trypsin und Trypsin-Inhibitor bzw. Probe (1:1; v:v; hier 0,05 ml) werden für 15 min ebenfalls bei 25 °C inkubiert. Zum Starten der Reaktion werden davon anschließend 20 µl zu der restlichen Reaktionslösung in die Küvette gegeben.

6.1.7 Bestimmung des molaren Extinktionskoeffizienten

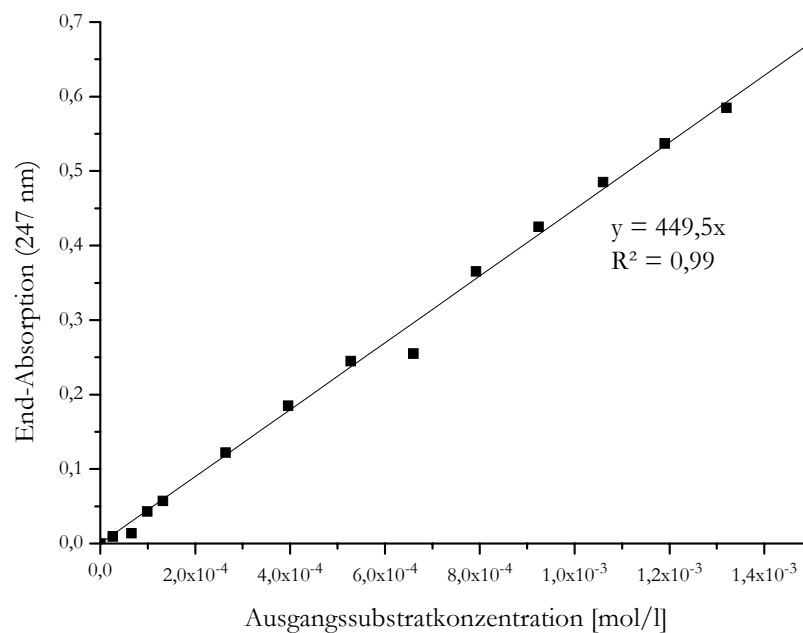


Abbildung 6.8 Ausgangssubstratkonzentration (TAME) versus Endabsorption

6.1.8 Inhibierung der Trypsinaktivität mit Trypsin-Inhibitoren

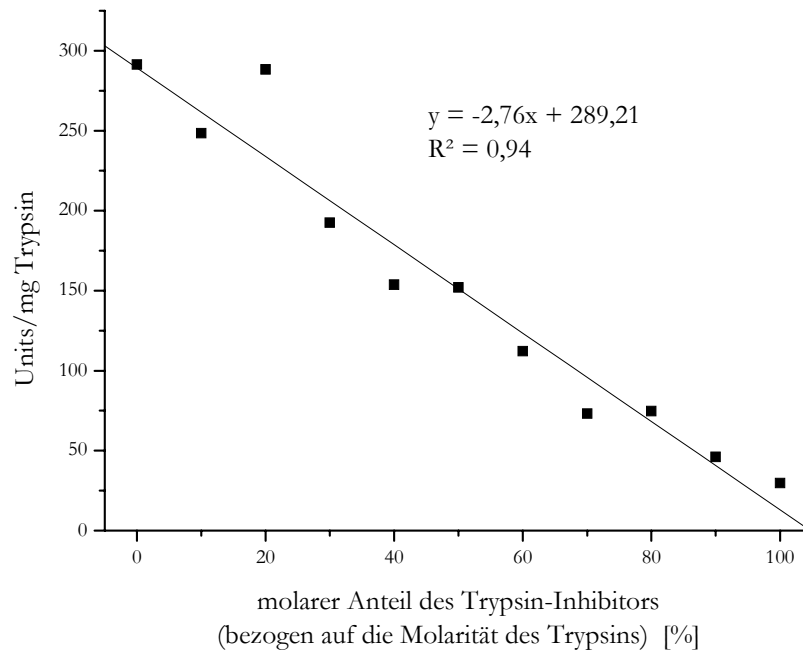


Abbildung 6.9 Inhibierung der Trypsinaktivität mittels Trypsin-Inhibitor; 0-100 % molarer Anteil des Trypsin-Inhibitors (bezogen auf die Molarität des Trypsins)

6.1.9 Enzymreaktion p-Nitrophenolcaprat

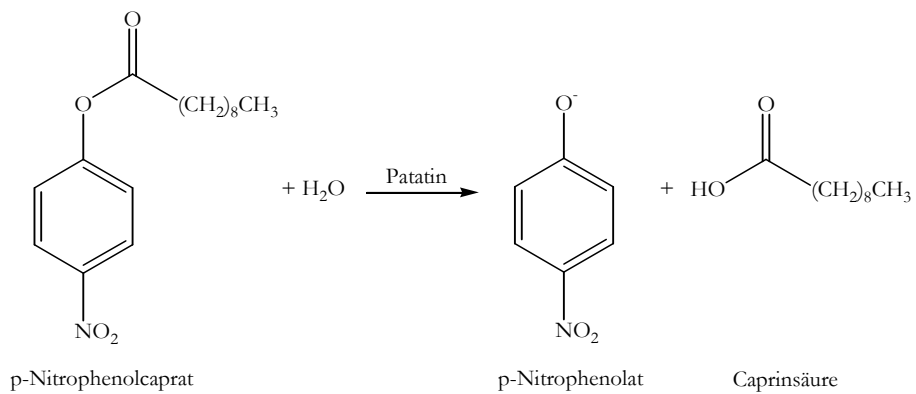


Abbildung 6.10 Reaktionsgleichung der Enzymreaktion von p-Nitrophenolcaprat mit Patatin

6.1.10 Reaktionsbedingungen für Patatin-Enzym-Assay

IN HALBMIKROKÜVETTEN

Puffer:	10 mM TRIS-HCl, pH 8 (in bidest. H ₂ O)
Triton:	4 mM Triton X-100 (10 mM TRIS-HCl-Puffer)
Substrat-Stammlösung:	10 mM p-Nitrophenolcaprat (in ACN, HPLC-grade)
Substrat-Konzentration im Ansatz:	0,1 mM
Extinktionskoeffizient:	16888 L/(mol*cm) [23]
Reaktionsvolumen:	1 ml
Schichtdicke:	1 cm
Temperatur:	Raumtemperatur (RT)
Wellenlänge:	400 nm

Alle Lösungen werden bei RT 10 Minuten lang bei 25 °C vortemperiert. 0,69 ml TRIS-Puffer, 0,01 ml p-Nitrophenolcaprat-Lösung und 0,25 ml Triton-Lösung werden anschließend direkt vor der Messung in den Halbmikroliterküvetten gemischt. 50 µl der Probe werden (ggf. mit Puffer verdünnt) zum Starten der Reaktion zu der Lösung gegeben.

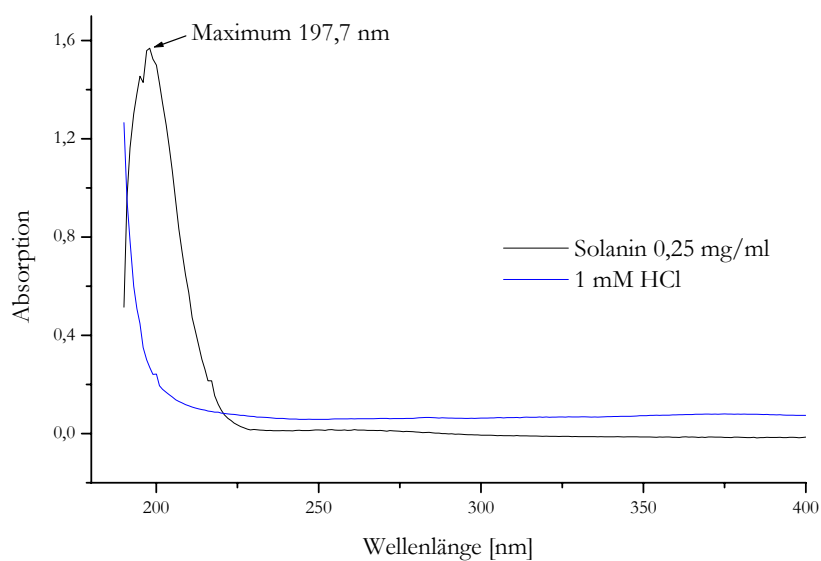
6.1.11 Wellenlängenscan von α -Solanin

Abbildung 6.11 Wellenlängenscan von α -Solanin und dem verwendeten Lösungsmittel (1 mM HCl)

6.1.12 Säulenvergleich für Glykoalkaloid-Analytik

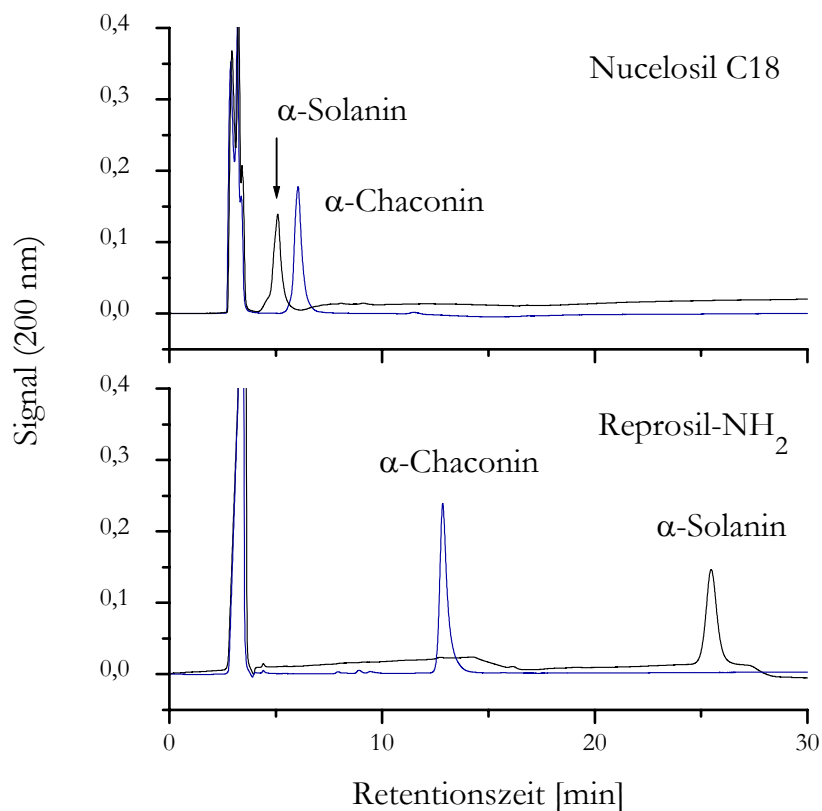


Abbildung 6.12 HPLC-Chromatogramme von α -Chaconin und α -Solanin; Säulen: Nucleosil 100 C18 EC (5 μ m, 250 x 4,6 mm), Reprosil-pur NH₂ (5 μ m, 250 x 4 mm); 30 °C; Injektion: 20 μ l; Eluenten: 25 % A: 20 mM KH₂PO₄, pH 6, 75 % B: ACN; Flussrate: 0,7 ml/min

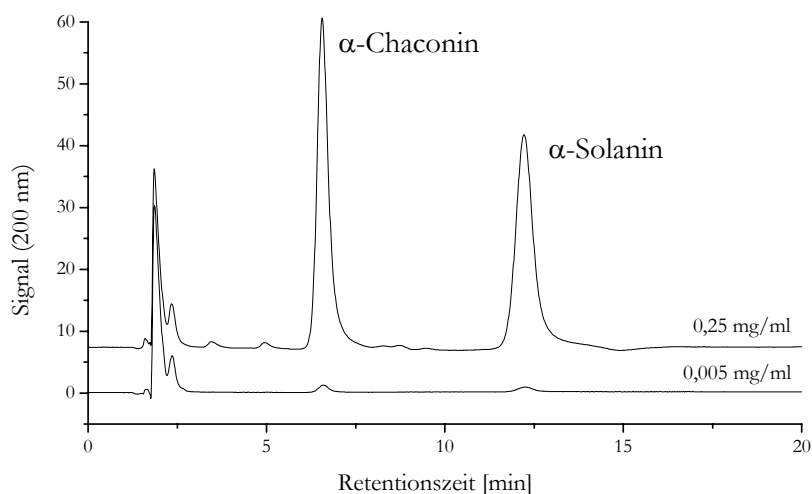
6.1.13 Chromatogramme für α -Chaconin und α -Solanin

Abbildung 6.13 HPLC-Chromatogramm von 2 Standardkonzentrationen von α -Chaconin (6,5 min) und α -Solanin (12,2 min); Säule: Reprosil-pur NH₂ (5 μ m, 250 x 4 mm); Temperatur: 40 °C; Injektionsvolumen: 20 μ l; Eluenten: 25 % A: 20 mM KH₂PO₄, pH 6, 75 % B: ACN; Flussrate: 1,3 ml/min

6.1.14 SPE-Material Oasis-HLB

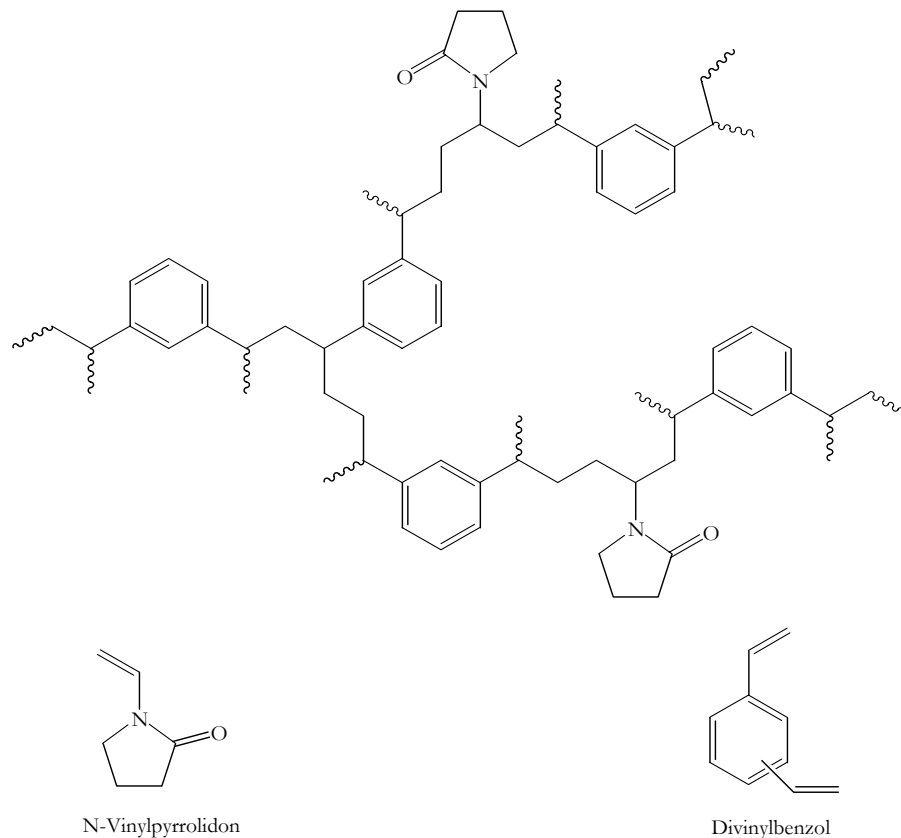


Abbildung 6.14 Struktur von Oasis HLB (Hydrophilic-Lipophilic-Balance) SPE-Sorbensmaterial (hydrophiles N-Vinylpyrrolidon und lipophiles Divinylbenzol) [124]

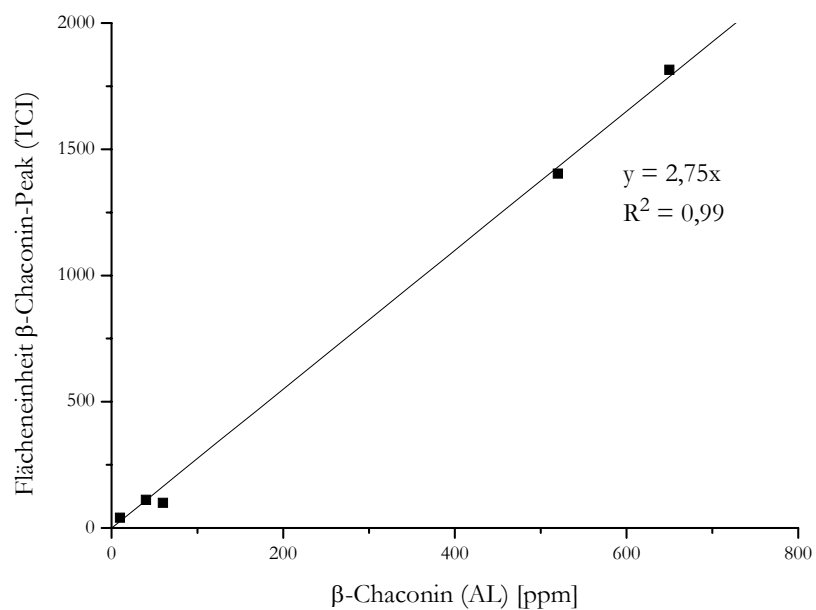
6.1.15 Kalibration von β -Chaconin

Abbildung 6.15 Kalibration des β -Chaconin-Peaks (TIC) mit Hilfe der β -Chaconin-Konzentration (AL); lineare Regression ergibt Gradengleichung und Bestimmtheitsmaß R^2

6.1.16 Hep-G2-Zellen

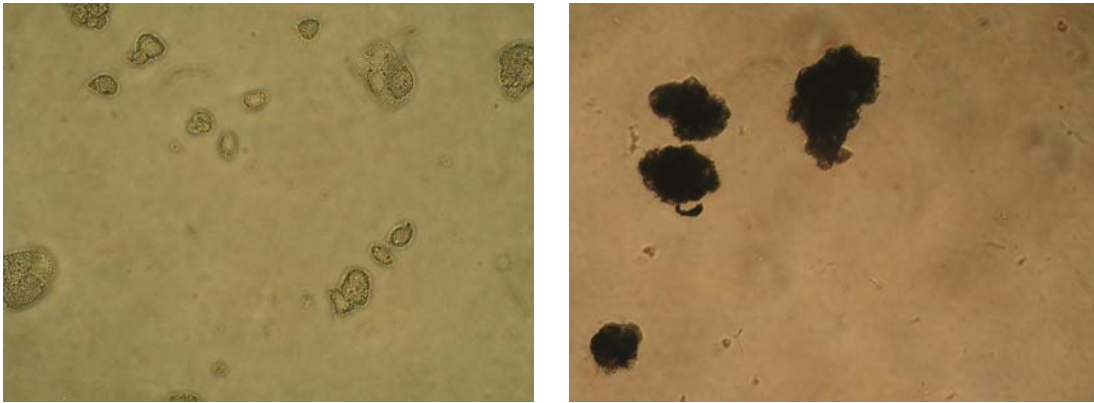


Abbildung 6.16 Links: unbehandelte Hep-G2-Zellen; rechts: Hep-G2-Zellen mit MTT behandelt → Kristalle der umgesetzten Formanzansalze erkennbar als Nadeln; Vergrößerung: 200-fach

6.2 Methoden

6.2.1 Zip-Tip-Aufreinigung

SCX NACH [125]:

- Probenvorbereitung: Probe in 0,1 % TFA (in bidest. H₂O) aufnehmen; pH < 4
 Äquibrierung: 0,1 % TFA in bidest. H₂O (10 µl, 3 Zyklen)
 Probenaufgabe: (10 µl, 10-15 Zyklen)
 Waschen: 0,1 % TFA in bidest. H₂O (10 µl, 5 Zyklen)
 1. Elution: 5 % Ammoniumhydroxid/30 %Methanol (2 µl)

C18 NACH [126]:

- Benetzung: 100 % Acetonitril (10 µl, 2 Zyklen)
 Probenvorbereitung: Probe in 0,1 % TFA (in bidest. H₂O) aufnehmen; pH < 4
 Äquibrierung: 0,1 % TFA in bidest. H₂O (10 µl, 2 Zyklen)
 Probenaufgabe: (10 µl, 7-10 Zyklen)
 Waschen: 0,1 % TFA in bidest. H₂O (10 µl, 2 Zyklen)
 1. Elution: 0,1 % TFA in 50 % Acetonitril (1-4 µl)
 2. Elution: 0,1 % TFA in 100 % Acetonitril (1-4 µl)

6.2.2 Spülschritte für Kapillarelektrophorese

20 psi	2 – 3 min	0,1 M NaOH
20 psi	2 – 3 min	H ₂ O
20 psi	2 – 3 min	Puffer

6.2.3 Aminosäure-HPLC

Säule:	Waters Resolve C18, 5 μ m, 150 x 3,9 mm
Eluent A:	13,6 g Natriumacetat-Trihydrat und 12,0 g Natriumdihydrogenphosphat in ca. 2 ml bidest. H ₂ O lösen: 5 ml 10 M NaOH zugeben und mit NaOH auf pH 7 einstellen, dann auf 2 l auffüllen; filtrieren; 42 ml THF und 42 ml Methanol zugeben
Eluent B:	1080 ml Methanol in 920 ml bidest. H ₂ O
Temperatur:	30 °C
Detektion:	Fluoreszenz Ex: 330 nm Em: 420 nm
Gradient	0-50 min 0-100 % B; 50-55 min 100 % B; 55-60 min 100-0 % B; 60-67 min 0 % B
Flussrate:	1 ml/min
Injektionsvolumen:	10 μ l
OPA-Reagenz:	270 mg Ortho-Phthaldialdehyd (OPA) in 5 ml Ethanol (p.A.) auflösen. 200 μ l Mercaptoethanol (MCE) zufügen und mit 0,4 M Boratpuffer (12,36 g Borsäure/500ml) pH 9,5 auf 50 ml auffüllen. Die Lösung 24 h „altern“ lassen. Jede Woche ca. 20 μ l MCE als Oxidationsschutz zugeben. Die Lösung ist ca. 4 Wochen haltbar.
Derivatisierung:	15 μ L Probe werden mit 50 μ l OPA-Reagenz versetzt und gemischt. Nach 1,5 Minuten Inkubationszeit werden 10 μ l Probe auf die Säule gegeben. Derivatisierung und Probenaufgabe wird von einem Autosampler durchgeführt.

6.2.4 Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von Proteinen wurde die Polyacrylamid-SDS-Gelelektrophorese verwendet. Polyacrylamid ist ein Polymer aus Acrylamid und vernetzendem Bisacrylamid, ein Gel mit 15 % Acrylamidkonzentration besitzt eine Porengröße von etwa 4 nm [113].

Die Proteinproben wurden in einem Auftragspuffer, der SDS und β -Mercaptoethanol enthält, kurz aufgekocht. Das β -Mercaptoethanol spaltet Cystinbrücken im Protein und wirkt auf diese Weise, neben dem Aufkochen selbst, denaturierend. Das Protein zerfällt in die Untereinheiten, die auf dem Gel sichtbar werden. Das SDS ist ein anionisches Detergens und bildet negativ geladene Protein-SDS-Micellen mit einer stark negativen Ladung, die die Eigenladung des Proteins effektiv überdeckt. Es bildet sich eine konstante Ladung pro Masse aus. Alle Proteine wandern daher zur Anode und werden der Masse nach aufgetrennt, kleine Proteine wandern schneller.

Es wurden Gele mit einer Acrylamidkonzentration von 12,5 oder 15 % verwendet. Als Laufpuffer wurde ein Tris-Glycin-Puffer verwendet, als Puffer im Sammelgel ist

standardmäßig Tris/HCl pH 6,8, im Trenngel Tris/HCl pH 8,8 vorhanden.

Die Färbung der Proteine im Gel wurde entweder durch Silberfärbung oder mit dem Farbstoff Coomassie Brilliant Blue durchgeführt. Die Silberfärbung ist eine äußerst empfindliche Methode zum Nachweis von Proteinen in Acrylamidgelen. Sie beruht darauf, dass die Proteine zunächst im Gel fixiert werden (durch kurzkettige Alkohole oder TCA). Nach Sensitivierung durch Natriumthiosulfat wird das Gel in eine Silbernitratlösung eingelegt, wodurch einige Silberionen von den Proteinen gebunden werden und durch schwefelhaltige Aminosäuren (Methionin, Cystein) zu Silberatomen reduziert werden, die als Keime für die „Entwicklung“ dienen. Hierzu wird das Gel in ein starkes Reduktionsmittel wie Formaldehyd gelegt, wodurch die an die Proteine gebundenen Silberionen reduziert werden und Proteinbanden sichtbar werden. Um eine zu starke Färbung zu vermeiden, wird die Reaktion durch Einlegen des Gels in verdünnte Essigsäure gestoppt.

Die Färbung mit Coomassie Brilliant Blue ist nicht so empfindlich wie die Silberfärbung. Sie wurde als Vorbereitung für den tryptischen Verdau vom SDS-Gel eingesetzt. Die Silberfärbung ist hier nicht geeignet, da die Bindung von metallischem Silber an Proteine recht stark ist und eine Veränderung des Molekulargewichts mit sich bringt. Coomassie hingegen bindet reversibel an kationische und hydrophobe Aminosäurereste. Zur Färbung wurde das Gel kurz in eine Lösung von Coomassie-Blue-Färbetabletten gelegt. Zur Entfärbung des Gels wurde es mehrfach in einer wässrigen 7 %-igen Essigsäurelösung aufgeköcht.

6.2.5 Tryptischer Verdau vom SDS-Gel

Der tryptische Verdau vom SDS-Gel ist im Rahmen der Proteomics eine Standardmethode geworden. Trypsin ist eine Endoprotease, die spezifisch auf der C-Seite von Arginin und Lysin spaltet. Die Methode beruht darauf, dass die Bande eines Proteins (1-D-Gel) bzw. der Proteinspot (2-D-Gel) mit Trypsin behandelt wird, auf diese Weise lässt sich ein für jedes Protein spezifisches Peptidmuster herstellen, über einen Datenbankabgleich lässt sich das Protein identifizieren.

Das für die Experimente verwendete Trypsin war „Trypsin Gold Mass Spectrometry Grade“ der Firma Promega, Madison (USA). Dieses Trypsin ist durch Methylierung der Lysin-Reste weitestgehend gegen Autolyse resistent. Es wird nach dem mitgelieferten Arbeitsprotokoll gearbeitet.

Zunächst wird die gewünschte Proteinbande des mit Coomassie gefärbten und mit 7 % Essigsäure entfärbten Polyacrylamid-Geles mit einem sauberen Skalpell ausgeschnitten. Das Gelstück wird in ein 1,5 ml Eppendorfreaktionsgefäß, das vorher zweimal mit 50 % Acetonitril (ACN) und 0,1 % Trifluoressigsäure (TFA) gespült wird, überführt. Es wird dann zweimal 45 Minuten mit 0,2 ml einer Lösung aus 100 mM $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ (pH 7,8), 50 % ACN bei 37 °C inkubiert. Während dieser Zeit entfärbt sich das Gel nahezu vollständig und wird milchig-trübe. Nun wird das Gelstück 5 Minuten in 0,1 ml 100 % ACN eingelegt, das Gel wird weiß und sehr klein. Das Gelstück wird daraufhin 15 Minuten in der Lyophilie

getrocknet.

Anschließend werden 2 µl einer Lösung von 100 µg Trypsin in 100 µl 50 mM Essigsäure mit 98 µl einer Lösung von 40 mM $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ (pH 7,8), 10 % ACN versetzt und 20 µl dieses Gemisches auf das Gelstück gegeben. Es wird eine Stunde bei Raumtemperatur stehengelassen. Während dieser Zeit wird das Gel wieder durchsichtig und nimmt seine ursprüngliche Größe an. Nach Zugabe von 100 µl 40 mM $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ (pH 7,8), 10 % ACN inkubiert man über Nacht bei 37 °C.

Am nächsten Tag wird das Reaktionsgemisch mit 150 µl Wasser versetzt, 10 Minuten inkubiert und der Überstand aufbewahrt. Das Gel wird zweimal 60 Minuten mit 50 µl einer Mischung aus 50 % ACN, 5 % TFA versetzt. Man vereinigt alle Überstände und trocknet über Nacht in der Lyophilie.

Nun werden die erhaltenen Peptide mittels der ZipTip®SCX –Pipettenspitze der Firma Millipore, Bedford (USA) aufgereinigt (siehe Anhang 6.2.1). Diese Pipettenspitzen besitzen ein Strong Cation Exchange (SCX)-Austauschermaterial in der Spitze, das sich für die Peptidaufreinigung bewährt hat.

6.2.6 Mikrobiuret

Diese Proteinbestimmung wurde 1953 zuerst veröffentlicht [127]. Die zugrunde liegende Reaktion ist die Bildung eines violetten Komplexes aus Cu^{2+} -Ionen und den Stickstoffatomen aus Peptidbindungen (Abbildung 6.17) in alkalischer Lösung:

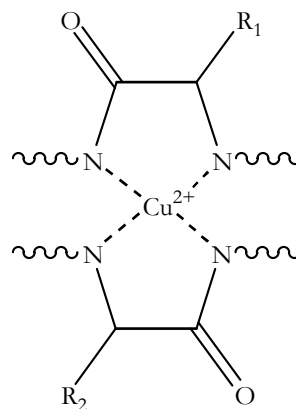


Abbildung 6.17 Struktur des Protein-Kupfer-Komplexes beim Mikrobiuret-Test, nach [113]

Die Messung des Farbstoffkomplexes kann entweder bei 550, 540 oder in Quarzküvetten bei 330 nm durchgeführt werden, wobei die Messung bei 330 nm etwa um einen Faktor 10 empfindlicher ist als die Messung im sichtbaren Bereich.

Die Vorteile des Biuret-Assays liegen in der guten Reproduzierbarkeit der Ergebnisse. Eine aufgenommene Kalibrationsreihe kann mehrfach verwendet werden, wenn in der gleichen Quarzküvette und dem gleichen Photometer gemessen wird. Ein Nachteil dieses Tests ist die Unempfindlichkeit, die Nachweisgrenze liegt bei 1-10 µg/ml, was bei den hohen Proteingehalten in Kartoffelfruchtwasser aber unerheblich ist. Der Test ist recht aufwendig.

Außerdem stören verschiedene Salze und oxidierende und reduzierende Substanzen, was jedoch umgangen werden kann, indem die Proteine vor der eigentlichen Färbung mit Trichloressigsäure (TCA) gefällt werden.

Für die Proteinbestimmung wurde zunächst das „Benedict-Reagenz“ angesetzt. Hierzu wurden 17,3 g Natriumcitrat und 10 g Natriumcarbonat in 80 ml Wasser gelöst und filtriert. Zum Filtrat wurde eine Lösung von 1,73 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ zugesetzt und das Volumen auf 100 ml aufgefüllt. Das Natriumcitrat dient als Chelatkomplexbildner für die Kupferionen, deren Ligandenbindungsstellen nicht komplett durch die Peptidbindungen abgesättigt werden. Hierdurch wird die Farbintensität gesteigert.

Im Versuch wurden 0,2 ml Probe bzw. Verdünnung mit 0,2 ml 20 % TCA-Lösung versetzt. Der entstehende Proteinniederschlag wurde abzentrifugiert und der Überstand entfernt. Um Verdünnungseffekte zu vermeiden, nimmt man an der Gefäßwand haftende Tröpfchen mit Filterpapier oder einem Q-Tip ab. Das Proteinpellet wurde dann in 0,5 ml einer Mischung aus 4 ml 0,75 N NaOH und 0,2 ml Benedict-Reagenz vollständig gelöst. Nach 15 Minuten Inkubation, die zur Gleichgewichtseinstellung nötig sind, setzt man 0,5 ml Wasser zu und misst im Photometer gegen eine Blindprobe aus Wasser, 0,75 N NaOH und Benedict-Reagenz.

6.2.7 Keimzahlbestimmung

Es wurde von allen Proben, deren Keimzahl bestimmt werden sollte, auf Mikrotiterplatten logarithmische Verdünnungsreihen angesetzt. Es wird in die erste Vertiefung 200 μl Probe vorgelegt, in die zweite bis achte Vertiefung 180 μl 0,9 % Kochsalzlösung. Nun wird in die zweite Vertiefung 20 μl aus der ersten Vertiefung pipettiert, so dass eine 1:10-Verdünnung entsteht. Auf diese Weise werden acht verschiedene Verdünnungsstufen von 1:1 bis 1:10⁷ hergestellt, von denen jeweils 25 μl auf die verschiedenen Positionen des LB-Agars getropft werden. Die Platten werden trocknen gelassen und dann über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wird die Anzahl der Kolonien bei verschiedenen Verdünnungsstufen ausgezählt, bei niedrigen Verdünnungsstufen erhält man erfahrungsgemäß einen dichten Bakterienrasen und bei hohen Verdünnungen nur wenige bis keine Kolonien. Es wird die niedrigste Verdünnungsstufe, bei der die Kolonienzahl zu zählen ist, ausgezählt und über Multiplikation mit dem Verdünnungsfaktor und einem Faktor 40 (da 25 μl ausplattiert wurden), die Keimzahl pro ml bestimmt.

6.2.8 Methoden und Ergebnisse zur Hydrolyse von KFW

SALZSAURE HYDROLYSE

Hierzu wurde 1 ml des eingefrorenen Kartoffelfruchtwassers mit 5 ml 6 N HCl versetzt und für 20 Stunden bei 110 °C im Trockenschrank inkubiert. Nach dem Abkühlen wurde mit 5 ml 6 N NaOH neutralisiert sowie der Gesamtaminosäuregehalt und der Proteingehalt bestimmt. Als Vergleichsprobe diente eine Probe von 1 ml Kartoffelfruchtwasser in 10 ml 3 M NaCl.

ENZYMATISCHE HYDROLYSE VON KFW MIT PAPAIN

Die Hydrolyse wurde mit der Protease Papain durchgeführt. Es wurde ein pH-Wert von 6,0 eingestellt. Der pH-Wert wurde dann während der Hydrolyse konstant bei 6,2 gehalten, die Temperatur bei 30 °C. Papain wurde in einer Lösung von 40 mg (120 U) in 500 µl Wasser eingesetzt. Abbildung 6.18 zeigt die Veränderung von Proteingehalt, Aminosäuregehalt und Volumen der zugegebenen Natronlauge im Verlauf der Hydrolyse.

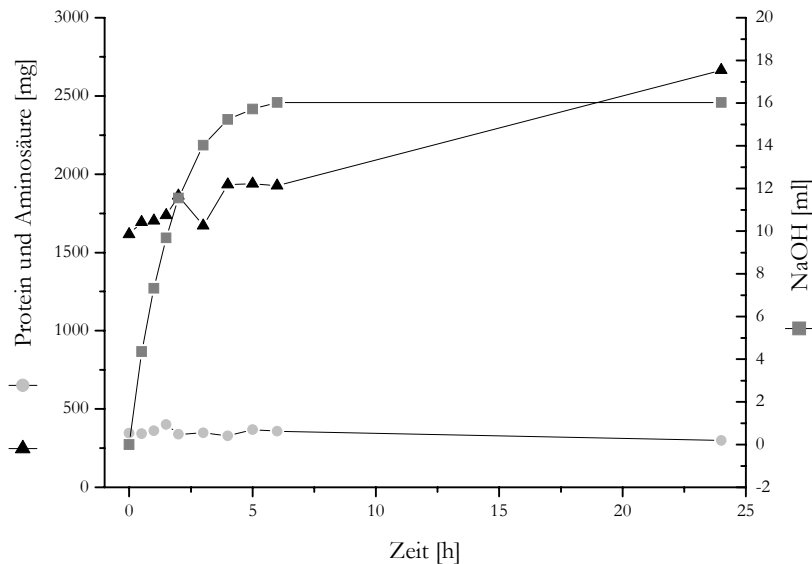


Abbildung 6.18 Hydrolyse von nativem Kartoffelfruchtwasser mit Papain, 30 °C, pH 6,2

Man erkennt, dass die Aminosäuremenge konstant bei etwa 350 mg bleibt. Die Proteinmenge scheint hier sogar leicht von 1600 mg auf 1900 mg zuzunehmen, der Wert von 2664 mg für die Proteinmenge nach 24 h erscheint sehr hoch, kann aber durch im Verlaufe des Versuchs zunehmendes Mikroorganismenwachstum möglich sein. Es sind keine Proteine zu Aminosäuren abgebaut worden, und es lässt sich sagen, dass keine Hydrolyse stattgefunden hat. Die im nativen Kartoffelfruchtwasser vorhandenen Proteine lassen sich demnach nicht mit Papain hydrolysieren.

ENZYMATISCHE HYDROLYSE VON KFW MIT TRYPSIN

Zur Hydrolyse wurde die Protease Trypsin verwendet. Der pH-Wert wurde auf 7,6 eingestellt, letzterer wurde im Verlauf der Hydrolyse konstant gehalten. Die Temperatur wurde während des Versuches bei 30 °C gehalten. Trypsin wurde in einer Lösung von 1,5 mg in 500 µl Wasser eingesetzt, was einer recht großen Aktivität von 2700 U entspricht. Diese hohe Aktivität wurde gewählt, da eine große Menge von Trypsin-Inhibitoren im KFW vermutet wird. Die Messergebnisse des Versuches zeigt Abbildung 6.19.

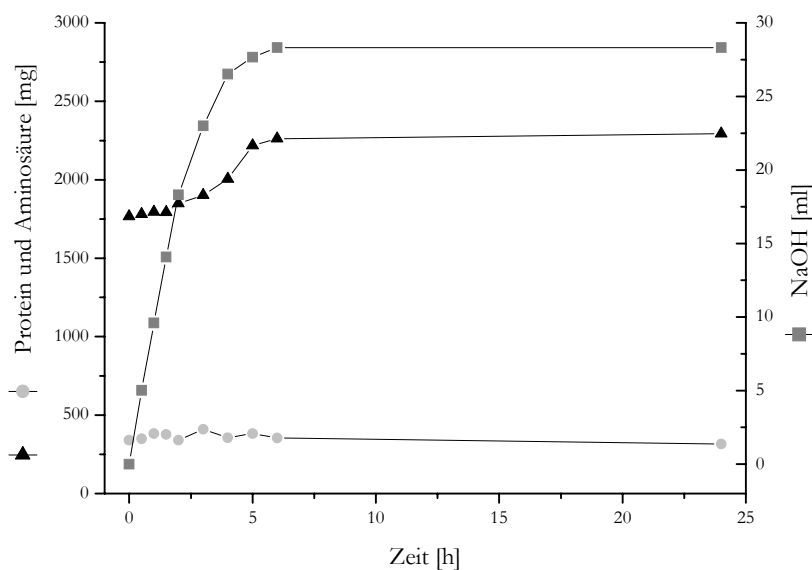


Abbildung 6.19 Hydrolyse von nativem Kartoffelfruchtwasser mit Trypsin, 30 °C, pH 7,6

Die Messergebnisse ähneln denen der Papain-Hydrolyse: Die Aminosäuremenge bleibt konstant, die Proteinmenge nimmt leicht zu. Es lässt sich hier sagen, dass keine Hydrolyse stattgefunden hat. Die im nativen Kartoffelfruchtwasser vorhandenen Proteine lassen sich auch nicht mit Trypsin hydrolysieren.

ENZYMATISCHE HYDROLYSE VON KFW MIT ALCALASE/FLAVOURZYME

Der pH-Wert wurde auf 7,0 eingestellt und 200 µl der Alcalase-Lösung (480 U) in 800 µl Wasser zugesetzt. Für eine Stunde wurden die Temperatur bei 55 °C und der pH-Wert bei 7,0 gehalten. Nach einer Stunde wurde der pH-Wert mit auf 6,0 eingestellt und die Temperatur auf 50 °C gesenkt. Nun wurden 200 µl der Flavourzyme-Lösung (200 U) in 800 µl Wasser zugesetzt und die Bedingungen bis zum Versuchsende konstant gehalten.

ENZYMATISCHE HYDROLYSE VON HITZEXOAGULIERTEM KARTOFFELPROTEIN MIT ALCALASE/FLAVOURZYME

Es wurden 3 g der hitzexoagulierten Probe (Muster-Nr. 012358, Emsland-Stärke GmbH) in Wasser gelöst und im Reaktor vorgelegt. Der pH-Wert wurde auf 7,0 eingestellt und 200 µl Alcalase-Lösung in 800 µl Wasser zugesetzt. Für eine Stunde wurden die Temperatur bei 55 °C und der pH-Wert bei 7,0 gehalten. Nach einer Stunde wurde der pH-Wert auf 6,0 eingestellt und die Temperatur auf 50 °C gesenkt. Nun wurden 200 µl der Flavourzyme-Lösung in 800 µl Wasser zugesetzt und die Bedingungen bis zum Versuchsende konstant gehalten.

ENZYMATISCHE HYDROLYSE VON HITZEXOAGULIERTEM KARTOFFELPROTEIN DURCH MEHRFACHE ZUGABE VON ALCALASE/FLAVOURZYME

2 g hitzEXOaguliertes Kartoffelprotein (Muster-Nr. 012358, Emsland-Stärke GmbH) wird in 80 ml Wasser gelöst und abzentrifugiert. Es wurde versucht, diese Proteinlösung durch Fällung mit Ammoniumsulfat von den Polyphenoloxidasen zu befreien (Ergebnisse zur fraktionierten Ammoniumsulfatfällung nicht gezeigt). Die wieder aufgenommene Kartoffelproteinlösung wurde im Reaktor vorgelegt. Die restliche noch vorhandene Polyphenoloxidase wurde während des Versuches mit Ascorbinsäure gehemmt. Der pH-Wert wurde auf 6,5 eingestellt. Die Temperatur betrug 52,5 °C. Diese Werte wurden während des Versuchs konstant gehalten. Nach 0 h, 2 h, 4 h und 6 h wurde zum Reaktor jeweils eine Mischung aus 200 µl Alcalase, 200 µl Flavourzyme und 50 mg Ascorbinsäure in 600 µl Wasser zugesetzt.

KEIMZAHLBESTIMMUNG

Tabelle 6.1 Keimzahlbestimmung von Kartoffelfruchtwasserproben aus den Versuchen zur enzymatischen Hydrolyse mit Papain

natives KFW, Papain, 30°C					
Zeit [h]	Koloniezahl	Verdünnungsfaktor	Anzahl Keime/25 µl	Anzahl Keime/ml	log Keimzahl
0	30	10	300	12.000	4,08
1	41	10	410	16.400	4,21
3	70	10	700	28.000	4,45
6	3	1.000	3.000	120.000	5,08
24	67	10.000	670.000	26.800.000	7,43

Tabelle 6.2 Keimzahlbestimmung von Kartoffelfruchtwasserproben aus den Versuchen zur enzymatischen Hydrolyse mit Alcalase/Flavourzyme

natives KFW, Alcalase/Flavourzyme, 50-55°C					
Zeit [h]	Koloniezahl	Verdünnungsfaktor	Anzahl Keime/25 µl	Anzahl Keime/ml	log Keimzahl
0	37	10	370	14.800	4,17
1	26	10	260	10.400	4,02
3	34	10	340	13.600	4,13
6	2	1.000	2.000	80.000	4,90
24	101	10.000	1.010.000	40.400.000	7,61

Tabelle 6.3 Keimzahlbestimmung von hitzeokoagulierten Kartoffelfruchtwasserproben aus den Versuchen zur enzymatischen Hydrolyse mit Alcalase/Flavourzyme

hitzeokoaguliertesKFW, Alcalase/Flavourzyme, 50-55°C					
Zeit [h]	Koloniezahl	Verdünnungsfaktor	Anzahl Keime/25 µl	Anzahl Keime/ml	log Keimzahl
0	2	1	2	80	1,90
1	3	1	3	120	2,08
3	6	1	6	240	2,38
6	39	100	3.900	156.000	5,19
24	39	100.000	3.900.000	156.000.000	8,19

6.2.9 Wiederfindung von α -Chaconin und α -Solanin

Stammlösung: 0,25 mg/ml α -Solanin in HCl, pH 3

Stammlösung: 0,25 mg/ml α -Chaconin in HCl, pH 3

Extraktionslösung: 1 g Probe in 20 ml

Tabelle 6.4 Schema zur Herstellung der Probenmatrix mit definierter Standard-Konzentration von α -Chaconin und α -Solanin

Konzentration [mg/ml]	Stammlösung α -Solanin bzw. α -Chaconin [ml]	Extraktionslösung (mit 1 g Probe) [ml]
0,1	0,8	1,2
0,05	0,4	1,6

Stammlösung: 0,125 mg/ml α -Solanin und 0,125 mg/ml α -Chaconin in HCl, pH 3

Extraktionslösung: 1 g Probe in 20 ml

Tabelle 6.5 Schema zur Herstellung der Probenmatrix mit definierter Standard-Konzentration von der Mischung aus α -Chaconin und α -Solanin

Konzentration [mg/ml]	Stammlösung α -Solanin bzw. α -Chaconin [ml]	Extraktionslösung (mit 1 g Probe) [ml]
0,1	1,6	0,4
0,05	0,8	1,2

6.2.10 Zellkultur

Die Hep- G2-Zellen (humanes Leberkarzinom) wurden in DME-Medium mit 10 % FKS bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert und dabei alle 3-4 Tage umgesetzt.

6.2.11 MTT-Assay

Mit dem MTT-Assay kann die Vitalität von Zellkulturen bestimmt werden. Das MTT, welches als gelbes Salz vorliegt, kann von Dehydrogenasen in den Mitochondrien lebender Zellen zu einem blau-violetten Formazan-Komplex reduziert werden (Abbildung 6.20).

Das Absorptionsverhalten dieses Komplexes kann nachfolgend bei 570 nm im Immunoreader gemessen werden. Eine Referenzmessung erfolgt bei 620 nm.

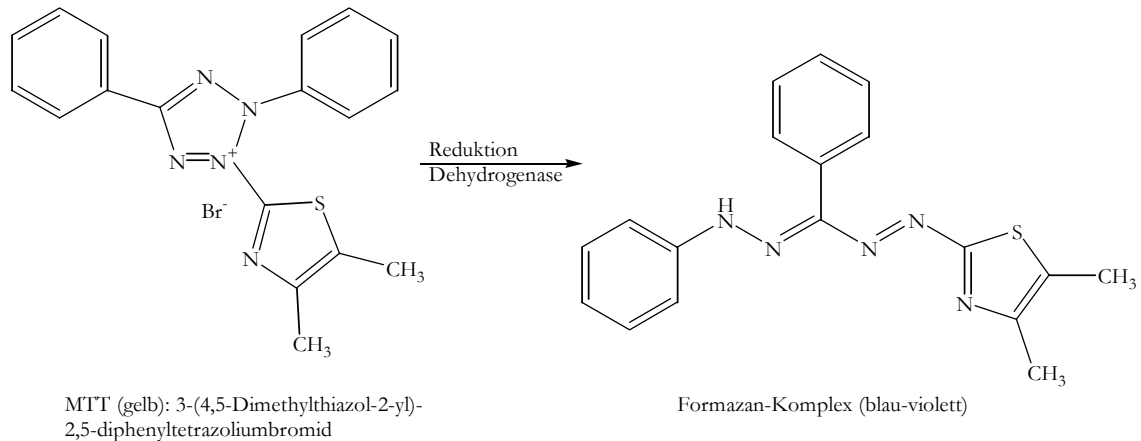


Abbildung 6.20 Reduktion von MTT zum Formazan-Komplex

Es wird eine Stammlösung aus 5 mg MTT in 1 ml PBS angesetzt. Für die Durchführung werden 96-well Platten verwendet. Pro well werden 10×5^4 Zellen in 100 μl Medium vorgelegt. Die Zellen benötigen (mindestens) 24 Stunden im Brutschrank (37 °C, 5 % CO_2), um an den Wänden der wells anwachsen zu können. Anschließend werden die verschiedenen α -Solaninkonzentrationen (je 1 μl) nach der Berechnung in Tabelle 6.6 zu den Zellen gegeben. Als Stammlösung dient eine Lösung von 10 mg α -Solanin in 1 ml DMSO. Die sich daraus nach 1:100-Verdünnung ergebende höchste DMSO-Konzentration in den Zellen ist 1 %.

Tabelle 6.6 Verdünnungen und Berechnungen zu den eingesetzten α -Solanin-Konzentrationen

Verdünnungen	α -Solanin-Konzentration [mg/ml]	Eingesetzte Menge	Arbeits- konzentration [$\mu\text{g/ml}$]
Stammlösung	10		100
1:2	5	je 1 μl werden auf 100	50
1:10	1	μl Medium gegeben	10
1:20	0,5	→ daraus ergibt sich	5
1:100	0,1	eine 1:100-	1
1:1000	0,01	Verdünnung	0,1

Daraufhin werden pro well 10 µl der MTT-Stammlösung zugegeben, und es wird für vier Stunden inkubiert. Nach der Inkubationszeit werden die blau-violetten Formazankristalle mit Isopropanol solubilisiert. Dazu wird das Medium abgezogen, 100 µl Isopropanol pro well zugegeben und die Kristalle durch zusätzliches Auf- und Abpipettieren gelöst. Nach etwa 10 min. kann die Absorption gemessen werden.

Zur Bestimmung des Blindwerts wird nur Medium, dass keine Zellen enthält, verwendet. Zur Kontrolle der Toxizität des DMSO wird als Positivkontrolle DMSO in denen bei den Glykoalkaloiden eingesetzten Konzentrationen verwendet. Für eine zweite Positivkontrolle werden Zellen verwendet, die unbehandelt bleiben. Für jede Konzentration/Messung wird eine Vierfach-Bestimmung durchgeführt, zur Auswertung wird daraus der Mittelwert berechnet. Dieser Mittelwert ist direkt proportional zur Zellzahl.

6.3 Geräte

PROTEIN-HPLC

Pumpe:	L-7100	
Detektor:	L-7455 DAD (<u>D</u> iode <u>A</u> rray <u>D</u> etector)	Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland;
Autosampler:	L-7200	Hitachi Europe GmbH, München, Deutschland
Degasser:	L-7612	
Säulenofen:	L-7350	
Datenverarbeitung:	HSM 4.1	
Steuerung:	D-7000 Interface	

GLYKOALKALOID-HPLC

Pumpe:	Techlab LCP 4100	Techlab, Erkerode, Deutschland
Detektor:	UV/VIS detector S-3702	Shimadzu, Duisburg, Deutschland
Autosampler:	Triathlon	Spark Holland, Emmen, Niederlande
Degasser:	TS 7505	Sykam GmbH, Gilching, Deutschland
Säulenofen:	ERC-125	ERC, Alteglofsheim, Deutschland
Datenverarbeitung:	Andromedar	DataApex Ltd., Prag, Tschechische Republik

AMINOSÄURE-HPLC

Pumpe:	Techlab LCP 4100	Techlab, Erkerode, Deutschland
Fluoreszenzdetektor:	RF-10AxL	Shimadzu Deutschland GmbH, Duisburg, Deutschland
Autosampler:	Triathlon	Spark Holland, Emmen, Niederlande
Degasser:	3-Kanal-Degasser	Sykam GmbH, Gilching, Deutschland
Säulenofen:	T-1	Techlab, Erkerode, Deutschland
Datenverarbeitung:	Andromedar	DataApex Ltd., Prag, Tschechische Republik

ULTRASCHALLBAD

Sonorex RK 510 H	Bandelin electronic,	Berlin, Deutschland
------------------	----------------------	------------------------

MALDI

MALDI 3	Kratos Analytical, A Shimadzu Group Company, Shimadzu Deutschland GmbH, Duisburg, Deutschland
Voyager DE Pro mass spectrometer (IPF Pharamceuticals, Hannover)	Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland

CE

Beckman P/ACE MDQ System Photodiode Array Detector	Beckman Coulter, Fullerton, California, USA
---	--

PHOTOMETER

Cary 50 Bio	Varian Deutschland GmbH, Darmstadt, Deutschland
Multiskan Spectrum	Thermo Labsystems/Thermo Electron GmbH, Dreieich, Deutschland
Microplate Reader Benchmark	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland

HOMOGENISIERER

Ultra-Turrax T25 basic	IKA-Werke GmbH & CO.KG, Staufen, Deutschland
------------------------	---

CENTRIFUGEN

Multifuge 3s,

Tisch-Zentrifuge 54156

Heraeus, Kendro Laboratory Products
GmbH, Hanau, DeutschlandEppendorf GmbH, Hamburg,
Deutschland

VAKUUMKAMMER

für SPE

Supelco, Deisenhofen, Deutschland

FILTRATIONSANLAGE

Arium

Sartorius AG, Göttingen, Deutschland

THERMOSCHÜTTLER

Thermomixer 5437

Eppendorf GmbH, Hamburg,
Deutschland

VORTEXER

ohne Bezeichnung

Heidolph Instruments GmbH & Co.
KG, Schwabach, Deutschland

pH-ELEKTRODEN

pH-Checker

pH-Meter 766

Hanna Instruments, USA

Knick Elektronisch Messgeräte GmbH
& Co. KG, Berlin, Deutschland

ANALYSENWAAGE

Analytic AC 210 S

Sartorius AG, Göttingen, Deutschland

LYOPHILLE

GeneVac SF50

Biometra GmbH i.L., Göttingen,
Deutschland

ENZYMATISCHE HYDROLYSE

Impulsomat Metrohm 614

pH-Stat Metrohm 632

Dosimat Metrohm 665

Metrohm, Filderstadt, Deutschland

GELEKTROPHORESE

Criterion cell

Bio-Rad Laboratories GmbH,
München, Deutschland

MIKROSKOP

IX 50

Olympus Deutschland GmbH,
Hamburg, Deutschland

BRUTSCHRANK

Heraeus

Heraeus Holding GmbH, Hanau,
Deutschland

6.4 Materialien

HPLC-SÄULEN

Nucleosil 100-5 C18 EC (250 x 4,6 mm)

Macherey-Nagel, Düren, Deutschland

Jupiter Proteo 90-4 C12 (250 x 4,6 mm)

Phenomenex, Aschaffenburg,
DeutschlandDiscovery Bio Wide Pore 100-5 C8
(250 x 2,1 mm)

Supelco, Deisenhofen, Deutschland

Nucleosil 120-5 C4 EC (250 x 4,6 mm)

Macherey-Nagel, Düren, Deutschland

Reprosil-pur NH₂, 120-5 (250 x 4 mm)Trentec Analystechnik, Gerlingen,
Deutschland

Resolve C18-5 (150 x 3,9 mm)

Waters GmbH, Eschborn, Deutschland

CE-KAPILLAREN

Unbeschichtete Kapillaren

Optronis GmbH, Kehl, Deutschland

SPE-KARTUSCHEN

C18 500 mg

Phenomenex, Aschaffenburg,
Deutschland

Strata X 30 mg

Phenomenex, Aschaffenburg,
Deutschland

Oasis HLB 60 mg

Waters GmbH, Eschborn, Deutschland

Tabelle 6.7 Parameter und Charakteristika der verwendeten SPE-Kartuschen

Sorbens	Typ	Spezifische Oberfläche [m ² /g]	Mittlerer Porendurch- messer [Å]	Poren- volumen [cm ³ /g]	Partikel- durchmesser [µm]
C18	RP-Extraktion von hydrophoben Proben	500	70	n.a.	55
Strata X	RP-Extraktion von sauren, neutralen und basischen Verbindungen	800	85	1,2	33
Oasis HLB	RP-Extraktion und Kationen- austausch	810	80	1,3	30

ZIP-TIPS

C18

SCX

Millipore, Schwalbach, Deutschland

FILTRATIONSEINHEITEN

Celluloseacetat Filter 0,2 µm

Spritzenfilter 0,2 µm

Sartorius AG, Göttingen, Deutschland

SDS-GELE

Fertiggele

Bio-Rad Laboratories GmbH,
München, Deutschland

BENTONIT

EXM 0926 I

Süd Chemie AG, München,
Deutschland

Tabelle 6.8 Parameter und Charakteristika des verwendeten Bentonits EXM 0926 I [123]

Materialtyp	Korngrößenverteilung [µm]	Spezifische Oberfläche nach BET [m ² /g]	Kationenaustauscher- kapazität [meq/100 g]
Sauer aktivierter Bentonit	0-150	224	20-30

ZELLKULTURFLASCHEN

T 75

Sarstedt AG & Co., Nümbrecht,
Deutschland

6.5 Reagenzien

α -Cyano-4-hydroxymzimtsäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
2-Mercaptoethanol	Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz
3,5-Dimethoxy-4-hydroxymzimtsäure (Sinapinsäure)	Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz
Acetonitril	Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Alcalase	Novo Nordisk, Bagsvaerd, Dänemark
Ammoniak	Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz
Bacto-Agar	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Bovine Serum Albumin	Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz
Bromphenol	Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg, Deutschland
Calciumchlorid	Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz
Carboxypeptidase-Inhibitor	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Coomassie Blue	Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg, Deutschland
di-Natrium-Tetraborat * 10 H ₂ O	Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz
DMEM	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
DMSO	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Essigsäure	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Ethanol	Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
FKS	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland
Flavourzyme	Novo Nordisk, Bagsvaerd, Dänemark
Formaldehyd	Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz
Glycin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Harnstoff	Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz
Hefeextrakt	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland

Isopropanol	Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumchlorid	Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz
Kaliumhexacyanoferrat (III)	Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz
Kaliumhydrogenphosphat	Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz
Kaliumhydroxid	Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz
Kunitz-Inhibitor	Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz
Kupfersulfat-Pentahydrat	Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz
Methanol	Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Methylhydroxyethyl-Cellulose	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
MTT	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Natriumcarbonat	Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz
Natriumchlorid	Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz
Natriumcitrat	Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz
Natriumhydrogenphosphat	Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz
Natriumhydroxid	Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz
Natriumsulfit	Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Natriumthiosulfat	Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz
N- α -Tosyl-L-Argininmethylester	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Ortho-Phthaldialdehyd	Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz
Papain	Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz
Peptone	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Perfect Mass Caps	Powerstar Food, Hamburg, Deutschland
Protein Ladder Marker	Fermentas GmbH, St-Leon-Roth, Deutschland
Salzsäure	Riedel-de-Haën, Seelze, Deutschland
Satise	Kemin Consumer Care, Des Moines, Iowa, USA
Silbernitrat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz
Trichloressigsäure (TCA)	Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz
Trifluoressigsäure (TFA)	Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan-hydrochlorid (TRIS-HCl)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Trypsin (TAME-Assay; 10450 BAEE units/mg = 181,74 TAME units/mg)	Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz

Trypsin für enzymatische Hydrolyse (KFW)	Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz
Trypsin für Verdau vom SDS-Gel	Promega GmbH, Mannheim, Deutschland
Trypsin-Chymotrypsin-Inhibitor (Bowman-Birk-Inhibitor)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Trypsin-Inhibitor	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Zitronensäure	Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz

Alle wässrigen Lösungen wurden mit bidestilliertem Wasser aus dem Gerät ARIUM (Sartorius AG, Göttingen, Deutschland) hergestellt.

6.6 Puffer und Lösungen

MALDI-MATRIX

10 mg/ml Sinapinsäure (3,5-Dimethoxy-4-hydroxymzimtsäure)

Lösungsmittel: 0,1 % TFA in 50 % Acetonitril

KAPILLARELEKTROPHORESE

Boratpuffer:

40 mM (15,25 g/L di-Natrium-Tetraborat * 10 H₂O)

Auf pH-Wert von 10 einstellen.

Puffer nach Pots [15]:

150 mM Zitronensäure

6 M Harnstoff

0,05% Methyl-2-hydroxyethyl-Cellulose

pH = 2,5

GELELEKTROPHORESE

Tris/Glycin-Laufpuffer:

25 mM TRIS

192 mM Glycin

0,1% (w/v) SDS

LB-MEDIUM (LURIA-BERTANI-AGAR)

5 g NaCl

10 g Peptone

10 g Hefeextrakt

15 g Bacto-Agar

Auf 1 l mit bidest. H₂O auffüllen und autoklavieren.

GLYKOALKALOID-EXTRAKTION

50 ml Essigsäure (99-100 %)

6,05 g Na₂SO₃

1 l bidest. H₂O zufügen.

GLYKOALKALOID-HPLC

Eluent A: 20 mM KH₂PO₄, pH 6

2,72 g KH₂PO₄

Mit 900 ml bidest. H₂O lösen, pH-Wert von 6 mit 1 M KOH einstellen, auf 1 l mit bidest. H₂O auffüllen.

PBS-PUFFER

140 mM NaCl

7 mM KCl

10 mM Na₂HPO₄

1,8 mM KH₂PO₄

Auf 1 l mit bidest. H₂O auffüllen und autoklavieren (121 °C, 30 min, 1 bar).

DME-MEDIUM

13,5 g Feststoff DMEM

3,7 g Na₂CO₃

Auf pH von 7,2-7,4 einstellen.

Auf 1 l mit bidest. H₂O auffüllen und sterilfiltrieren (0,2 µm).

6.7 Abkürzungsverzeichnis

ACN	Acetonitril
BBI	Bowman-Birk-Inhibitor
BSA	Bovine Serum Albumin
CE	Kapillarelektrophorese
CZE	Kapillarzonenelektrophorese
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
EOF	Elektroosmotischer Fluss
EtOH	Ethanol
FKS	Fötales Kälberserum
HLB	Hydrophilic-Lipophilic Balance
IC ₅₀	Inhibitorische Konzentration

KFW	Kartoffel Fruchtwasser
KI	Kunitz-Inhibitor
MALDI-TOF	Matrix Assited Laser Desorption/Ionozation-Time of Flight
MEKC	Micellare Elektrokinetische Chromatographie
MeOH	Methanol
meq	Milliequivalente
mM	Millimol
MS	Massenspektrometrie
n.a.	nicht angegeben
OPA	Ortho-Phthaldialdehyd
PBS	Phosphat buffered saline
PPL	Potato Protein Liquor
RP-HPLC	Reversed phase-High-performance liquid chromatography
rpm	Rounds per minute
RT	Raumtemperatur
SCX	Strong cation exchange
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SPE	Solid phase extraction
TAME	N- α -Tosyl-L-Argininmethylester
TCA	Trichloro acid
TFA	Trifluoro acid
TS	Trockensubstanz
UDP	Uridindiphosphat

Die Abkürzungen der Aminosäuren entsprechen der Einbuchstabennomenklatur.

7 Literaturverzeichnis

- [1] Lorey, H., Tartuffli - Alte Kartoffelsorten neu entdeckt. *Landwirtschaftsverlag* **2002**.
- [2] <http://de.wikipedia.org/wiki/Kartoffel>. **2005**.
- [3] <http://www.Kartoffel.de>. **2005**.
- [4] van Koningsveld, G. A., Physico-chemical and functional properties of potato proteins. *Dissertation Universität Wageningen* **2001**.
- [5] Bayerische-Landesanstalt-für-Landwirtschaft,
http://www.lfl.bayern.de/iem/agrarmarktpolitik/11339/linkurl_0_7_0_0.pdf. **2005**, 93-109.
- [6] Pots, A. M., Physico-chemical properties and thermal aggregation of patatin, the major potato tuber protein. *Dissertation Universität Wageningen* **1999**.
- [7] Zwijnenberg, H. J., Kemperman, A. J. B., Boerrigter, M. E., Lotz, M., Dijksterhuis, J. F., Poulsen, P. E., Koops, G. H., Native protein recovery from potato fruit juice by ultrafiltration. *Desalination* **2002**, 144, (1-3), 331-334.
- [8] Ulber, R., Biotechnologische Methoden zur effizienteren Rohstoffnutzung. *Habilitationsschrift Universität Hannover* **2002**.
- [9] Ringleb, U., <http://www.gsv1.de/naehrstoffe.htm>. **2005**.
- [10] <http://www.altenpflegeschueler.de/ernaehrung/eiweiss-und-biologische-wertigkeit.php>. **2005**.
- [11] Knorr, D., Protein Quality of the Potato and Potato Protein Concentrates. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie* **1978**, 11, (3), 109-115.
- [12] Lotz, M., Konzept 2000 der Emsland-Stärke. *Emsland-Stärke GmbH, Emlichheim* **2003**.
- [13] http://www.toffi.net/kiss/verwertung/v_07.htm. **2005**.
- [14] Knorr, D., Lotz, M., Die Kartoffel - mehr als Stärke. *Bundesministerium für Bildung und Forschung* **2000**.
- [15] Pots, A. M., Gruppen, H., van Diepenbeek, R., van der Lee, J. J., van Boekel, M. A. J. S., Wijngaards, G., Voragen, A. G. J., The effect of storage of whole potatoes of three cultivars on the patatin and protease inhibitor content; a study using capillary electrophoresis and MALDI-TOF mass spectrometry. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **1999**, 79, (12), 1557-1564.
- [16] Racusen, D., Foote, M., A major soluble Glycoprotein of Potato-Tubers. *Journal of Food Biochemistry* **1980**, 4, (1), 43-52.

- [17] Pots, A. M., De Jongh, H. H. J., Gruppen, H., Hamer, R. J., Voragen, A. G. J., Heat-induced conformational changes of patatin, the major potato tuber protein. *European Journal of Biochemistry* **1998**, 252, (1), 66-72.
- [18] Shewry, P. R., Tuber storage proteins. *Annals of Botany* **2003**, 91, (7), 755-769.
- [19] Straetkvern, K. O., Schwarz, J. G., Wiesenborn, D. P., Zafirakos, E., Lihme, A., Expanded bed adsorption for recovery of patatin from crude potato juice. *Bioseparation* **1999**, 7, (6), 333-345.
- [20] Park, W. D., Blackwood, C., Mignery, G. A., Hermodson, M. A., Lister, R. M., Analysis of the Heterogeneity of the 40,000 Molecular Weight Tuber Glycoprotein of Potatoes by Immunological Methods and by NH₂-Terminal Sequence Analysis. *Plant Physiology* **1983**, 71, (1), 156-160.
- [21] Bohac, J. R., A Modified Method To Purify Patatin from Potato Tubers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1991**, 39, (8), 1411-1415.
- [22] Racusen, D., Lipid Acyl Hydrolase of Patatin. *Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne de Botanique* **1984**, 62, (8), 1640-1644.
- [23] Hirschberg, H. J. H. B., Simons, J. W. F. A., Dekker, N., Egmond, M. R., Cloning, expression, purification and characterization of patatin, a novel phospholipase A. *European Journal of Biochemistry* **2001**, 268, (19), 5037-5044.
- [24] Seppälä, U., Palosuo, T., Kalkkinen, N., Ylitalo, L., Reunala, T., Turjanmaa, K., IgE reactivity to patatin-like latex allergen, Hev b 7, and to patatin of potato tuber, Sol t 1, in adults and children allergic to natural rubber latex. *Allergy* **2000**, 55, 266-273.
- [25] Raulf-Heimsoth, M., Posch, A., Riedel, F., Tücke, J., Baur, X., Latex Typ I Allergie: Risikoevaluierung unter besonderer Berücksichtigung der kreuzreagierenden Proteine in Nahrungsmitteln. *Forschungsbericht FZKA-BWPLUS* **1999**.
- [26] Cullinan, P., Brown, R., Field, A., Hourihane, J., Jones, M., Kekwick, R., R. Rycroft, R., Stenz, R., Williams, S., Woodhouse, C., Latex allergy. A position paper of the British Society of Allergy and Clinical Immunology. *Clinical Experimental Allergy* **2003**, 33, 1484-1499.
- [27] Huang, C. S., Ma, W. Y., Ryan, C. A., Dong, Z. G., Proteinase inhibitors I and II from potatoes specifically block UV-induced activator protein-1 activation through a pathway that is independent of extracellular signal-regulated kinases, c-Jun N-terminal kinases, and P38 kinase. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America* **1997**, 94, (22), 11957-11962.

- [28] Valueva, T., Revina, T., Gvozdeva, E., Gerasimova, N., Ozeretskovskaya, O., Role of protease inhibitors in potato protection. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry* **2003**, 29, (5), 454-458.
- [29] Pouvreau, L., Gruppen, H., Piersma, S. R., van den Broek, L. A. M., van Koningsveld, G. A., Voragen, A. G. J., Relative abundance and inhibitory distribution of protease inhibitors in potato juice from cv. Elkana. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2001**, 49, (6), 2864-2874.
- [30] Hill, A. J., Peikin, S. R., Ryan, C. A., Blundell, J. E., Oral Administration of Proteinase Inhibitor II From Potatoes Reduces Energy Intake in Man. *Physiology and Behavior* **1990**, 48, 241-246.
- [31] TCI, Die gezielte Gewinnung von hochwertigen Nutraceuticals aus landwirtschaftlichen Rohstoffen. *Projektantrag zur Vorlage beim MW/MWK* **2003**.
- [32] Lindner, P., Keren, R., Ben-Gera, I., Precipitation of Proteins from Potato Juice with Bentonite. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **1981**, 32, 1177-1182.
- [33] Davison, B., Ryan, C., Ausich, R., Sheabar, F. Z., Stomp, R., Method for Controlling the Yield and Purity of Proteinase Inhibitor II during Extraction. *Patent WO03003835-US2003092151* **2003**.
- [34] Ausich, R., Sheabar, F. Z., Stomp, R., Method for the Elimination of Kunitz and Bowman-Birk Trypsin Inhibitors and Carboxypeptidase Inhibitor from Potato Proteins. *Patent WO03003836-US2003077265* **2003**.
- [35] Sheabar, F. Z., Stomp, R., Isolation and purification of proteinase inhibitor II. *Patent WO03003837-US2003092150* **2003**.
- [36] Davison, B., Fallert, H., Mather, G., Ausich, R., Sheabar, F. Z., Stomp, R., Method of enhancing the extraction of proteinase inhibitors. *Patent WO03003838-US2003092152* **2003**.
- [37] Fallert, H. G., Stomp, R., Raw Material selection and analysis for the isolation of protease inhibitor II from whole potatoes. *Patent WO03027318-US2003113829* **2003**.
- [38] Pots, A. M., Gruppen, H., Hessing, M., van Boekel, M. A. J. S., Voragen, A. G. J., Isolation and characterization of patatin isoforms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1999**, 47, (11), 4587-4592.
- [39] Breitmaier, E., Alkaloide - Betäubungsmittel, Halluzinogene und andere Wirkstoffe, Leitstrukturen aus der Natur -. *Teubner-Verlag* **2002**, 2. Auflage.
- [40] Friedman, M., McDonald, G. M., Potato glycoalkaloids: Chemistry, analysis, safety, and plant physiology. *Critical Reviews in plant sciences* **1997**, 16, (1), 55-132.

- [41] Lachmann, J., Hamouz, K., Orsak, M., Pivec, V., Potato glycoalkaloids and their significance in plant protection and human nutrition - Review. *Series Rostlinna Vyroba* **2001**, 47, (4), 181-191.
- [42] Gerstner, G., Sicherheitsbewertung gentechnisch veränderter Lebensmittel: Glykoalkaloide in transgenen Kartoffeln. *Dissertation Technische Universität München* **2000**.
- [43] Friedman, M., McDonald, G. M., Acid-Catalyzed Partial Hydrolysis of Carbohydrate Groups of the Potato Glycoalkaloid α -Chaconine in Alcoholic Solutions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1995**, 43, (6), 1501-1506.
- [44] Friedman, M., McDonald, G., Haddon, W., Kinetics of Acid-Catalyzed Hydrolysis of Carbohydrate Groups of Potato Glycoalkaloids α -Chaconine and α -Solanine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1993**, 41, (9), 1397-1406.
- [45] Rayburn, J. R., Bantle, J. A., Friedman, M., Role of Carbohydrate Side Chains of Potato Glycoalkaloids in Developmental Toxicity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1994**, 42, 1511-1515.
- [46] Udalova, Z. V., Zinov'eva, S. V., Vasil'eva, I. S., Paseshnichenko, V. A., Correlation between the structure of plant steroids and their effects on phytoparasitic nematodes. *Applied Biochemistry and Microbiology* **2004**, 40, (1), 93-97.
- [47] Smith, D. B., Roddick, J. G., Jones, J. L., Potato glycoalkaloids: Some unanswered questions. *Trends in Food Science and Technology* **1996**, 7, 126-131.
- [48] Valkonen, J. P. T., Keskitalo, M., Vasara, T., Pietila, L., Potato glycoalkaloids: A burden or a blessing? *Critical Reviews in Plant Sciences* **1996**, 15, (1), 1-20.
- [49] Zrust, J., Horackova, V., Prichystalova, V., Rejlkova, M., Light-induced alpha-chaconine and alpha-solanine accumulation in potato tubers (*Solanum tuberosum* L.) after harvest. *Rostlinna Vyroba* **2001**, 47, (11), 469-474.
- [50] Edwards, E., Saint, R., Cobb, A., Is there a link between greening and light-enhanced glycoalkaloid accumulation in potato (*Solanum tuberosum* L.) tubers? *Journal of the Science of Food and Agriculture* **1998**, 76, (3), 327-333.
- [51] Bergenstrahle, A., Tillberg, E., Jonsson, L., Effects of ethephon and norbornadiene on sterol and glycoalkaloid biosynthesis in potato tuber discs. *Physiologia Plantarum* **1993**, 89, 301-308.
- [52] Sengul, M., Keles, F., Keles, M. S., The effect of storage conditions (temperature, light, time) and variety on the glycoalkaloid content of potato tubers and sprouts. *Food Control* **2004**, 15, (4), 281-286.

- [53] Heftmann, E., Biogenesis of Steroids in Solanaceae -Review-. *Phytochemistry* **1983**, 22, (9), 1843-1860.
- [54] Vronen, P. J. E., Potato glycoalkaloids as starting material for the synthesis of steroid hormones. *Dissertation Universität Wageningen* **2003**.
- [55] McCue, K. F., Shepherd, L. V. T., Allen, P. V., Maccree, M. M., Rockhold, D. R., Corsini, D. L., Davies, H. V., Belknap, W. R., Metabolic compensation of steroidal glycoalkaloid biosynthesis in transgenic potato tubers: using reverse genetics to confirm the in vivo enzyme function of a steroidal alkaloid galactosyltransferase. *Plant Science* **2005**, 168, 267-273.
- [56] Bergenstrahle, A., Glycoalkaloid Synthesis in Potato Tubers. *Dissertation Universität Uppsala* **1995**.
- [57] Korpan, Y. I., Nazarenko, E. A., Skryshevskaya, I. V., Martelet, C., Jaffrezic-Renault, N., El'skaya, A. V., Potato glycoalkaloids: true safety or false sense of security? *Trends in Biotechnology* **2004**, 22, (3), 147-151.
- [58] Hellenäs, K. E., Nyman, A., Slanina, P., Loof, L., Gabrielsson, J., Determination of potato glycoalkaloids and their aglycone in blood-serum by high-performance liquid-chromatography - application to pharmacokinetic studies in humans. *Journal of Chromatography-Biomedical Applications* **1992**, 573, (1), 69-78.
- [59] Hopkins, J., The Glykoalkaloids - Naturally of interest (But a hot Potato?). *Food and Chemical Toxicology* **1995**, 33, (4), 323-328.
- [60] Nishie, K., Norred, W. P., Swain, A. P., Pharmacology and Toxicology of Chaconin and Tomatine. *Research Communications in Chemical Pathology and Pharmacology* **1975**, 12, (4), 657-668.
- [61] Krasowski, M. D., McGehee, D. S., Moss, J., Medical Intelligence - Natural inhibitors of cholinesterases: implications for adverse drug reactions -. *Canadian Journal of Anaesthesia* **1997**, 44, (5), 525-534.
- [62] Bushway, R., Savage, S., Ferguson, B., Inhibition of acetyl cholinesterase by solanaceous glycoalkaloids and alkaloids. *American Potato Journal* **1987**, 64, (8), 409-413.
- [63] Schwardt, E., Veränderung in den Gehalten an Glykoalkaloiden (α -Chaconin und α -Solanin) in Kartoffeln während der Lagerung sowie im Verlauf der industriellen Produktion daraus hergestellter Edelerzeugnisse (Chips, Püree und Trockenkartoffeln). *Dissertation Universität Göttingen* **1983**.
- [64] Gubarev, M. I., Enioutina, E. Y., Taylor, J. L., Visic, D. M., Daynes, R. A., Plant-derived Glykoalkaloids protect mice against lethal infections with *Salmonella typhimurium*. *Phytotherapy Research* **1998**, 12, 79-88.

- [65] Lee, K. R., Kozukue, N., Han, J. S., Park, J. H., Chang, E. Y., Baek, E. J., Chang, J. S., Friedman, M., Glycoalkaloids and metabolites inhibit the growth of human colon (HT29) and liver (HepG2) cancer cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2004**, 52, (10), 2832-2839.
- [66] Edwards, E. J., Cobb, A. H., Improved high-performance liquid chromatographic method for the analysis of potato (*Solanum tuberosum*) glycoalkaloids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1996**, 44, (9), 2705-2709.
- [67] Roosen-Runge, C., Zur Bestimmung von Solanin und Chaconin sowie deren Vorkommen in Kartoffeln. *Dissertation Universität Hamburg* **1978**.
- [68] Sotelo, A., Serrano, B., High-performance liquid chromatographic determination of the glycoalkaloids alpha-solanine and alpha-chaconine in 12 commercial varieties of Mexican potato. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2000**, 48, (6), 2472-2475.
- [69] Friedman, M., Roitman, J. N., Kozukue, N., Glycoalkaloid and calystegine contents of eight potato cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2003**, 51, (10), 2964-2973.
- [70] Dao, L., Friedman, M., Comparison of glycoalkaloid content of fresh and freeze-dried potato leaves determined by HPLC and colorimetry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1996**, 44, (8), 2287-2291.
- [71] Vaananen, T., Kuronen, P., Pehu, E., Comparison of commercial solid-phase extraction sorbents for the sample preparation of potato glycoalkaloids. *Journal of Chromatography A* **2000**, 869, (1-2), 301-305.
- [72] Hellenäs, K. E., Branzell, C., Liquid chromatographic determination of the glycoalkaloids alpha-solanine and alpha-chaconine in potato tubers: NMKL interlaboratory study. *Journal of AOAC International* **1997**, 80, (3), 549-554.
- [73] Achterberg, C. L., Clauson, D. M., Blease, J. A., Barden, E. S., New Procedure for the Mass Extraction and Collection Potato Glycoalkaloids. *American Potato Journal* **1979**, 56, (3), 145-148.
- [74] Saito, K., Horie, M., Hoshino, Y., Nose, N., Nakazawa, H., High-performance liquid-Chromatographic determination of glycoalkaloids in potato products. *Journal of Chromatography* **1990**, 508, (1), 141-147.
- [75] Jonker, H. H., Koops, A. J., Hoogedoorn, J. C., A rapid method for the quantification of steroidal glycoalkaloids by reversed phase HPLC. *Potato Research* **1992**, 35, (4), 451-455.

- [76] Kobayashi, K., Powell, A. D., Toyoda, M., Saito, Y., High-performance liquid-Chromatography method for the simultaneous analysis of alpha-solanine and alpha-chaconine in potato plants cultured in vitro. *Journal of Chromatography* **1989**, 462, 357-364.
- [77] Fitzpatrick, T. J., Osman, S. F., Comprehensive method for determination of total potato glycoalkaloids. *American Potato Journal* **1974**, 51, (10), 318-323.
- [78] Fitzpatrick, T. J., Mackenzie, J. D., Gregory, P., Modifications of comprehensive method for total glycoalkaloid determination. *American Potato Journal* **1978**, 55, (5), 247-248.
- [79] Bushway, R. J., Barden, E. S., Bushway, A. W., Bushway, A. A., The mass extraction of potato glycoalkaloids from blossoms. *American Potato Journal* **1980**, 57, (4), 175-180.
- [80] Bushway, R. J., Bureau, J. L., McGann, D. F., Alpha-chaconine and alpha-solanine content of potato peels and potato peel products. *Journal of Food Science* **1983**, 48, (1), 84-86.
- [81] Houben, R. J., Brunt, K., Determination of glycoalkaloids in potato-tubers by reversed-phase high-performance liquid-Chromatography. *Journal of Chromatography A* **1994**, 661, (1-2), 169-174.
- [82] Backleh, M., Ekici, P., Leupold, G., Coelhan, M., Parlar, H., Enrichment of the glycoalkaloids alpha-solanine and alpha-chaconine from potato juice by Adsorptive Bubble Separation using a pH gradient. *Journal of Separation Science* **2004**, 27, (12), 1042-1044.
- [83] Bushway, R., McGann, D., Bushway, A., Gas-chromatographic method for the determination of solanidine and its application to a study o feed-milk transfer in the cow. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1984**, 32, (3), 548-551.
- [84] Simonovska, B., Vovk, I., High-performance thin-layer chromatographic determination of potato glycoalkaloids. *Journal of Chromatography A* **2000**, 903, (1-2), 219-225.
- [85] Verpoorte, R., Baerheim Svendsen, A., Chromatography of alkaloids. *Journal of Chromatography Library* **1983**, 23A, 415-433.
- [86] Friedman, M., Bautista, F. F., Stanker, L. H., Larkin, K. A., Analysis of potato glycoalkaloids by a new ELISA kit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1998**, 46, (12), 5097-5102.

- [87] Stanker, L. H., Kamps-Holtzapfle, C., Beier, R. C., Levin, C. E., Friedman, M., Detection and Quantification of Glycoalkaloids - Comparison of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay and High-Performance Liquid Chromatography Methods. *Chapter 18 in: Immunoassays for Residue Analysis -Food Safety- ACS Symposium Series 621 1996.*
- [88] Driedger, D., Sporns, P., Development of an antibody against diosgenin and spiroaminoketal alkaloids. *Food and Agricultural Immunology* **2001**, 13, (1), 33-38.
- [89] Plhak, L. C., Sporns, P., Development and production of monoclonal-antibodies for the measurements of solanidine potato glycoalkaloids. *American Potato Journal* **1994**, 71, (5), 297-313.
- [90] Plhak, L. C., Sporns, P., Enzyme-immunoassay for potato glycoalkaloids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1992**, 40, (12), 2533-2540.
- [91] Sporns, P., Abell, D. C., Kwok, A. S. K., Plhak, L. C., Thomson, C. A., Immunoassay for Toxic Potato Glycoalkaloids. *Chapter 19 in: Immunoassays for Residue Analysis -Food Safety- ACS Symposium Series 621 1996.*
- [92] Stanker, L. H., Kampsholtzapfle, C., Friedman, M., Development and characterization of monoclonal-antibodies that differentiate between potato and tomato glycoalkaloids and aglycons. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1994**, 42, (10), 2360-2366.
- [93] Glorio-Paulet, P., Durst, R. A., Determination of potato glycoalkaloids using a liposome immunomigration, liquid-phase competition immunoassay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2000**, 48, (5), 1678-1683.
- [94] Kim, M., Lee, J., Shin, W. S., Durst, R. A., Flow-injection liposome immunoanalysis system for potato glycoalkaloid. *Food Science and Biotechnology* **2003**, 12, (4), 430-434.
- [95] Arkhypova, V. N., Dzyadevycg, S. V., Soldatkin, A. P., El'skaya, A. V., Martelet, C., Jaffrezic-Renault, N., Development and optimisation of biosensors based on pH-sensitive field effect transistors and cholinesterases for sensitive detection of solanaceous glycoalkaloids. *Biosensors and Bioelectronics* **2003**, 18, (8), 1047-1053.
- [96] Bacigalupo, M. A., Longhi, R., Meroni, G., Alpha-solanine and alpha-chaconine glycoalkaloid assay in *Solanum tuberosum* extracts by liposomes and time-resolved fluorescence. *Journal of Food Composition and Analysis* **2004**, 17, (5), 665-673.
- [97] Thomson, C. A., Sporns, P., Fluorescence polarization immunoassay for potato glycoalkaloids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1995**, 43, (1), 254-260.

- [98] Abell, D. C., Sporns, P., Rapid quantitation of potato glycoalkaloids by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1996**, 44, (8), 2292-2296.
- [99] Driedger, D., Sporns, P., Glycoalkaloid concentration in by-products of potato starch extraction as measured by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Journal of Food Processing and Preservation* **1999**, 23, (5), 377-390.
- [100] Driedger, D., Sporns, P., Immunoaffinity sample purification and MALDI-TOF MS analysis of alpha-solanine and alpha-chaconine in serum. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2001**, 49, (2), 543-548.
- [101] Driedger, D. R., LeBlanc, R. J., LeBlanc, E. L., Sporns, P., A capillary electrophoresis laser-induced fluorescence method for analysis of potato glycoalkaloids based on a solution-phase immunoassay. 1. Separation and quantification of immunoassay products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2000**, 48, (4), 1135-1139.
- [102] Driedger, D. R., LeBlanc, R. J., LeBlanc, E. L., Sporns, P., A capillary electrophoresis laser-induced fluorescence method for analysis of potato glycoalkaloids based on a solution-phase immunoassay. 2. Performance evaluation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2000**, 48, (9), 4079-4082.
- [103] Bianco, G., Schmitt-Kopplin, P., Crescenzi, A., Comes, S., Kettrup, A., Cataldi, T. R. I., Evaluation of glycoalkaloids in tubers of genetically modified virus Y-resistant potato plants (var. Desiree) by non-aqueous capillary electrophoresis coupled with electrospray ionization mass spectrometry (NACE-ESI-MS) (vol 375, pg 799, 2003). *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2003**, 376, (5), 763-764.
- [104] Bianco, G., Schmitt-Kopplin, P., De Benedetto, G., Kettrup, A., Cataldi, T. R. I., Determination of glycoalkaloids and relative aglycones by nonaqueous capillary electrophoresis coupled with electrospray ionization-ion trap mass spectrometry. *Electrophoresis* **2002**, 23, (17), 2904-2912.
- [105] Cherkaoui, S., Bekkouche, K., Christen, P., Veuthey, J. L., Non-aqueous capillary electrophoresis with diode array and electrospray mass spectrometric detection for the analysis of selected steroidal alkaloids in plant extracts. *Journal of Chromatography A* **2001**, 922, (1-2), 321-328.
- [106] Verpoorte, R., Baerheim Svendsen, A., Chromatography of alkaloids. *Journal of Chromatography Library* **1984**, 23B, 381-386.
- [107] Matsuda, F., Morino, K., Miyazawa, H., Miyashita, M., Miyagawa, H., Determination of potato glycoalkaloids using high-pressure liquid chromatography-electrospray ionisation/mass spectrometry. *Phytochemical analysis* **2004**, 15, (2), 121-124.

- [108] Zywicki, B., Catchpole, G., Draper, J., Fiehn, O., Comparison of rapid liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry methods for determination of glycoalkaloids in transgenic field-grown potatoes. *Analytical Biochemistry* **2005**, 336, (2), 178-186.
- [109] Menzel, F., Proteinauftrennung aus Standardprotein-Mischungen und industriellem Kartoffelfruchtwasser mittels Membranadsorber. *Dissertation Universität Hannover* **2005**.
- [110] Steinhof, R., *laufende Dissertation Universität Hannover*.
- [111] Kamnerdpetch, C., *laufende Dissertation Universität Hannover*.
- [112] Introduction to Capillary Electrophoresis. *Beckman-Primer* Volume I.
- [113] Lottspeich, F., Zorbas, H., Bioanalytik. *Spektrum Akademischer Verlag* **1998**.
- [114] Schwartz, H., Pritchett, T., Separation of Proteins and Peptides by Capillary Electrophoresis: Application to Analytical Biotechnology. *Beckman-Primer* **1994**, Volume V.
- [115] Terabe, S., Micellar Electrokinetic Chromatography. *Beckman-Primer* Volume III.
- [116] Zhao, F., Clare, D. A., Catignani, G. L., Swaisgood, H. E., Purification and characterization of the fusion protein trypsin-streptavidin expressed in *Escherichia coli*. *Journal of Protein Chemistry* **2002**, 21, (6), 413-418.
- [117] Lemieux, H., Blier, P., Dutil, J. D., Do digestive enzymes set a physiological limit on growth rate and food conversion efficiency in the Atlantic cod (*Gadus morhua*)? *Fish Physiology and Biochemistry* **1999**, 20, (4), 293-303.
- [118] Vollhardt, K. P. C., Schore, N. E., Organische Chemie. *VCH-Verlag* 2. Auflage **1995**.
- [119] Ryll, J., Fermentative Gewinnung von Paramylon aus *Euglena gracilis* auf Nebenprodukten der Stärkeindustrie in einer Pilotanlage. *Dissertation Universität Hannover* **2005**.
- [120] Meyer, V. R., Praxis der Hochleistungs-Flüssigchromatographie. 9. Auflage *WILEY-VCH-Verlag* **2004**.
- [121] Oshinowo, L., Über die Einsatzmöglichkeiten der HPLC und HPLC/MS und ihre Adaptierung im Rahmen eines On-Line-Hochdurchsatzscreenings von Naturstoffextrakten. *Dissertation Universität Hamburg* **2004**.
- [122] Alt, V., Steinhof, R., Lotz, M., Ulber, R., Kasper, C., Scheper, T., Optimization of Glycoalkaloid Analysis for Use in Industrial Potato Fruit Juice Downstreaming. *Engineering in Life Sciences* **2005**, 5, (No. 6), 562-567.

- [123] Riechers, D., Untersuchungen zum Bindungsverhalten biologisch aktiver Substanzen an Bentonite. *Diplomarbeit Universität Hannover* **2005**.
- [124] Waters, Chromatography Columns and Supplies Catalog. *Waters GmbH* **2004-2005**, 18.
- [125] Millipore, User guide for Zip-Tip SCX -Pipette Tips-. *Millipore* **2003**.
- [126] Millipore, User Guide for Reversed-Phase Zip-Tip -Pipette Tips for Sample Preparation-. *Millipore* **2005**, 1-20.
- [127] Goa, J., A Micro Biuret Method for Protein Determination. Determination of Total Protein in Cerebrospinal Fluid. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* **1953**, 5, 218-222.

Curriculum vitae

Persönliche Daten

Veronika Alt, geboren am 23.08.1976 in Verden

Schulbildung

1983 – 1987 Grundschule, Comeniusschule, Hannover

1987 – 1989 Orientierungsschule, Orientierungsstufe Edenstrasse, Hannover

1989 – 1996 Gymnasium, Leibnizschule Hannover; Abiturnote: 2,5

Hochschulausbildung

10/1996 – 03/2002 Studium der Chemie an der Universität Hannover

10/2000 – 03/2001 Forschungsprojekt am Department of Biochemical Engineering, University College, London
Thema: „Transketolase production and immobilisation with E.coli fermentation“

09/2001 – 03/2002 Diplomarbeit am Institut für Technische Chemie der Universität Hannover
Thema: „Untersuchungen zur reproduzierbaren Darstellung von Cephalosporin C in Schüttelkulturen“; Gesamtnote: Gut

Dissertation

05/2002 Beginn der Promotion am Institut für Technische Chemie der Universität Hannover, AK Prof. Scheper

Beruflicher Werdegang

Seit Mitte Oktober 2005 Wissenschaftliche Referentin am Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit, Abteilung Pflanzenschutzmittel, Braunschweig

Hannover, 19.05.2006

Publikationsliste

VERÖFFENTLICHUNG

Alt, V., Steinhof, R., Lotz, M., Ulber, R., Kasper, C., Scheper, T., Optimization of Glycoalkaloid Analysis for Use in Industrial Potato Fruit Juice Downstreaming, Engineering in Life Sciences 2005, 5, (No. 6), 562-567.

POSTERBEITRÄGE

V. Alt, F. Menzel, C. Kasper, M. Lotz, T. Scheper, Separation of proteins of potato fruit juice and analysis of patatin using capillary and gel electrophoresis, 17th International Symposium on Microscale Separations and Capillary Electrophoresis – HPCE 2004, Salzburg

V. Alt, F. Menzel, C. Kasper, M. Lotz, J. Hierer, H. John, R. Ulber, T. Scheper, Separation of proteins from potato fruit juice using ion exchange membrane chromatography, International Symposium on Preparative and Industrial Chromatography and Allied Techniques – SPICA 2004, Aachen

V. Alt, F. Menzel, T. Herrmann, R. Steinhof, S. Beutel, M. Lotz, R. Ulber, C. Kasper, T. Scheper, Basic investigations for down streaming of potato fruit juice using ion exchange membrane chromatography, Bioperspectives 2005, Wiesbaden