

Optimierung der prozesstechnischen Aufreinigung von bioaktiven Proteinen aus Kartoffeln sowie Charakterisierung der hydrolysierten Kartoffelproteine

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

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

genehmigte Dissertation

von

Dipl.-Berufspäd. Isabelle Schoenbeck
geboren am 17. November 1981 in Hannover

Hannover, 2013

**Optimierung der prozesstechnischen
Aufreinigung von bioaktiven Proteinen aus
Kartoffeln sowie Charakterisierung der
hydrolysierten Kartoffelproteine**

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

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

genehmigte Dissertation

von

Dipl.-Berufspäd. Isabelle Schoenbeck

geboren am 17. November 1981 in Hannover

Hannover, 2013

Referent: Prof. Dr. Thomas Scheper

Korreferent: Prof. Dr. Andreas Hahn

Tag der Promotion: 24.07.2013

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Thomas Scheper danke ich, dass er mir die Möglichkeit gegeben hat, in seinem Arbeitskreis zu promovieren sowie für die hilfreichen und konstruktiven Vorschläge zur Verbesserung meiner Arbeit.

Prof. Dr. Andreas Hahn möchte ich für die Übernahme des Korreferats, sowie den positiven Zuspruch während der gemeinsamen Projektphase danken.

Prof. Dr. Ursula Rinas danke ich, dass sie den Prüfungsvorsitz übernimmt.

Danke an Dr. Sascha Beutel für sein Vertrauen und die Hilfestellungen während meiner Promotionszeit. Danke, dass du für mich da warst.

Bei Dr. Martin Leuthold möchte ich mich für seine Unterstützung im Bereich Membranadsorbertechnologie bedanken.

Meinem Masteranden Johannes Gerding und meinem Bachelor Studenten Heiko Kluge danke ich für ihre Unterstützung im Projekt.

Allen festangestellten Mitarbeitern des TCI danke ich für die freundliche Unterstützung. Martina Weiß, ohne dich wären die meisten Doktoranden verloren. Ich hoffe Sie wissen dich alle so zu schätzen wie ich. Die E-Werkstatt und die Mechanik Werkstatt, ihr hattet immer eine gute Idee, das Basteln mit euch hat Spaß gemacht.

Dem Arbeitskreis der TCI, die Zeit mit euch war wirklich toll. Meinen Bürokollegen, Daniel Schaper und Steffen Henkel mit euch war es immer lustig.

Iliyana Pepelanova und Stephanie Holz möchte ich danken, da sie nicht nur Kolleginnen waren, sondern auch Freundinnen sind. Danke dass ihr mich so unterstützt habt. Persönlich erwähnen und danken möchte ich noch Marie Lewin, Estabraq Abdulkerim, Marko Sandor und Jörg Schmidt-Hager als Freunde und Kollegen.

Meinen Freunden und der Mittagskaffeerunde danke ich für die Abwechslung vom Uni-Alltag. Christian Dunkel, Klaas Brandt und Sascha Mallon, ihr seid die besten Kumpel die man sich wünschen kann.

Ein besonderer Dank gilt meinen Wednesday Girls! Auf eine immerwährende Freundschaft.

Besonderer Dank gilt den wichtigsten Menschen in meinem Leben, meinen Eltern und dem besten Bruder der Welt. Ich danke euch, ihr seid immer für mich da, habt mich unterstützt und an mich geglaubt!

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	I
KURZZUSAMMENFASSUNG.....	III
ABSTRACT.....	IV
1. EINLEITUNG	1
2. ZIELSETZUNG.....	3
3. THEORETISCHER TEIL.....	4
3.1 BIOAKTIVE PEPTIDE: EIGENSCHAFTEN, BIOVERFÜGBARKEIT UND VERMARKTUNG.....	4
3.1.1 <i>Eigenschaften bioaktiver Peptide aus Nahrungsmitteln</i>	<i>4</i>
3.1.2 <i>Bioverfügbarkeit von bioaktiven Peptiden.....</i>	<i>9</i>
3.1.3 <i>Kommerziell erhältliche Produkte mit bioaktiven Peptiden.....</i>	<i>11</i>
3.2 IMMOBILISIERUNG VON ENZYMEN IN DER TECHNISCHEN PRODUKTION.....	13
3.2.1 <i>Arten der Immobilisierung</i>	<i>14</i>
3.3 INHALTSSTOFFE DER KARTOFFEL.....	18
3.3.1 <i>Patatin.....</i>	<i>19</i>
3.3.2 <i>Proteaseinhibitoren</i>	<i>20</i>
3.3.3 <i>Höher molekulare Proteine.....</i>	<i>20</i>
3.4 PROTEINGEWINNUNG AUS KFW MITTELS MEMBRANADSORBERTECHNOLOGIE.....	21
4. EXPERIMENTELLER TEIL	24
4.1 PROZESSIERUNG MIT DER TECHNIKUMSANLAGE.....	24
4.1.1 <i>Umbau der Technikumsanlage in den Tandembetrieb.....</i>	<i>27</i>
4.1.2 <i>Mehrfachnutzung der Elutionslösung</i>	<i>33</i>
4.1.3 <i>Langzeitstabilität der Membranen</i>	<i>35</i>
4.1.4 <i>Aufreinigung und Konfektionierung der gewonnenen Proteine.....</i>	<i>37</i>
4.1.5 <i>Reinheit und Aktivität der aufgereinigten Proteaseinhibitoren und Patatin.....</i>	<i>38</i>
4.1.6 <i>Zusammenfassung: Umbau und Optimierung der Technikumsanlage.....</i>	<i>40</i>
4.2 HUMANSTUDIE ZUM EINFLUSS VON PATATIN UND PI AUF SÄTTIGUNG UND HORMONSEKRETION .	42
4.3 HYDROLYSE DER PROTEINFRAKTIONEN.....	45
4.3.1 <i>Hydrolysebedingungen</i>	<i>45</i>
4.3.2 <i>Enzymatische Hydrolyse der Proteaseinhibitoren.....</i>	<i>47</i>
4.3.3 <i>Enzymatische Hydrolyse des Patatin</i>	<i>61</i>
5. FAZIT UND AUSBLICK.....	74
6. ANHANG.....	77
6.1 MATERIAL	77

6.1.1	<i>Geräteliste</i>	77
6.1.2	<i>Chemikalienliste</i>	79
6.2	DOWNSTREAM-METHODEN	82
6.2.1	<i>Fraktionierung der Kartoffelproteine</i>	82
6.2.2	<i>Crossflow-Ultra-/Diafiltration</i>	83
6.2.3	<i>Sprühtrocknung</i>	83
6.2.4	<i>Gefriertrocknung</i>	83
6.2.5	<i>Aufbau der FPLC-Anlage zur Proteinaufreinigung</i>	84
6.2.6	<i>Elutionsrückfluss der Q-Membran</i>	84
6.2.7	<i>Preistabelle der Komponenten zur Proteinpulverherstellung</i>	85
6.2.8	<i>Nomenklatur der Aminosäuren</i>	85
6.3	RP-HPLC-METHODIK	86
6.3.1	<i>Methodenentwicklung präparative RP-HPLC</i>	86
6.3.2	<i>RP-HPLC-OPA-Aminosäureanalytik</i>	88
6.3.3	<i>OPA-Assay</i>	89
6.3.4	<i>RP-HPLC Fingerprints</i>	90
6.3.5	<i>MALDI-ToF Massenspektrometrie</i>	90
6.4	BIOANALYTISCHE ASSAYS	91
6.4.1	<i>Bradford-Assay</i>	91
6.4.1	<i>Lowry-Assay</i>	91
6.4.2	<i>SDS-Gelelektrophorese</i>	91
6.4.3	<i>Lipidacylhydrolase-(LAH)-Assay</i>	93
6.4.4	<i>Proteaseinhibitor-Assay</i>	93
6.4.5	<i>Papain Aktivitäts Assay</i>	93
6.4.6	<i>Pepsin Aktivitäts Assay</i>	94
6.4.7	<i>ACE-Assay</i>	94
6.4.8	<i>TEAC-Assay</i>	95
6.4.9	<i>ORAC-Assay</i>	96
6.4.10	<i>Superoxid Anion Radikalfänger Assay</i>	96
6.4.11	<i>Broth-Mikroverdünnungsassays</i>	97
6.5	PROBANDENINFORMATIONEN UND FRAGEBÖGEN ZUR HUMANSTUDIE	97
	TABELLENVERZEICHNIS	107
	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	109
	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	111
	LITERATURVERZEICHNIS	113
	KOOPERIERENDE ARBEITEN	118
	LEBENS LAUF	119

Kurzzusammenfassung

Das bei der industriellen Stärkeproduktion anfallende Kartoffelfruchtwasser enthält als wertvolle Bestandteile Proteine. Diese können in ihrer nativen, bioaktiven Form über einen einstufigen Prozess mittels Membranadsorbertechnologie im Technikumsmaßstab gewonnen werden. Die Optimierung der Prozessparameter ist von großer Wichtigkeit, da eine effiziente und damit kosteneffektive Methode für die industrielle Nutzung von entscheidender Bedeutung ist. Die Technikumsanlage wurde hinsichtlich ihrer Funktion von einer Anlage mit zwei Membranadsorbermodulen zu einer Anlage mit vier Modulen umgerüstet. Zudem wurden Parameter wie die Langzeitstabilität der Module getestet wodurch der Prozess auf diesen Ergebnissen basierend optimiert werden kann. Die gewonnenen Proteine (Patatin und Proteaseinhibitoren) wurden nach der Aufreinigung erfolgreich auf Bioaktivität getestet. Um eine physiologische Wirksamkeit auf das Sättigungsempfinden in lebenden Organismen zu untersuchen, wurde eine cross-over-Humanstudie durchgeführt. Diese zeigte jedoch keine Hinweise auf physiologische Wirksamkeit im Menschen.

Die Proteine wurden zudem getrennt voneinander enzymatisch hydrolysiert, um über die Entstehung von Peptidabschnitten weitere bioaktive Wirkungen zu entfalten. Getestet wurden die Hydrolysate auf antioxidative, blutdrucksenkende und antimikrobielle Eigenschaften. Die Proteaseinhibitoren konnten durch vorangegangene saure Hydrolyse oder durch vorige Hitzeinaktivierung trotz ihrer Protease inhibierenden Eigenschaften hydrolysiert werden. Patatin hingegen wurde mit immobilisierten Enzymen hydrolysiert um eine Verunreinigung des Hydrolysats mit Autohydrolysaten der Enzyme zu vermeiden. Die Ergebnisse der Bioaktivitätstests deuten darauf hin, dass die Autohydrolysate der Enzyme ebenfalls Bioaktivitäten zeigen.

Keywords: Membranadsorber, Patatin, Proteaseinhibitoren, Proteinhydrolysate,

Abstract

Potato fruit juice, a byproduct of industrial potato starch production, contains proteins of high value. These proteins were obtained in their native, bioactive forms with a process involving membrane adsorber modules in pilot plant scale. In this work, some process parameters like long-term stability of the membranes or the upscale of the pilot plant were optimized to adapt the process for industrial applications. The upscale of the pilot plant was achieved by expanding the equipment from two integrated membrane adsorber modules to four modules.

After isolation of the proteins (Patatin & protease inhibitors), their bioactivity was tested. To check the physiological effects in living organisms, a cross-over-human-study was performed. This study revealed no significant data as to a physiological effect in humans.

Furthermore, the proteins were enzymatically hydrolyzed to obtain peptides with unique bioactivities. The hydrolysates were tested for; antioxidative, blood pressure lowering, and antimicrobial, capacities. The protease inhibitors were hydrolysed after heat treatment or acid hydrolysis, in order to ensure that their natural protease-inhibiting bioactivity would not affect the proteolytic enzymes. Patatin was hydrolysed by immobilized enzymes to produce a hydrolysate without contaminating peptide fragments from the auto-hydrolysis of the protease. The results showed a difference between the bioactivity of the immobilized vs. the native proteases. This leads to the conclusion that peptide fragments from the used enzymes also display bioactive properties.

Keywords: Membrane adsorber, Patatin, protease inhibitors, enzymatic hydrolysis

1. Einleitung

Die Zahl der ernährungsassoziierten chronischen Erkrankungen hat in den westlichen Industrieländern in den letzten Jahrzehnten weiter zugenommen. Zu diesen Krankheiten zählen zum Beispiel Adipositas, Herz- Kreislauferkrankungen und Diabetes mellitus. Um diesen Trend zu stoppen, werden vielfältige Maßnahmen insbesondere zur Prävention unternommen.

In der Lebensmittelindustrie findet dies seinen Niederschlag in der Entwicklung hin zu Lebensmitteln mit einem gesundheitlichen Zusatznutzen. Diese so genannten Functional Foods sollen neben ihrem klassischen Nährwert noch einen darüber hinausgehenden positiven Effekt auf die Gesundheit aufweisen. Beispiele für solche Lebensmittel sind Margarinen, die einen erhöhten Cholesterinspiegel senken können oder Säfte die durch einen Zusatz von Antioxidantien Zellen vor oxidativem Stress schützen sollen. Die am weitesten verbreiteten Functional Food Produkte stellen Joghurts dar, die verschiedene probiotische Bakterienkulturen enthalten und das Wohlbefinden vor allem im Darmbereich steigern und das Immunsystem stärken sollen. Diese gesundheitsfördernden Eigenschaften werden durch den Zusatz von funktionellen Inhaltsstoffen erreicht.

Produkte, aus denen diese gesundheitsfördernden Bestandteile gewonnen werden sind vielfältig, gleichzeitig ist jedoch der gesundheitliche Nutzen vieler Produkte umstritten. Für die Gewährleistung des Verbraucherschutzes wurde daher im Dezember 2006 in Europa die sogenannte „Claims Verordnung“ erlassen ((EG) Nr. 1924/2006). Sie regelt die Zulassung von nährwert- und gesundheitsbezogenen Angaben für Lebensmittel und hat u.a. dazu geführt, dass von wenigen Ausnahmen abgesehen seit Dezember 2012 nur gesundheitsbezogene Angaben nach vorheriger Zulassung gemacht werden dürfen. Für die Zulassung ist Voraussetzung, dass die jeweilige gesundheitsfördernde Wirkung eines Lebensmittels oder eines seiner Bestandteile am Menschen nachgewiesen ist.

Aus Sicht der Lebensmittelindustrie sind funktionelle Inhaltsstoffe besonders dann von Interesse, wenn diese Rohstoffe bei der Produktion eines bereits etablierten Produktes im Nebenstrom auftreten. Die Emsland-Stärke GmbH, Emlichheim, der größte Kartoffelstärkeproduzent Deutschlands, produziert jedes Jahr große Mengen Kartoffelfruchtwasser (KFW) als Nebenstromprodukt der Stärkeherstellung. In diesem KFW sind Proteine enthalten, die eine hohe biologische Wertigkeit besitzen. Erste Daten zeigten bereits nach der Isolierung dieser Proteine in nativer Form verschiedene

Biofunktionalitäten. Diese zusätzliche Nutzung des Nebenstromproduktes würde zudem den Gesamtprozess ökonomischer gestalten. Zurzeit wird das gesamte KFW getrocknet und als Viehfutter zu einem geringen Absatzpreis verkauft.

Der Forschungsansatz dieser Dissertation ist, aus diesem Nebenstromprodukt funktionelle Proteine und Peptide zu gewinnen und damit letztlich eine weitere Wertschöpfungskette zu generieren. Hierbei stehen neben Fragen der Isolierung, Prozessierung und biologischen Testung auch eine ressourcensparende und nachhaltige Verarbeitung des Produktes im Mittelpunkt.

2. Zielsetzung

Um aus dem industriellen Nebenstromprodukt Kartoffelfruchtwasser (KFW), welches neben den biofunktionellen Proteinen auch noch weitere Bestandteile wie Fasern, Zucker und Asche enthält, die Proteine selektiv aus den Produktströmen zu gewinnen wurde die Membranadsorbentechnik eingesetzt. Erste Versuche zum Aufbau einer Anlage im Technikumsmaßstab zur Aufreinigung der Proteine aus Kartoffelfruchtwasser haben bereits Erfolge gezeigt.

- In dieser Arbeit soll daher die bisher zur Aufreinigung von Kartoffelproteinen verwendete Anlage hinsichtlich ihrer Effektivität optimiert werden. Die zur Proteingewinnung genutzten Membranadsorber sollen hinsichtlich ihrer Langzeitstabilität und ihrer Nutzung in einem kontinuierlichen Prozesslauf verbessert werden.

Einige Veröffentlichungen deuten daraufhin, dass bestimmte Proteaseinhibitoren aus Kartoffeln einen sättigenden Effekt auf den Menschen haben.

- Daher werden die aufgereinigten und fraktionierten Proteine nach der Aufreinigung in Kooperation mit dem Institut für Lebensmittelwissenschaft und Humanernährung in Hannover in einer Humanstudie auf ihre sättigende Wirkung überprüft.
- Weiterführend werden die Proteine mit verschiedenen Proteasen enzymatisch hydrolysiert und auf bioaktive Wirksamkeit hinsichtlich ihrer blutdrucksenkenden, antioxidativen sowie ihrer antimikrobiellen Kapazität getestet.

3. Theoretischer Teil

3.1 Bioaktive Peptide: Eigenschaften, Bioverfügbarkeit und Vermarktung

3.1.1 Eigenschaften bioaktiver Peptide aus Nahrungsmitteln

Bioaktive Peptide sind Teil vieler pflanzlicher und tierischer Proteine. Sie können durch enzymatische Hydrolyse gewonnen aber auch synthetisch hergestellt werden und zeigen gesundheitsfördernde Wirkung bei verschiedenen Krankheiten. Sie können zum Beispiel Einfluss auf kardiovaskuläre Erkrankungen, Krebs oder entzündliche Erkrankungen nehmen [1].

In Abbildung 1 sind die verschiedenen biologischen Wirksamkeiten von Peptiden (am Beispiel von Milchprotein) auf den menschlichen Organismus aufgelistet. Im Folgenden werden die Wirkungen auf das Herz-Kreislaufsystem (mit Ausnahme der antithrombotischen Wirkung) sowie die antimikrobielle und immunmodulierende Wirkung näher beschrieben.

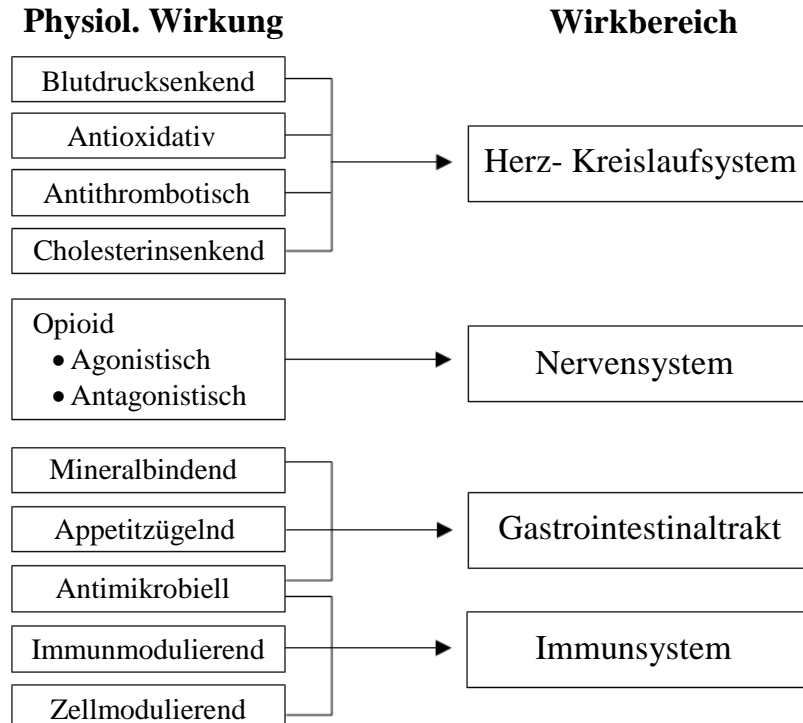


Abbildung 1: Physiologische Wirksamkeiten von bioaktiven Peptiden aus Milchprotein [2].

Neben Milch- und Molkenproteinen besitzen aber auch Proteine aus anderen tierischen Quellen wie Ei, Muskelfleisch und marinen Proteinquellen bioaktive Peptide. Die am meisten untersuchten pflanzlichen Proteinquellen sind Soja, Hülsenfrüchte, Weizen und

Hafer. Die Proteinquellen werden im Wesentlichen nach zwei Kriterien ausgewählt: Erstens proteinreiche industrielle Nebenstromprodukte und zweitens Proteine, die Peptidsequenzen enthalten, die pharmakologisch von Bedeutung sind [1]. Die Bioaktivität von Peptiden hängt von ihrer Kettenlänge und dem physikalisch-chemischen Verhalten ihrer Aminosäurereste (Hydrophobizität, Ladung oder Größe der Seitenketten) ab [3]. In der Literatur sind Peptide verschiedener Größen (Di-, Tri- und Oligopeptide aber auch höher molekulare Polypeptide) mit physiologisch relevanten bioaktiven Wirksamkeiten aufgeführt [4, 5]. Nachfolgend sind einige der am häufigsten untersuchten Bioaktivitäten näher charakterisiert.

3.1.1.1 Peptide mit blutdrucksenkender Wirkung

Der Blutdruck wird durch das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) reguliert (siehe Abbildung 2). Das in der Leber produzierte Angiotensinogen wird durch Renin in seine aktive Form Angiotensin I überführt. Dies ist der limitierende Schritt im RAAS Stoffwechsel. Anschließend wird das Angiotensin I am Histidylrest des C-Terminalen Endes durch das Angiotensin Converting Enzyme (ACE) in Angiotensin II umgewandelt. Angiotensin II ist ein Vasokonstriktor (gefäßverengend) und wirkt sich so auf die Erhöhung des Blutdrucks aus. Bei vermehrter Produktion von Angiotensin II ist eine Vasodilatation (Erweiterung der Gefäße) nicht möglich, was zu einem erhöhten Blutdruck führt. Zudem hemmt ACE Bradykinin. Bradykinin ist ebenfalls in die natürliche Regulierung des Blutdrucks involviert. Es erhöht den intrazellulären Ca^{2+} -Haushalt, was zur Aktivierung der Stickoxidsynthetase führt, die mit NO einen natürlichen Vasodilator produziert [1, 6].

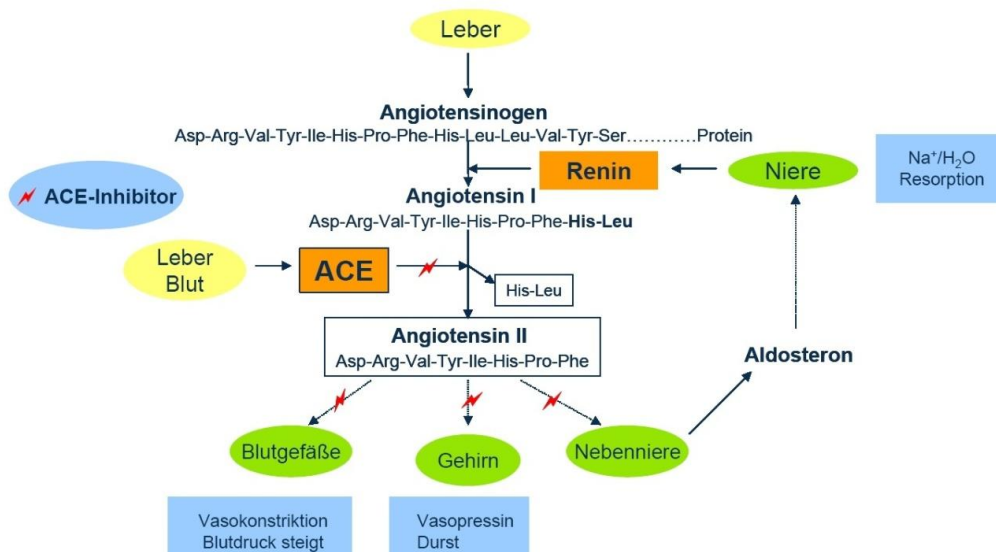


Abbildung 2: Funktionsweise des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) zur Regulierung des Blutdrucks [7].

Aufgrund dieser bedeutenden Auswirkungen von ACE auf die Regulierung des Blutdrucks wurde sich vorwiegend auf die Inhibierung dieses Enzyms konzentriert. Aber auch die Inhibierung von Renin könnte zur Senkung erhöhter Blutdruckspiegel beitragen [1]. Zum Vergleich der verschiedenen ACE-inhibierenden Peptide wird der IC_{50} -Wert herangezogen. Es ist die Konzentration an Inhibitor, die benötigt wird, um 50 % des ACE zu inhibieren.

Seit der Entdeckung des ersten oralen ACE-Inhibitors Anfang der 70er Jahre in Schlangengift [8-10] wurde eine Vielzahl von ACE-hemmenden Peptiden in Nahrungsmittelproteinen wie Milch, Fisch und Fleisch gefunden. ACE-hemmende Peptide besitzen in der Regel kurze Kettenlängen und einen unpolaren Aminosäurerest wie zum Beispiel Prolin [11].

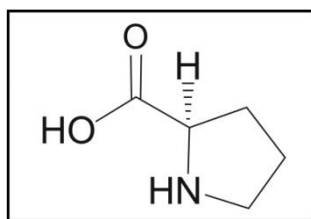


Abbildung 3: Prolin als Beispiel für eine kurzgekettige Aminosäure mit einem unpolaren Aminosäurerest [12].

Die in-vitro ermittelten Werte beziehen sich allerdings nicht immer direkt auf den in-vivo Blutdruck. So können langkettige Peptide, die in-vitro kaum eine ACE-hemmende Wirkung aufweisen, durch enzymatische Spaltung im Gastrointestinaltrakt, blutdrucksenkende Wirkung entfalten [13].

Der Mechanismus der ACE-Inhibierung wurde für die meisten Peptidabschnitte als kompetitiv beschrieben. Hierbei konkurriert das Peptid mit dem ACE-Substrat um das aktive Zentrum im ACE. Aber es konnte auch unkompetitive Hemmung (z.B. Phe-Tyr und Ile-Trp) und nicht kompetitive Hemmung (z.B. Ile-Tyr und Leu-Trp) einiger Peptide festgestellt werden (Aminosäuresequenz als Dreibuchstabencode siehe Anhang Abbildung 28). Bei diesem Hemmtyp bindet das Peptid an einer anderen Stelle als dem aktiven Zentrum des ACE und bewirkt eine Konformationsänderung, was zu einer Verringerung der Aktivität führt [14]. Als wichtigste strukturelle Eigenschaft für Di- und Tripeptide gilt ein großer hydrophober Aminosäurerest (z.B. Phe, Trp, Tyr und Pro) am C-Terminus und eine N-terminale aliphatische Aminosäure (z.B. Val, Leu und Ile). Bei größeren Peptidketten zwischen 4 und 10 Aminosäuren ist entscheidend, dass die letzten 4 C-Terminalen Aminosäuren hauptsächlich hydrophob sind [1]. Die

bekanntesten blutdrucksenkenden Peptide sind Val-Pro-Pro und Ile-Pro-Pro aus Milchprotein, die ebenfalls diesen Strukturtyp aufweisen [15].

Zudem konnten Peptide gefunden werden, die eine inhibierende Wirkung auf Renin zeigen. Ein Hydrolysat aus Leinsamen mit verschiedenen Proteasen zeigte nach Ultrafiltration Fraktionen, die in-vitro Renin-inhibierende Wirkung aufwiesen [16]. Dieselben Fraktionen zeigten zudem leichte ACE-hemmende Wirkung. Dieser doppelte Effekt auf das RAAS könnte die blutdrucksenkende Wirkung in-vivo erhöhen.

In-vivo Studien werden hauptsächlich an spontanen hypertensiven Ratten (SHR) durchgeführt. Eine Studie von Girgih et. al. zeigt, dass ein Hanfsamenhydrolysat mit Renin- und ACE-hemmender Wirkung eine Senkung des systolischen Blutdrucks in SHR bewirken kann [17]. Diese blutdrucksenkende Wirkung liegt in der gleichen Größenordnung wie die der kommerziell erhältlichen Peptide aus Milchprotein [1].

3.1.1.2 Peptide mit antioxidativer Wirkung

In der Lebensmittelindustrie werden hauptsächlich synthetisch hergestellte Peptide als Antioxidationsmittel und als Konservierungsmittel genutzt. Bioaktive Peptide mit antioxidativer Wirkung bringen gleich zwei Vorteile mit sich. Zum Einen dienen sie als Konservierungsmittel, zum Anderen zeigen sie eine gesundheitsfördernde Wirkung [1]. Der oxidative Stoffwechsel von Zellen führt zu Nebenprodukten wie reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und freien Radikalen. In einem Gleichgewichtszustand des Körpers werden diese von protektiven Enzymen wie Catalase, Peroxidase oder Superoxiddismutase abgefangen. Entsteht jedoch ein Überschuss an freien Radikalen und ROS, können diese Membranlipide, DNA und Zellproteine oxidieren. Dies führt zu Zellschädigungen und kann sogar zur Apoptose der Zellen führen [18]. Ein Eingreifen, um diese schädigenden Vorgänge zu verringern, ist daher nötig. Die erhöhte Aufnahme von Peptiden hat dabei einen entscheidenden Einfluss und wurde bereits beschrieben. Huang et. al. zeigten die antioxidativen Eigenschaften von Peptiden mit dem Abfangen von ROS und freien Radikalen sowie der Inhibierung von ROS induzierter Membranoxidation von Makromolekülen wie DNA, Fetten und Proteinen. Sie stellten ebenso fest, dass die Eigenschaft der Peptide als Radikalfänger an einer einmaligen Elektronenübertragungsreaktion liegt [19].

Der Anteil an bestimmten Aminosäuren wie Cystein, Histidin, Methionin, Prolin und aromatischen Aminosäuren in der Peptidsequenz ist von entscheidender Bedeutung. Ein Histidinrest kann zum Beispiel Metallionen komplexieren und aktiven Sauerstoff sowie radikale Hydroxylgruppen abfangen. Diese Eigenschaften werden der Imidazolgruppe

zugeschrieben, die sowohl an Elektronen-, als auch an Wasserstoff Übertragungsreaktionen beteiligt ist. So eine antioxidative Wirksamkeit wurde zum Beispiel für Carnosin (β -Ala-His) beschrieben [1].

3.1.1.3 Peptide mit antimikrobieller, immunmodulierender und cholesterinsenkender Wirkung

Unter den bioaktiven Peptiden sind die mit Wirkung auf das Herz-Kreislaufsystem am besten untersucht. In den letzten 50 Jahren haben sich jedoch durch den vermehrten Einsatz von Antibiotika im medizinischen und landwirtschaftlichen Bereich Krankheitserreger mit Resistenzen gegen diese gebildet. Dadurch wird die Therapie von infektiösen Krankheiten mit solchen Mikroorganismen erschwert [18]. Bisher wurden antimikrobielle Peptide hauptsächlich in Milch identifiziert. Sie richten sich gegen gram-positive (*Staphylococcus* und *Listeria*) und gram-negative (*Salmonella*, *Heliobacter* und *Escherichia*) Bakterien. Aber sie können auch gegen Hefen und filamentöse Pilze wachstumshemmend wirken. Die am häufigsten untersuchten Peptide sind die Lactoferricine aus menschlichem und Rinder-Lactoferrin. Ihr antimikrobieller Mechanismus wird der Zerstörung der Membranpermeabilität zugeschrieben [20]. Antimikrobielle Peptide könnten vielfältig eingesetzt werden, zum Beispiel in der Pharmaindustrie oder der Lebensmittelsicherheit [18].

Immunmodulierende Peptide können die Proliferation von Lymphozyten, die Antikörperproduktion, die Cytokinregulation und die Produktion von natürlichen Killerzellen beeinflussen [20]. So wurden Peptide gefunden, die sich während der Fermentation von Milch mit Milchsäurebakterien bilden und die Proliferation von menschlichen Lymphocyten beeinflussen. Zudem verringern sie die Produktion verschiedener Cytokine und stimulieren die Aktivität von Makrophagen. Solche Peptide könnten in der Kinder- und Säuglingsernährung eingesetzt werden, um das Immunsystem zu stärken [2]. Weiterhin wurden aus Eiprotein Peptide isoliert, die immunstimulierende Aktivität besitzen und in der Krebstherapie zur Stärkung des Immunsystems eingesetzt werden können [21]. Auch der tryptische Verdau von Reisprotein zeigte eine Verbesserung des menschlichen Immunsystems, durch die Förderung der Phagozytose und die Erhöhung der Superoxidanionenproduktion in polymorphkernigen Leukozyten [1].

Die am häufigsten in der Literatur beschriebenen cholesterinsenkenden Peptide stammen aus Sojaprotein, aber auch aus Casein und Molkenprotein wurden Peptide mit einer cholesterinsenkenden Wirkung gewonnen [1, 22, 23]. So regt zum Beispiel ein aus

Sojaprotein gewonnenes Oktapeptid (FVVNATSN) die Transkription von LDL (Low Density Lipoprotein) Rezeptoren in menschlichen Leberzellen an (Aminosäuresequenz als Einbuchstabencode siehe Anhang Abbildung 28). Ebenfalls cholesterinsenkende Wirkung zeigten Sojaproteinhydrolysate, indem sie Gallensäure und freie Sterine im Darm binden und damit zu einer Erhöhung der Darmtätigkeit führen [1].

3.1.2 Bioverfügbarkeit von bioaktiven Peptiden

Viele aus pflanzlichem und tierischem Protein gewonnene Peptide zeigen in in-vitro Assays eine bioaktive Wirksamkeit. Doch das heißt nicht, dass sie auch in-vivo ihre Wirksamkeiten entfalten können. Dies hängt sehr stark von der Bioverfügbarkeit, der Anfälligkeit der Peptide gegenüber weiterer enzymatischer Hydrolyse und der Absorption der Peptide ab. Bioaktive Peptide, die in funktionellen Lebensmitteln eingesetzt werden sollen, müssen stabil gegenüber gastrointestinalen Proteasen sein und auch nach dem Weg durch die Enterocyten im Blut gegenüber den Serumpeptidasen Stabilität aufweisen [1]. Normalerweise werden Nahrungsmittelproteine im Magen-Darmtrakt in freie Aminosäuren (AS), Di-, Tri- und Oligopeptide gespalten und über die Bürstensaummembran im Dickdarm aufgenommen. Dort werden diese von den Enterocyten aufgenommen, um weiter zu freien AS gespalten zu werden. Es ist daher erstaunlich, dass 30-50 % des Stickstoffs über die Aufnahme von intakten Di-, Tri- und Oligopeptiden geschieht. Es existieren verschiedene Transportmechanismen über die Darmschleimhaut die in Abbildung 4 dargestellt sind [24, 25]. So haben die Peptide die Möglichkeit, parazellulär (1) also zwischen den Zellen hindurch transportiert zu werden, über passive Diffusion (2) oder ein Transportsystem durch die Zelle zu gelangen. Außerdem können sie über Endocytose (3) oder über ein Carrier-System (4) die Zellen passieren.

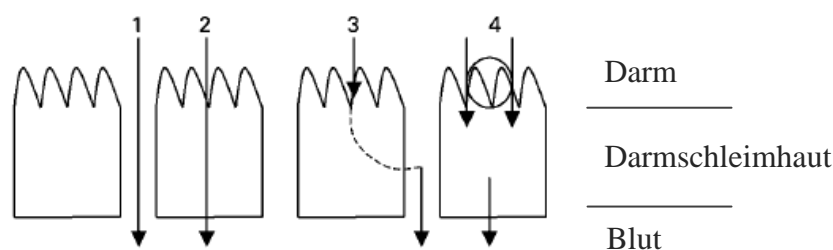


Abbildung 4: Transportmechanismen für Peptide über die Darmschleimhaut: Parazellulär (1), Passive Diffusion (2), Endocytose (3), Transport über Carrier (4) [24].

Über den PepT1 Transporter können Peptide direkt ins Blut aufgenommen werden. Abbildung 5 zeigt den Weg von Oligopeptiden (Substrat) über die Enterozyten bis ins Blut.

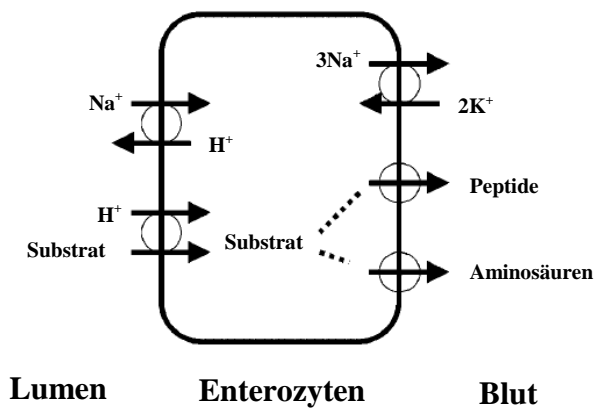


Abbildung 5: Transzellulärer Peptidtransport über PepT1 [26].

Vom intestinalen Lumen werden die Peptide über den apikalen protonenabhängigen PepT1 Transporter in die Zelle geschleust. In den Enterozyten werden die Peptide durch intrazelluläre Proteasen weiter hydrolysiert. Die entstehenden Aminosäuren werden über die basolaterale Membran direkt ins Blut transportiert. Entstandene Peptide werden über ein basolaterales Peptid Transportsystem aus der Zelle ins Serum geschleust. Durch die Na⁺/H⁺ Pumpe entsteht ein Protonengradient, der die Aufnahme von Peptiden in die Enterozyten verstärkt. Die Energie für die Na⁺/H⁺-Pumpe wird von der Na⁺/K⁺-ATPase geliefert [26].

Das Tripeptid Ile-Pro-Pro zum Beispiel wurde nach Nüchternaufnahme eines Joghurts bei Patienten mit normalem Blutdruck im Serum nachgewiesen [27]. Die Stabilität von Peptiden im Serum ist jedoch nicht sehr hoch. Häufig besitzen sie nur eine Halbwertszeit von wenigen Minuten. Daher ist es beispielsweise bei ACE-hemmenden Oligopeptiden wichtig, dass die nach der Spaltung durch das ACE freigesetzten Peptide ebenfalls eine ACE-hemmende Wirkung aufweisen. Nur diese ACE-hemmenden Oligopeptide konnten nach oraler Aufnahme eine blutdrucksenkende Wirkung in SHR bewirken. Ein zusätzlich limitierender Faktor ist das in-vivo Testobjekt. Das Tripeptid TRH (Thyrotropin-Releasing-Hormon) sowie das Decapeptid LRH (Luteinizing-Hormon-Releasing-Hormon) wurden in Ratten und in Hunden getestet. In Ratten wurde lediglich 1 % TRH absorbiert, wohingegen beim Hund 10 % absorbiert wurden. Dies zeigt, wie stark der Organismus die Wirksamkeit von bioaktiven Peptiden beeinflusst [24, 28, 29]. Generell ist festzustellen, dass die Absorption von Peptiden mit zunehmender Kettenlänge sinkt. Zudem besitzen die meisten Peptide hydrophilen Charakter. Durch den Aufbau der Zellmembran mit einer Lipiddoppelschicht wird die Aufnahme von hydrophilen Bestandteilen stark erschwert.

3.1.3 Kommerziell erhältliche Produkte mit bioaktiven Peptiden

Wie in Kapitel 3.1.1 dargestellt, existiert eine Vielzahl von bioaktiven Peptiden aus verschiedensten Proteinquellen. Sie können über Fermentationsprozesse, enzymkatalysierte Hydrolyse oder beim Verdau im menschlichen Gastrointestinaltrakt entstehen.

In Tabelle 1 sind einige Beispiele für Produkte mit solchen bioaktiven Peptiden aufgelistet. Diese stammen aus dem Functional Food-Bereich, aus der Mundhygiene sowie dem Nahrungsmittelergänzungssektor.

Tabelle 1: Beispiele für Nahrungsmittel mit bioaktiven Peptiden. Modifiziert nach Korhonen et. al. (2006), Hartmann et. al. (2007) und Fitzgerald et. al. (2011) [2, 6, 20].

Produktname	Produkttyp	Hersteller	Bioaktive Peptide	Wirkung
Calpis oder Calpico	Sauermilch	Calpis Co., Japan	VPP, IPP aus β - and κ -CN	Blutdruck-senkend
Evolus	Fermentierte Milch	Valio, Finnland	VPP, IPP aus β - and κ -CN	
BioZate	β -LG Hydrolysat	Davisco, USA	Molkenpeptide	
Valtyron	Zusatzstoff	Senmi Ekisu Co. Ltd., Japan	VY aus Sardinien	
CSPHP oder CholesteBlock	Zusatzstoff	Kyowa Hakko, Japan	Sojaprotein-hydrolysat mit gebundenem Phospholipid	cholesterin-senkend
CSPHP ProDiet F200	Milchgetränk Kapseln	Ingredia, Frankreich	YLGYLEQLLR aus Milchprotein	stress-reduzierend
BioPURE-GMP	Molkenprotein-hydrolysat, Zahnpasta	Davisco, USA	Glycomacropptide	antikarziogen, antimikrobiell, antithrombotisch
Capolac	Zusatzstoff	Arla Foods, Dänemark	Caseinphosphopeptide	fördert die Mineralabsorption
Tekkotsu Inryou	Erfrischungsgetränk	Suntory, Japan	Caseinphosphopeptide	

Ein großer Markt für bioaktive Peptide und Proteinhydrolysate ist die Sportlerernährung. Hier wird zum Beispiel das Whey-Protein-Hydrolysat von Bodylab24 zum Muskelaufbau vertrieben. Es enthält laut Hersteller eine Kombination aus Molkenkonzentrat und –isolat [30]. Aber auch Hydrolysate aus Soja oder Collagen werden als Nahrungsergänzungsmittel zum Muskelaufbau verkauft.

Diese Produkte stellen nur eine kleine Auswahl an weltweit erhältlichen Lebensmitteln und Lebensmittelzusatzstoffen dar. In Deutschland ist von den in Tabelle 1 aufgeführten Lebensmitteln lediglich Calpis / Calpico erhältlich.

Ebenso entstehen bioaktive Peptide nach dem Verzehr von Lebensmitteln mit Vorläuferproteinen durch enzymatische Reaktionen im Darm. In deklarierten Functional Food Produkten wurden die Peptide entweder zugesetzt oder durch Erweiterung des normalen Produktionsprozesses angereichert. Einige bioaktive Peptide sind auch in anderen Produkten zugesetzt, so zum Beispiel Caseinphosphopeptide, die als mineralbindender Zusatzstoff in Zahnpasta, Mundspülung (Prospec MI Paste™, GC Tooth Mousse™) oder Kaugummi (Recaldent™, Trident™) eingesetzt werden [20].

Seit am 15. Mai 1997 in Deutschland die Novel-Food Verordnung in Kraft ((EG) Nr. 258/97) trat, müssen neue Produkte erst vom Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit genehmigt werden, bevor sie an den Verbraucher weitergegeben werden können. Die Verordnung regelt die Zulassung für Produkte, die vor dem 15. Mai 1997 noch nicht in nennenswertem Umfang in der EU verzehrt wurden. Zudem wurde 2006 die Health Claims Verordnung ((EG) Nr. 1924/2006) erlassen. Diese regelt die Kennzeichnung von Produkten mit gesundheitlichem Zusatznutzen. Seit dem 14. Dezember 2012 gilt ein entsprechendes Werbeverbot für nicht zugelassene Produkte, an das sich Hersteller von Funktional Food Produkten halten müssen [31].

Die Produktion von bioaktiven Peptiden als Zusatz für Lebensmittel kann über künstliche Synthese des gewünschten Abschnitts oder durch enzymatische Hydrolyse geschehen. Bei Letzterem besteht die Möglichkeit, das ausgewählte Protein mit einer Enzymlösung zu versetzen und die Peptide anschließend aufzureinigen. Allerdings besteht hier die Gefahr, dass das Enzym einer Eigenhydrolyse unterliegt und sich zusätzlich zu den Peptidabschnitten des Proteins auch Peptidabschnitte des Enzyms oder der Enzyme in dem Hydrolysat befinden. Eine Lösung dieses Problems wäre die Immobilisierung der entsprechenden Enzyme.

3.2 Immobilisierung von Enzymen in der technischen Produktion

Der Weltmarkt für Enzyme betrifft hauptsächlich nicht immobilisierte Enzyme (hauptsächlich Hydrolasen) und lag 2010 bei über 3,3 Milliarden US Dollar. Der Anteil an immobilisierten Enzymen lag dabei unter 160 Millionen. Der Hauptanteil der Enzyme ging mit je 21 % in die Pharmazeutische- und die Lebensmittel- und Getränkeindustrie. Die restlichen 58 % sind in Zweige wie Biotechnologie F&E (12 %), Haushaltswaren (15 %), Biodiesel-Produktion (9 %) und Weitere aufgeteilt. Der Markt für die Herstellung dieser Enzyme wird von drei Firmen dominiert: Novozymes (Dänemark), Genencor International Inc. (USA) und DSM N.V. (Niederlande). Mit einem Marktanteil von 47 % (2009) ist Novozymes der Marktführer [32, 33].

Für die industrielle Produktion mit immobilisierten Enzymen ist ausschlaggebend, dass es einen entscheidenden Vorteil dieser Enzyme gegenüber nativ eingesetzten Enzymen oder chemischen Katalysatoren gibt. Die allgemeinen Vor- und Nachteile sind in Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 2: Vor- und Nachteile von immobilisierten Enzymen [32].

Vorteile	Nachteile
mehrfach verwendbar	Verlust von Enzymaktivität
positive Auswirkungen auf Temperatur- und pH-Stabilität	eingeschränkte Stoffübertragung
höhere Stabilität gegenüber der nativen Form	Kosten des Immobilisierungsprozesses
Co-Immobilisierung mit anderen Enzymen möglich	Möglichkeit zum Fouling
für kontinuierliche- und batch-Verfahren geeignet	unerwünschte Verschiebungen in der Enzymkinetik
einfache Abtrennung der Enzyme vom Produkt	Kosten von Träger und Fixiermittel

Für einen industriellen Prozess ist nicht allein die Wiederverwendbarkeit immobilisierter Enzyme ausschlaggebend, bietet jedoch einen Anreiz. Vor allem, da die Kosten für industrielle Enzyme, bezogen auf die Gesamtkosten eines Produktionsprozesses gesehen, relativ gering sind. Die Kosten für die meisten Enzyme

liegen zwischen 50 und 500 US Dollar pro kg. So liegt zum Beispiel der Enzymanteil der Kosten für 1 Liter Ethanol aus Stärke bei 1 Cent. Daher müssen weitere Vorteile greifen, wie zum Beispiel die rückstandslose Abtrennung des Enzyms vom Produkt, beispielsweise bei der Herstellung von Arzneimitteln [32].

Tabelle 3 zeigt einen Überblick über einige Prozesse mit Produktionsmengen im Tonnenmaßstab, bei denen immobilisierte Enzyme verwendet werden. Die Form der Immobilisierung reicht von kovalent immobilisierten Enzymen bis zu einem Crosslinking von ganzen Zellen.

Tabelle 3: Industrielle Prozesse, in denen immobilisierte Enzyme verwendet werden [32].

Enzym	Prozess	Form*	Maßstab (Tonnen/Jahr)
Aspartase	L-Asparaginsäure aus Fumarsäure	IE, CGZ	10 ⁴
Glucose Isomerase	Glucose-Fructose-Sirup aus Glucosesirup	IE, KIE, CGZ	10 ⁷
Lactase	Hydrolyse von Milchzucker	IE	10 ⁵
Lipase	Umesterung von Fetten	IE	10 ⁵
Lipase	Biodiesel aus Triglyceriden	IE	10 ⁴
Lipase	Racematspaltung von Alkoholen und Aminen	IE, CGZ	10 ³
Nitril Hydratase	Acrylamid aus Acrylnitril	CGZ	10 ⁵
Penicillin G acylase	Modifizierung von Antibiotika	KIE	10 ⁴
Thermolysin	Aspartam Synthese	IE	10 ⁴

* IE = immobilisiertes Enzym; KIE = kovalent immobilisiertes Enzym; CGZ = Crosslinking ganze Zelle

Die Herstellung von Glucose-Fructose-Sirup liegt mit 10⁷ Tonnen pro Jahr an der Spitze der Prozesse mit immobilisierten Enzymen.

3.2.1 Arten der Immobilisierung

Enzyme können mit verschiedenen Methoden immobilisiert werden. Die Auswahl der Methode hängt von der Art des Enzyms, des Einsatzgebiets und gegebenenfalls vom Trägermaterial ab. Die verschiedenen Methoden zur Immobilisierung lassen sich zum Beispiel nach ihrem Bindungstyp charakterisieren [34]. Nachfolgend sind einige Beispiele für die kovalente, die nicht-kovalente und die Immobilisierung durch Einschluss aufgezeigt.

Bei der kovalenten Immobilisierung kann zwischen dem Crosslinking und der Bindung an einen Träger unterschieden werden.

Beim Crosslinking werden bifunktionale Kohlenwasserstoffe zur Verbrückung der Proteine, wie zum Beispiel Glutaraldehyd oder Toluendiisocyanat als Reagenz verwendet. Die Enzyme reagieren mit dem Reagenz und bilden eine Polymermatrix. Die herkömmliche Art des Crosslinking findet jedoch aufgrund der geringen mechanischen und hydrodynamischen Stabilität kaum Verwendung [34, 35]. In den letzten Jahren sind Crosslinking Methoden entwickelt worden, die eine höhere physikalische Stabilität aufweisen. Sogenannte Crosslinked Enzyme Crystals (CLEC) sind kristallisierte Enzyme, die Partikelgrößen von 1 - 100 µm aufweisen und in organischen Lösemitteln verwendet werden können (siehe Abbildung 6). Sie bestehen nur aus einem einzigen Enzym, wodurch eine Reaktion durch keine weiteren Aktivitäten kontaminiert wird. Der Nachteil der CLEC ist die hohe Reinheit, die das Enzym aufweisen muss, um einen solchen Enzymkristall zu bilden, was zu höheren Produktionskosten führt. Zudem können nur Enzyme verwendet werden, die sich kristallisieren lassen. Vertrieben werden die CLEC von Althea Technologies, Inc., Kalifornien [36, 37]. Eine weitere Methode besteht in der Ausfällung der Enzyme und dem Crosslinking der Aggregate (CLEA). Sie bilden Partikelgrößen von 50-100 µm im Durchmesser (siehe Abbildung 6). Nachteilig ist, dass das Ausfällen der Proteine zu einem Aktivitätsverlust führen kann. Bei CLEA mit enthaltenen Carriern oder Vernetzermolekülen kann die Dissoziation von Fremdproteinen in den Aggregaten zum Auslaufen dieser führen, wenn nur eins der Monomere gebunden war. Sie werden von CLEA Technologies B. V., Niederlande vertrieben [36-39].

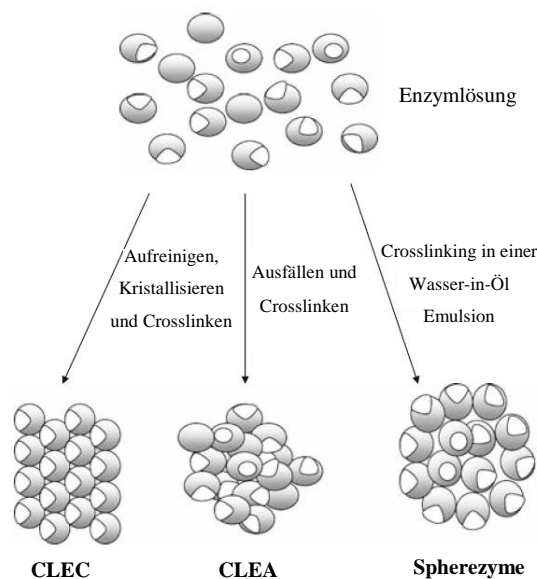


Abbildung 6: Verschiedene Methoden der Selbstimmobilisierung [35].

Eine neuere Methode auf dem Gebiet der Selbstimmobilisierung von Enzymen ist die Bildung von Spherezymen (siehe Abbildung 6). Spherezymen sind in wässrigen, sowie organischen Lösemitteln aktiv. Das Patent zur Immobilisierung von Enzymen nach diesem Prinzip besteht seit 2005 [36, 40].

Bei der klassischen Methode der kovalenten Bindung wird zwischen einem Trägermaterial und den reaktiven Aminosäureresten des Enzyms (hydrophobe Reste oder Ionengruppen) eine „echte“ Bindung ausgebildet. Dies geschieht wenn möglich mit Aminosäureresten, die nicht am aktiven Zentrum des Enzyms beteiligt sind [34]. Als häufigste funktionelle Gruppen befinden sich Epoxidgruppen auf der Oberfläche von Trägermaterialien. Sie binden Lysin (eine Aminosäure, die häufig auf der Oberfläche von Proteinen lokalisiert ist), reagieren mit Proteinen unter milden Reaktionsbedingungen und sind relativ stabil [36]. Beispiele für Träger mit Epoxidgruppen sind Eupergit[®] und Sepabeads. In Abbildung 7 ist eine kovalente Bindung an einen Epoxidträger am Beispiel von Eupergit[®] C zu sehen.

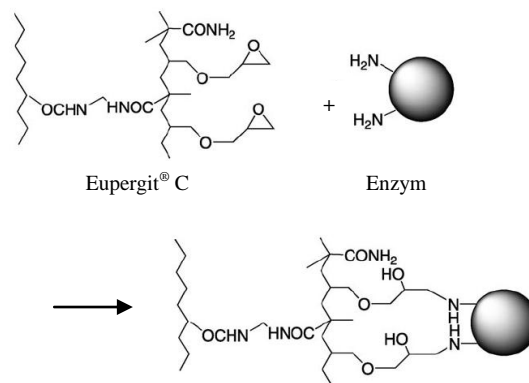


Abbildung 7: Bindung eines Enzyms an den Träger Eupergit[®] C [41].

Vorteile dieser Immobilisierungsart liegen in der stabilen Bindung zwischen Enzym und Träger dadurch kann eine Kontamination des Prozesses mit Enzym vermieden werden. Zudem können die Enzyme durch die Bindung an der Oberfläche des Trägers leicht mit dem Substrat in Kontakt treten. Auch wurden höhere Temperatur- und pH-Stabilitäten bei kovalent immobilisierten Enzymen beobachtet. Nachteilig ist die mögliche Konformationsänderung der Enzyme durch die Bindung und ein damit einhergehender Aktivitätsverlust, sowie eine Bindung, die das Aktive Zentrum des Enzyms für das Substrat unzugänglich macht. Zudem können die Träger nach erstmaliger Immobilisierung nicht wiederverwendet werden [34-36, 41, 42].

Eine weitere Methode zur Immobilisierung von Enzymen ist die physikalische Adsorption oder die ionische Bindung an einen Träger. Als Träger werden synthetische

Harze aber auch natürliche Materialien wie Chitosan verwendet. Als Träger für die ionische Bindung eignen sich zum Beispiel Polysaccharid-Biopolymere wie Agarose, Dextran oder Chitosan. Diese Polymere können mit verschiedenen Verbindungen wie Diethylaminoethyl, Carboxymethyl oder quaternärem Ammonium funktionalisiert sein. Möglichkeiten für die adsorptive Bindung sind hydrophobe Wechselwirkungen, van der Waal's Kräfte und Wasserstoffbrückenbindungen. Die Bindung an den Träger ist relativ schwach und kann durch die Konzentration des Substrats oder die Temperatur beeinflusst werden. Es kann sogar zur Ablösung der Enzyme vom Trägermaterial kommen. Von Vorteil ist, dass die Materialien wiederverwendbar sind. Zudem eignet sich diese Methode sehr gut für Reaktionen in organischen Lösemitteln, da sich die Enzyme in diesem Medium nicht von ihrem Trägermaterial ablösen lassen [34-36].

Es gibt noch weitere Möglichkeiten der nicht-kovalenten Immobilisierung, wie zum Beispiel die Dispersion, bei der ein trockenes, wasserlösliches Enzym in einem organischen Lösemittel dispergiert wird.

Enzyme können zum Beispiel in einer hydrolytisch polymerisierten Silica Sol-Gel Matrix, in Polyacrylamid-Gelen oder Alginat-Gelen eingeschlossen werden. Die Gele lassen sich modifizieren, indem die Polymerisationsbedingungen geändert werden. So kann die Trocknungsmethode oder die Zusammensetzung des Polymers Einfluss auf die Porosität des Gels haben. Die Enzyme sind innerhalb dieser Polymermatrix eingeschlossen und somit vor ihrer Umgebung (mechanischem Scherstress, Blasenbildung, hydrophoben Lösemitteln, höher molekularen Proteaseinhibitoren) geschützt. Nachteilig sind die geringe Enzymdichte, sowie eine eingeschränkte Stoffübertragung [34, 36]

Im Folgenden werden die Kartoffel und ihre Proteinbestandteile näher betrachtet, um letztlich die hier gewählte Proteinaufreinigungsstrategie zu erläutern.

3.3 Inhaltsstoffe der Kartoffel

Die Kartoffel hat laut der Centralen Marketing-Gesellschaft der deutschen Agrarwirtschaft mbH i.L. (CMA) in 100 g essbarem Anteil einen Vitamin-C-Gehalt von 17 mg. Beim Kochen können davon bis zu 40 % verloren gehen. Weitere Vitamine in der Kartoffel sind Vitamin B₁, Panthothensäure und Vitamin B₆. Die Kartoffel enthält außerdem Mineralstoffe wie Natrium, Kalium, Magnesium und Eisen [43]. Der Hauptbestandteil der Kartoffel ist Wasser (ca. 75 %), damit zählt sie zu den energiearmen Lebensmitteln. Stärke, die der Kartoffel als Energiespeicher dient, ist mit einem Anteil von etwa 19 % vertreten. Der Proteinanteil in der Kartoffel beträgt ca. 2 %. Ansonsten sind noch Bestandteile wie Pflanzenfasern, Asche, lösliche Kohlenhydrate und Lipide enthalten [44].

Die Kartoffelproteine zeigen eine hohe ernährungsphysiologische Qualität, auch biologische Wertigkeit genannt. Sie bezeichnet die Menge an Protein, die aufgenommen werden muss, um das Gleichgewicht der Stickstoffbilanz im Organismus aufrechtzuerhalten. Die verschiedenen Aminosäuren tragen zur Aufrechterhaltung dieser bei. Der Anteil der am geringsten vorhandenen essentiellen Aminosäure limitiert dabei die Wertigkeit des Gesamtproteins. Die biologische Wertigkeit eines Proteins wird in Relation zum Referenzprotein Hühner-Vollei, dessen Wert als 100 definiert ist, angegeben. Die Wertigkeit des Kartoffelproteins liegt mit 76 im oberen Bereich pflanzlicher Lebensmittel. Die limitierende Aminosäure ist Tryptophan [45].

Die Kartoffel stellt den wichtigsten Rohstoff für die deutsche Stärkeindustrie dar. 2009/2010 wurden aus 2.878.000 t Kartoffeln 717.000 t Stärke hergestellt [46]. Während des Herstellungsprozesses von Stärke fällt als Nebenstromprodukt Kartoffelfruchtwasser (KFW) an. In diesem KFW reichern sich alle Nebenprodukte der Stärkeherstellung, unter anderem die in der Kartoffel enthaltenen Proteine, an. Anschließend wird aus dem anfallenden Kartoffelfruchtwasser durch Heißdampfinjektion hitzeokoagulierte Kartoffelprotein gewonnen. Die Proteine weisen nach der Hitzeokoagulation keine Bioaktivitäten mehr auf. Um die Proteine in ihrer bioaktiven (nativen) Form zu gewinnen, müssen sie dem KFW vor der Hitzeokoagulation entzogen werden. Das während des Prozesses anfallende KFW enthält neben den Proteinen noch andere Bestandteile, wie Peptide und Aminosäuren, Kohlenhydrate, verschiedene organische Säuren und Spurenelemente wie Kalium und Phosphor [45]. Die im KFW enthaltenen Proteine lassen sich in drei Gruppen unterteilen.

- Verschiedene Isoformen des Glycoproteins Patatin (40 - 60 %)
- Proteaseinhibitoren (~50 %)
- Höher molekulare Proteine (~10 %)

Die Zusammensetzung der im KFW enthaltenen Proteine ist in Tabelle 4 dargestellt. Im Folgenden werden die einzelnen Proteinklassen näher beschrieben.

Tabelle 4: Zusammensetzung der Proteine im KFW [45].

Protein	molare Masse [kDa]	pI-Wert	Anteil [%]	Inhibitoraktivität Chymotrypsin/Trypsin [%]
Patatin	40-44 ¹⁾	4,5-5,2	40-60	-
Potato Proteaseinhibitor I (PI-I)	7,8	5,1-7,8	4,5	19/2
Potato Proteaseinhibitor II (PI-II)	20,4 ²⁾	5,5-6,9	22	82/50
Potato-Cystein-Proteaseinhibitor (PCPI)	20,1-22,8	5,8-9,0	12	16/10 (auch gegen Papain)
Potato-Kunitz-Proteaseinhibitor (PKPI)	20,2	8,0-9,0	4	2/3
Potato-Carboxypeptidasen (PCI)	4,3	n.b.	1	n.b. ³⁾
Serin-Proteaseinhibitor (OSPI)	12,3; 21,0; 21,8	7,5-8,8	1,5	2/3
Potato-Aspartyl-Proteaseinhibitor (PAPI)	19,9-22	6,2-8,7	6	9/2 (auch gegen Cathepsin D)
Polyphenoloxidasen (PPO)	60-69	n.b.	n.b.	-
Phosphorylase-Isoenzym	95; 110	n.b.	n.b.	-
Stärkesynthasene	139	n.b.	n.b.	-
Proteinkinasen	n.b.	n.b.	n.b.	-
Lectin	65,5	n.b.	n.b.	-

¹⁾ Dimer: ~ 80 kDa

²⁾ Monomer: 10,2 kDa

³⁾ inhibiert Metallo-Carboxypeptidasen

3.3.1 Patatin

Patatin als Hauptspeicherprotein der Kartoffel stellt mengenmäßig das wichtigste lösliche Kartoffelprotein dar. Die Aufgabe der Speicherproteine besteht in der Einlagerung von Stickstoff, Kohlenstoff und Schwefel. Sie gleichen den Nährstoffmangel der Pflanze zwischen den Wachstumsperioden aus [47]. Patatin gehört zur Gruppe der Glykoproteine, die N-glykosidisch verknüpft sind. Durch die gebundenen Oligosaccharide an den Seitenketten besitzt Patatin eine erhöhte Hydrophilie und eine verbesserte Löslichkeit in wässrigen Medien. Sein isoelektrischer Punkt (pI) liegt zwischen pH 4,5 - 5,2 [48]. Patatin besitzt eine Acyl-Transferase- sowie

eine Lipid-Acyl-Hydrolase-Aktivität. Dadurch ist Patatin in den Abwehrmechanismus der Pflanze gegen Insekten und Pathogene involviert [49-53]. Zudem wurde eine β -1,3-Glucanase-Aktivität beschrieben, die zur Abwehr gegen pilzartige Pathogene beiträgt [47]. Die antioxidative Aktivität ist mit der der Ascorbinsäure vergleichbar.

3.3.2 Proteaseinhibitoren

Die Proteaseinhibitoren sind eine heterogene Gruppe hitzestabiler, cysteinreicher Proteine, die bis zu 51 % des löslichen Kartoffelproteins ausmachen. Sie besitzen eine inhibierende Wirkung auf Serin- und Cysteinproteasen und unterscheiden sich stark in ihren Molekülmassen (3 - 23 kDa), ihrer Aminosäuresequenz und ihrer Inhibitoraktivität [45]. Proteaseinhibitoren sind in den Abwehrmechanismus der Kartoffelpflanze gegen Schädlinge und pathogene Mikroorganismen involviert. Durch ihre mögliche antikarzinogene Wirkung und ihre Eigenschaften als Sättigungsmittel sind die Proteaseinhibitoren auch ernährungsphysiologisch von Interesse. Die antikarzinogene Wirkung zeigt sich durch Störung der Proliferation von Tumorzellen. Die sättigende Wirkung soll durch die Freigabe des Darmpeptids Cholecystokinin zustande kommen, das als hormoneller Botenstoff das Sättigungsempfinden im Gehirn steuert [49, 54, 55]. Ein Überblick über die sieben Unterklassen der Proteaseinhibitoren des KFW unter Berücksichtigung ihrer Molekulargewichte, pI-Werte, Anteile am Gesamtprotein im KFW und ihrer inhibierenden Wirkung auf Chymotrypsin und Trypsin ist der Tabelle 4 zu entnehmen.

3.3.3 Höher molekulare Proteine

Die Proteine, die nicht unter die erst genannten Gruppen fallen, bilden die fehlenden prozentualen Anteile an Protein im KFW. Hierzu gehören höher molekulare Proteine wie Lectine und Phenoloxidasen, ebenso wie Proteinkinasen und Phosphorylasen [49, 56, 57]. Ebenfalls im Kartoffelfruchtwasser enthalten sind toxische Inhaltsstoffe, die sogenannten Glykoalkaloide. Sie sind aus einem Steroid-Alkaloid-Gerüst aufgebaut, an das Tri- bzw. Tetrasaccharide glykosyliert sind. Mit etwa 95 % zählen die Glykoalkaloide α -Solanin und α -Chaconin zu den wichtigsten Vertretern. In der geschälten Kartoffel befinden sich nur etwa 12 - 110 ppm. In der Kartoffelschale dagegen sind bis zu 1.068 ppm enthalten [58]. Eine orale Dosis von 1 - 5 mg/kg Körpergewicht kann beim Menschen zu geringfügigen bis schweren Toxizitätserscheinungen führen, 3 - 6 mg/kg Körpergewicht können bereits letal wirken [48]. Für den Einsatz der Kartoffelproteine in Lebensmitteln ist es daher notwendig, die Glykoalkaloidkonzentration zu überwachen.

3.4 Proteingewinnung aus KFW mittels Membranadsorbertechnologie

Die Aufarbeitung des Kartoffelbruchwassers zur Gewinnung hochwertiger Proteine stellt eine große Herausforderung dar. Das faserhaltige KFW besitzt einen hohen Mineraliengehalt sowie nicht zu vernachlässigende Gehalte an Polyphenolen, organischen Säuren, Kohlenhydraten, Aminosäuren und toxischen Glykoalkaloiden. Um die beiden Proteinfraktionen (Patatin und Proteaseinhibitoren) in bioaktiver Form aus dem KFW zu gewinnen und gleichzeitig die unerwünschten Bestandteile abzutrennen wurden Ionenaustauschermembranen benutzt. In Tabelle 5 sind die gebräuchlichsten funktionellen Ionenaustauschergruppen dargestellt.

Tabelle 5: Funktionelle Gruppen an Ionenaustauschermembranen [59].

Sulfonsäure (S-Typ)	Quarternäres Ammonium (Q-Typ)	Carboxyl (C-Typ)	Diethylamin (D-Typ)
$R-CH_2-SO_3$	$R-CH_2-N^+(CH_3)_3$	$R-COO$	$R-CH_2-N(C_2H_5)_2$
stark saurer Kationenaustauscher	stark basischer Anionenaustauscher	schwach saurer Kationenaustauscher	schwach basischer Anionenaustauscher

Der isoelektrische Punkt (pI) von Patatin liegt zwischen 4,5 und 5,2 (siehe Tabelle 4). Der pH-Wert, bei dem die Aufreinigung stattfindet, liegt im physiologischen Bereich von pH 7. Die Bindung von Molekülen an einen Kationen- oder Anionenaustauscher erfolgt am besten, wenn sich der pH-Wert der Umgebung um mind. 1 pH-Einheit vom pI unterscheidet. Bei einem Anionenaustauscher sollte der pH-Wert über dem pI liegen, bei einem Kationenaustauscher unter dem pI. Für die Gewinnung der Patatin-Fraktion wurden daher Membranen vom Q-Typ benutzt. Für die Proteaseinhibitoren, deren pI höher als die des Patatin liegen, wurden Membranen des S-Typs verwendet. Damit wurde ein starker Anionen- und ein starker Kationenaustauscher für die Aufreinigung ausgewählt.

Als Prozessierungsmodule wurden Membranadsorber (MA-Module) der Firma Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen benutzt. Die Module sind in Wickelmodulform aufgebaut. Die einzelnen Membranlagen sind über durchlässige Polymerspacer getrennt, wodurch ein Beladen mit vergleichsweise hohen Flussraten ermöglicht wird.

Der Aufbau eines Sartobind-Direct-Capture-Wickelmoduls ist in Abbildung 8 schematisch dargestellt.

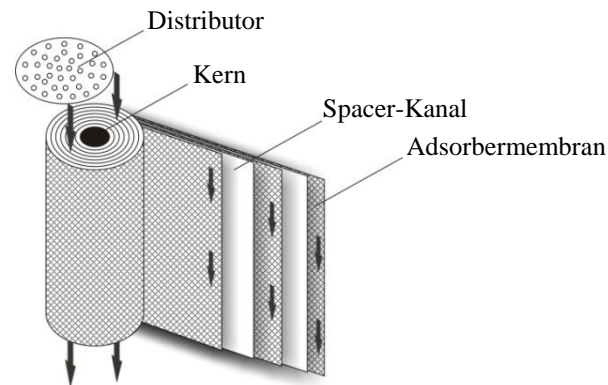


Abbildung 8: Sartobind-Direct-Capture-Wickelmodule der Firma Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen.

Diese Prozessierungseinheiten wurden durch die Integration der Membrantechnik in chromatographische Verfahren entwickelt. In den MA-Modulen werden modifizierte makroporöse Celluloseacetat-Membranen verwendet, die nach dem Prinzip der Ionenaustausch-Chromatographie trennen. Sie besitzen eine Porengröße von 3- 5 μm , eine Membrandicke von 275 μm und eine Ligandendichte von 2- 5 $\mu\text{eq}/\text{cm}^2$. Die Porenninnenoberflächen dieser MA sind mit funktionellen kationischen oder anionischen Austauscherguppen versehen [60]. Diese vorteilhafte Bauweise der Module vereinfacht zudem das Scale-Up. In den MA-Modulen lassen sich verschiedene Arten von Abstandshaltern verbauen. Verwendet wurden hier extrudierte Polymere, die aus Polypropylen aufgebaut sind und einen Spacer-Kanal von 240 μm oder 480 μm je nach Modul aufweisen. Ein Nachteil dieser Module ist allerdings die Verringerung der Flächendichte durch die Spacer, was zu geringeren Bindungskapazitäten führt [61].

Ein wichtiger Vorteil der Proteingewinnung über die Sartobind-Direct-Capture-Wickelmodule gegenüber herkömmlichen Ionenaustausch-Membranadsorbern ist, dass keine Vorklärung oder Mikrofiltration nötig ist.

Durch diese Bauweise besteht zudem die Möglichkeit das Medium rezirkulieren zu lassen. Die zu adsorbierenden Proteine binden an den funktionellen Gruppen der Membranoberfläche, während ungeladene Proteine und größere Partikel wie Stärke oder Fasern das Modul ungehindert durchlaufen.

Nach dem Beladen der MA-Module werden diese mit Puffer vom Medium befreit und die gebundenen Proteine anschließend mittels eines Salz- oder pH-Gradienten getrennt voneinander eluiert. Die Reinigung der Module erfolgt mit Natronlauge. Der

Medienstrom wird bei allen MA-Modulen mehrfach tangential an den Membranlagen entlang geleitet.

Um die beiden Proteinfractionen aus dem KFW aufzureinigen, wurde daher ein einfaches Prozessschema entwickelt. Abbildung 9 zeigt, wie aus dem KFW die Proteine über eine Q- und eine S-Membran separiert werden. Bei einem pH-Wert von ca. pH 7 binden die Proteine, durch rezirkulieren des KFW, an die jeweilige Zielfmembran. Die Rezirkulation des Mediums ist wichtig, um bei hohen Flussraten und Prozessvolumina eine möglichst effiziente Bindung der Proteine an die Membranen zu gewährleisten. Patatin bindet an den Anionenaustauscher (Q-Membran) und die Proteaseinhibitoren binden an den Kationenaustauscher (S-Membran). Anschließend werden sie jeweils mit einer 0,5 molaren NaCl-Lösung von den Membranen abgelöst. Im Anschluss werden die fraktionierten Proteine mittels Ultra-/Diafiltration aufkonzentriert und entsalzt. Anschließend werden die Proteinlösungen sprühtrocknet, so dass die Proteine in Pulverform vorliegen.

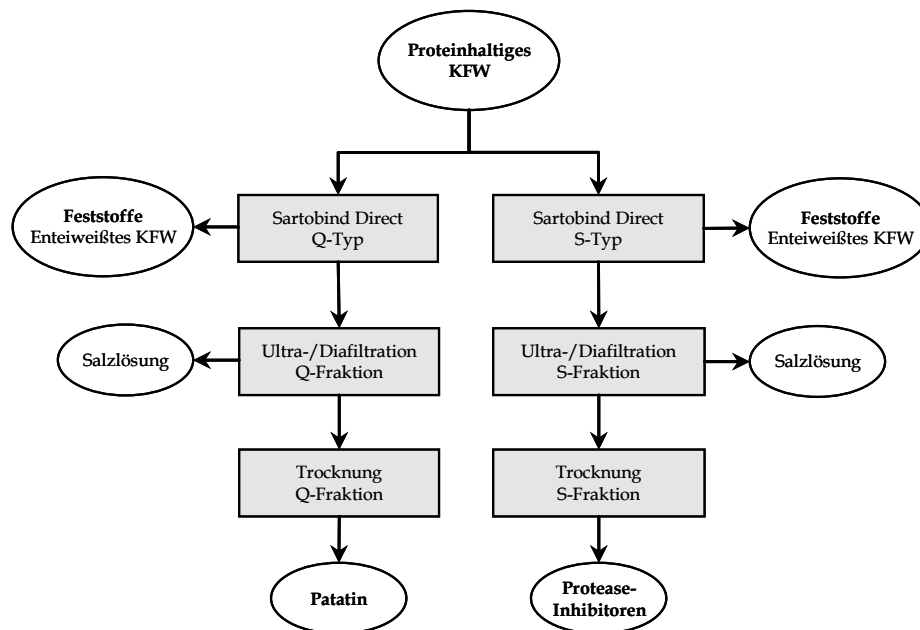


Abbildung 9: Prozessschritte zur Gewinnung von Proteinen mit Sartobind-Direct-Capture-Wickelmodulen [62].

Dieses Prinzip zur Aufreinigung der Proteinfractionen Patatin und Proteaseinhibitoren aus KFW wird im experimentellen Teil dieser Arbeit genauer betrachtet.

4. Experimenteller Teil

Im ersten Teil des Kapitels werden Arbeiten zur Optimierung und Ökonomisierung der Anlage im Technikumsmaßstab zur Aufreinigung der Proteinfractionen Patatin und Proteaseinhibitoren aus Kartoffelbruchwasser (KFW) vorgestellt. Das KFW wurde von Emsland-Stärke GmbH, Emlichheim, zur Verfügung gestellt. Die Optimierungsmaßnahmen umfassen den Umbau der Technikumsanlage zu einer kontinuierlich betriebenen Tandemanlage sowie eine effizientere Nutzung der Membranadsorber hinsichtlich ihrer Betriebslänge.

Weitergehend wurden die aufgereinigten Proteinfractionen in einer Cross-Over-Humanstudie durch das Institut für Lebensmittelwissenschaft und Humanernährung in Hannover auf ihre sättigende Wirkung untersucht.

Im letzten Abschnitt werden zunächst die gewonnenen Proteaseinhibitoren, die durch ihre inhibierende Wirkung auf Proteasen zuvor nicht enzymatisch hydrolysiert wurden, näher untersucht und die Hydrolysate auf verschiedene Bioaktivitäten getestet. Anschließend wird Patatin durch immobilisierte Enzyme hydrolysiert.

4.1 Prozessierung mit der Technikumsanlage

Der Aufbau der Technikumsanlage zur Prozessierung der Proteine aus Kartoffelbruchwasser basiert auf Arbeiten von R. Steinhof [62] mit klassischen Membranadsorbern (MA) und A. Graf [45] mit Direct-Capture-Modulen.

Die grundsätzlichen Schritte, die zur Proteingewinnung durchgeführt werden, sind:

Membranadsorption zur Fraktionierung der Proteine,

Ultra-/Diafiltration zur Entsalzung

und **Sprühtrocknung** zur Konfektionierung der Proteine.

Das Vorgängermodell der Fraktionierungsanlage nach A. Graf umfasste zwei MA-Module (Abbildung 10), ein Q-Modul (Anionenaustauscher) zur Aufreinigung von Patatin und ein S-Modul (Kationenaustauscher) zur Aufreinigung der Proteaseinhibitoren (siehe Kapitel 3.3.3).

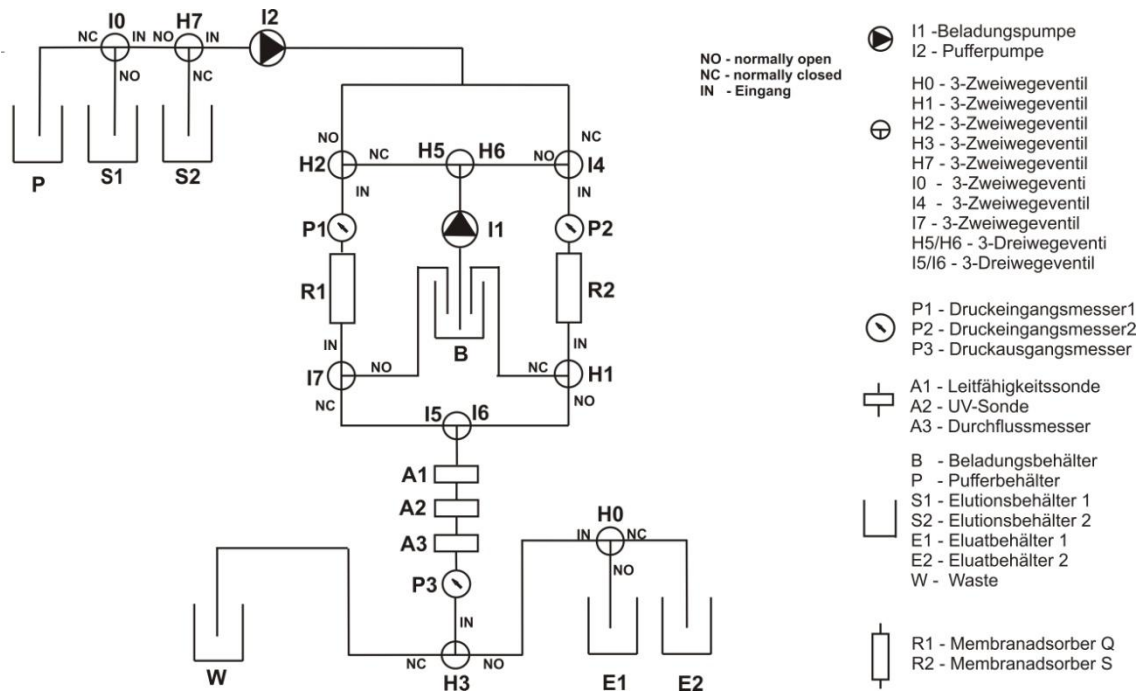


Abbildung 10: Vorgängermodell der Fraktionierungsanlage mit zwei MA-Modulen.

Die Module konnten parallel, sowie getrennt voneinander beladen und eluiert werden. In der Legende sind die einzelnen Bestandteile der Anlage aufgezeigt. Vor den MA-Modulen (R1 und R2) befindet sich je ein Drucksensor. Der Druckausgangssensor befindet sich hinter den Sensoren zur Überprüfung der Leitfähigkeit, des Durchflusses und des UV- Wertes. Die einzelnen Kugelhähne werden über Druckluftventile betrieben, die elektronisch über ein Computerprogramm angesteuert werden können. Das Computerprogramm umfasst 16 Steuerplätze, von denen 2 die Beladungs- und die Pufferpumpe steuern. Über dieses Computerprogramm können so die einzelnen Schritte zur Proteingewinnung programmiert werden.

Der grundsätzliche Ablauf der Programme zur Aufreinigung der Proteine kann in die folgenden Schritte aufgeteilt werden:

- beladung der Module mit KFW (verdünnt 1:5 mit VE-Wasser ($\dot{V} = 6 \text{ L/min}$) und 5 g/L Natriumdisulfit)
- waschen der Module mit 20 mM Natriumphosphatpuffer ($\dot{V} = 2 \text{ L/min}$),
- eluieren des S-MA oder des Q-MA mit $0,5 \text{ M NaCl}$ ($\dot{V} = 2 \text{ L/min}$),
- regenerieren des S-MA oder des Q-MA mit 1 M NaCl ($\dot{V} = 2 \text{ L/min}$) und
- äquilibrieren der Module mit 20 mM Natriumphosphatpuffer ($\dot{V} = 2 \text{ L/min}$),

eingeteilt werden. Dieses Funktionsprinzip und die verwendeten Lösungen bleiben auch für die späteren Anlagendesigns erhalten.

Zur Vereinfachung der Nomenklatur werden die Module zunächst nach ihrem Bindungstyp charakterisiert. Q steht für quaternäres Ammonium, ist ein Anionenaustauscher und bindet Patatin. S steht für Sulfonsäure, ist ein Kationenaustauscher und bindet die Proteaseinhibitoren. Details zu den einzelnen funktionellen Gruppen sind in Tabelle 5 dargestellt. Anschließend wird nach dem Volumen ihrer Außenhülle unterschieden. Die kleinsten Module haben zum Beispiel ein Volumen von 15 mL und die größeren Module ein Volumen von 4000 ml. Der Abstandhalter zwischen den einzelnen Membrananlagen ist ein Extruderpolymer, das aus Polypropylen besteht und mit E beschrieben wird.

Mit dem alten Anlagendesign in Abbildung 10 wurden verschiedene MA-Module getestet. In Tabelle 6 sind einige dieser Module mit ihren Membranflächen, dynamischen Bindungskapazitäten, Spacerkanälen und Produktausbeuten aufgeführt. Um eine Vergleichbarkeit der Daten zu gewährleisten wurden alle in Tabelle 6 ermittelten Werte mit Prozessdaten nach A. Graf 2010 [45] berechnet.

Tabelle 6: Von der alten Anlage verwendete MA-Module mit Angaben zu ihren Bindungskapazitäten, Membranflächen und Produktausbeuten pro Zyklus [45].

Bezeichnung	Bindungstyp	Modulgröße [mL]	Abstandsweite [µm]	Membranfläche [m ²]	Bindungskapazität [mg/cm ²]	Prozessvolumen [L]	Ausbeute [g]
Q2000E25	Q	2.000	250	1,336	0,34	28,6	3,1
S2000E25	S	2.000	250	1,353	0,16	28,6	1,5
Q2000E50	Q	2.000	500	0,904	0,12	19,7	0,7
S2000E50	S	2.000	500	0,933	0,14	19,7	0,9

Die Produktausbeuten der Proteine Patatin (Q-MA) und PI (S-MA) wurden auf die maximale Ø Bindungskapazität über 5 Zyklen bezogen berechnet und schließen den Verlust von 33 % (Patatin) bzw. 30 % (PI) durch die anschließende Ultra-/Diafiltration und die Sprühtrocknung der Produkte mit ein. Auf Grundlage der verbrauchten Chemikalien können die Kosten für 1 kg Patatin und 1 kg Proteaseinhibitoren berechnet werden (die Kosten der einzelnen Chemikalien ist im Anhang 6.2.7 aufgeführt). Die Berechnung schließt jedoch lediglich die Verbrauchsmaterialien mit ein. Bei Membranen mit einem Abstandhalter von 250 µm würde die Produktion von 1 kg Patatin 4.535 € kosten, 1 kg PI läge bei 9.373 €. Die über die Membranen mit einem Abstandhalter von 500 µm gewonnenen Proteine würden 20.085 € für 1 kg Patatin und 15.622 € für 1 kg PI kosten [45]. Der Verlust über die Ultra-/Diafiltration und die

Sprühtrocknung für die einzelnen Fraktionen wurde in die Berechnungen aller folgenden Produktausbeuten mit einbezogen.

4.1.1 Umbau der Technikumsanlage in den Tandembetrieb

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Technikumsanlage in einen vollständigen Tandembetrieb mit insgesamt 4 MA-Modulen in 2 separaten Prozesssträngen überführt. Somit kann die Anlage kontinuierlich betrieben werden. Zudem wurde die Anlage hinsichtlich einer Ressourceneinsparung und Kostenreduzierung umgebaut. Hierzu wurde ein Umbau der Anlage zur Rückführung der Regenerationslösung sowie der Elutionslösungen zur Aufkonzentration der Proteine durchgeführt.

Die in den vollständigen Tandemmodus umgebaute Fraktionierungsanlage läuft über zwei Stränge mit je einem Q- und einem S-Modul (Membranfläche je 2,44 m²) (Abbildung 11). Es wurden sieben neue Drei-Wege-Kugelhähne verbaut. Alle Kugelhähne werden, wie die vorherigen über Druckluft geschaltet. Die Anzahl der Druckluftanschlüsse, die über das Computerprogramm ansteuerbar sind, ist auf 14 begrenzt. Daher mussten die Druckluftverbindungen zu den Kugelhähnen gesplittet werden. Alle Ventile, die im Schaltplan die gleiche Bezeichnung haben, werden über dasselbe Druckluftventil angesteuert.

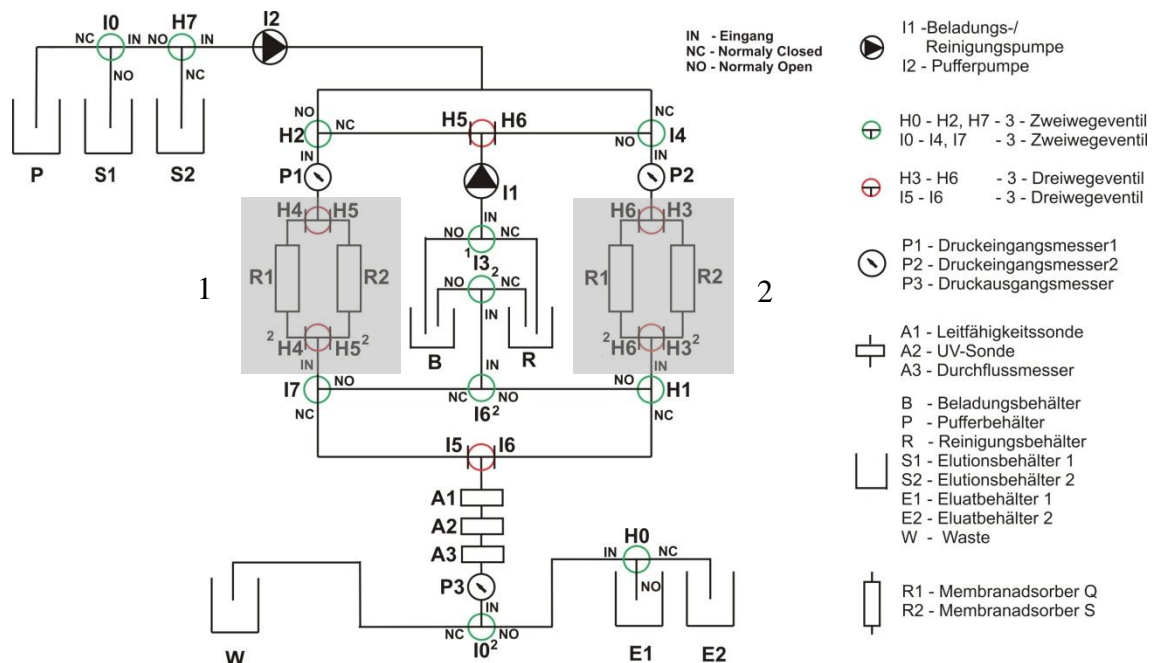


Abbildung 11: Fraktionierungsanlage im Tandemmodus. Grau hinterlegt der 1. und 2. Strang der Anlage mit je einem Q- und einem S-Modul.

Während des Prozesslaufs zeichnet das System die UV- und Leitfähigkeitswerte auf. Die Sensoren für die Aufzeichnung befinden sich jedoch hinter den Schaltventilen I5

und I6, wie in der Abbildung 11 zu sehen. Da nur Werte aufgezeichnet werden, die diese Sensoren passieren, werden nur die Schritte waschen, eluieren und regenerieren aufgezeichnet. Abbildung 12 zeigt einen Zyklus der Proteingewinnung. Die schwarze Linie stellt die UV-Absorption in rel. Einheiten dar. Die blaue Line beschreibt den Verlauf der Leitfähigkeit in Siemens (mS/mm) während des Prozesses.

Das eingesetzte KFW wurde vor Prozessbeginn 1:5 mit VE-Wasser verdünnt, da das KFW eine hohe Salzfracht besitzt (siehe Kapitel 3.3) und die hohe Ionenstärke (bis zu 100 mS/cm) eine Bindung der Zielproteine an die Membranen verhindern würde. Zudem wurden 5 g/L Natriumdisulfit zugesetzt um einer Verbräunung durch Polyphenoloxidasen vorzubeugen [45]. Der Volumenstrom während der Beladung lag bei $\dot{V} = 5 \text{ L/min}$. Eingesetzt wurden im Durchschnitt 1 L KFW pro Zyklus. Um die Anlage kontinuierlich zu betreiben und ausreichend Flüssigkeit zur Verfügung zu stellen, wurden jeweils 5 L KFW mit VE-Wasser auf 25 L verdünnt.

In Abbildung 12 ist ein Zyklus zu sehen, der nach dem Beladen der Q- und S-Membran des 1. Stranges beginnt. Ein vollständiger Zyklus beinhaltet die Beladung der Membranen eines Stranges, das Herunterwaschen aller nicht gebundenen Stoffe, die anschließende Elution beider Module, das Regenerieren der Membranen, um alle restgebundenen Stoffe abzulösen sowie das anschließende Äquilibrieren, um die Bindungsstellen der Membranen für ein erneutes Beladen mit KFW frei zu machen.

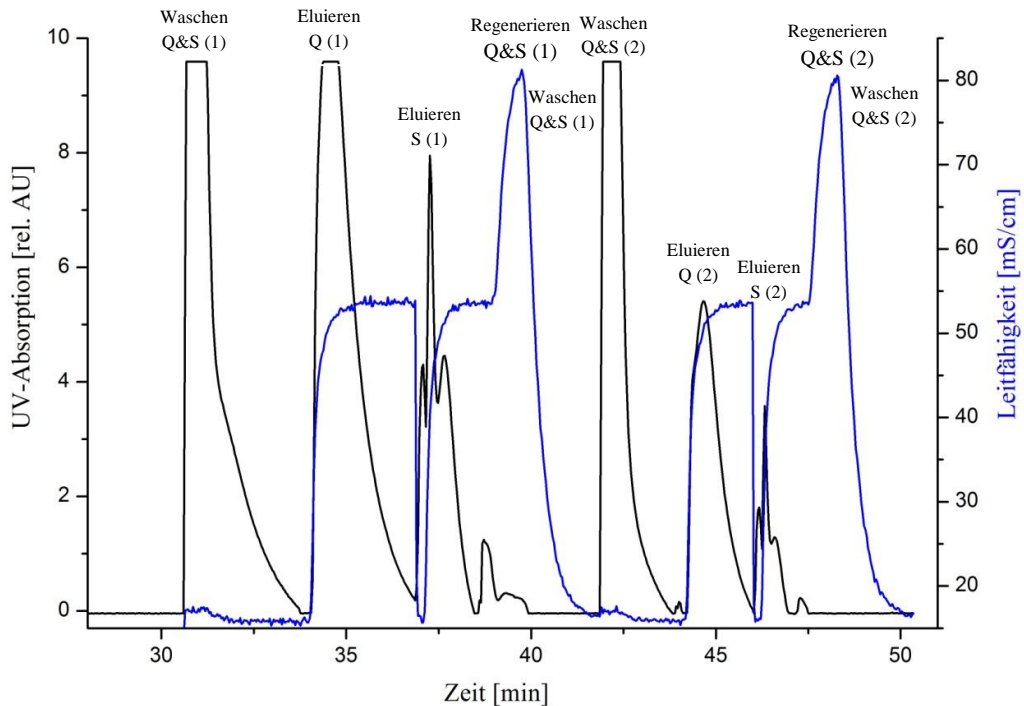


Abbildung 12: UV- und Leitfähigkeitswerte während der Fraktionierung, beginnend nach der Beladung von Strang 1 mit dem ersten Waschschrift.

Im Prozesslauf der Tandemanlage findet die Beladung der Module des 2. Stranges während der in der Abbildung 12 dargestellten Schritte statt. Der letzte Schritt in der Abbildung 12 (Waschen Q- & S- (2)) ist der erste Waschschrift des 2. Stranges und gleicht damit dem ersten in der Abbildung 12 dargestellten Waschschrift. Die Leitfähigkeit bleibt dabei unter 5 mS/cm, da der Waschpuffer, sowie das verdünnte KFW keine hohe Ionenstärke haben. Der UV-Peak resultiert aus dem Totvolumen in den Schläuchen und Resten von KFW auf der Membran.

In Tabelle 7 sind die jeweiligen Prozessschritte mit den genutzten Lösungen und Flussraten dargestellt.

Tabelle 7: Prozessschritte und ihre jeweiligen Gebrauchslösungen und Flussraten.

Prozessschritt	Lösung	Flussrate [L/min]	Ø Zeit [min]
Beladung	KFW verdünnt 1:5	6	20
Waschen	20 mM NaPP, pH 7	5	5
Eluieren	20 mM NaPP, pH 7, 0,5 M NaCl	5	8
Regenerieren	20 mM NaPP, pH 7, 1 M NaCl	5	2
Äquilibrieren	20 mM NaPP, pH 7	5	5

Die Elution des Q-Moduls wird durch den ersten Anstieg der Leitfähigkeit und einem Anstieg der UV-Absorption nach etwa 10 min deutlich, da durch die 0,5 M

Natriumchlorid-Lösung die auf der Membran gebundenen Proteine nach dem Ionenaustauschprinzip abgelöst werden. Das Eluat wird im Elutionsbehälter 1 (E1) gesammelt. Nach der Elution des Q-Moduls werden die auf dem S-Modul gebundenen Proteine eluiert, was durch einen erneuten Anstieg der UV-Absorption nach ca. 22 min deutlich wird. Das Eluat der S-Fraktion wird in Elutionsbehälter 2 (E2) gesammelt. Ein erneuter Anstieg der Leitfähigkeit nach etwa 26 min zeigt die Regenerationsphase der Module. Um die restgebundenen Proteine von der Membran zu lösen, wird eine 1 M Natriumchlorid-Lösung verwendet, wodurch sich die Leitfähigkeit erneut erhöht. Im Anschluss werden die Module des 1. Stranges für eine erneute Beladung äquilibriert und der 2. Strang durchläuft den Zyklus. Der letzte UV-Peak in Abbildung 12 gleicht dem ersten UV-Anstieg in der Graphik. Hier werden nun die Membranen des 2. Stranges gewaschen, die während des Durchlaufs des 1. Zyklus beladen wurden. Ein gesamter Zyklus dauert 40 min. Im Tandemmodus werden jedoch alle 20 min ein Q- bzw. ein S-MA eluiert.

Während der einzelnen Prozessschritte werden hohe Mengen an Puffer, Elutions- und Regenerationslösung verbraucht, was zu hohen Prozesskosten führt. Das Waschen, Regenerieren und Äquilibrieren der Membranen wurde bei einem konstanten Volumenstrom von $\dot{V} = 5 \text{ L/min}$ durchgeführt. In Tabelle 8 sind die verbrauchten Flüssigkeitsmengen pro Schritt und ihre geschätzten Kosten aufgeführt. Die Preise für die einzelnen Substanzen sind in Kapitel 6.2.7 aufgeführt.

Tabelle 8: Flüssigkeitsverbrauch und Kostenkalkulation für einen Zyklus der Proteingewinnung.

Substanz	Flüssigkeitsmenge [L]	Kosten pro Zyklus [€]
NaCl 0,5 M	ca. 19,0	9,71
NaCl 1 M	ca. 4,0	4,09
NaPP 0,02 M	ca. 26,0	1,96
NaOH 0,1 M	ca. 2,5	0,20
VE- Wasser	ca. 51,5	0,17
Abwasser	ca. 33,0	0,08
Gesamt	ca. 51,5	16,21

Pro Zyklus werden im Schnitt ca. 2 g Patatin und 2,4 g Proteaseinhibitoren gewonnen. Die benutzen Membranen besitzen eine Membranfläche von 2,44 m² und einen

Abstandhalter von 480 µm. Die Produktion von 1 kg Patatin würde somit 8.105 € kosten, 1 kg Proteaseinhibitoren würde 6.754 € kosten. Diese Kostenkalkulation bezieht sich jedoch nur auf die Verbrauchslösungen und kalkuliert nicht die Anschaffungskosten der Produktionsanlage, der Membranadsorber, die Energiekosten sowie das notwendige Personal mit ein.

Um die laufenden Kosten zu verringern, wurden Versuche durchgeführt, einige der Lösungen mehrfach zu verwenden. Durch die mehrfache Verwendung der Elutionslösung würde Verbrauchslösung sowie Abwasser einsparen und zudem die Proteine aufkonzentrieren, was den nächsten Produktionsschritt, die Dia- bzw. Ultrafiltration verkürzen würde. Der Schaltplan nach dem Umbau der Technikumsanlage, um einen Rückfluss zu realisieren, ist in Abbildung 13 zu sehen. Zusätzlich zum Rückfluss für die Elutionslösungen wurde die Möglichkeit des Rückflusses der Regenerationslösung eingebaut.

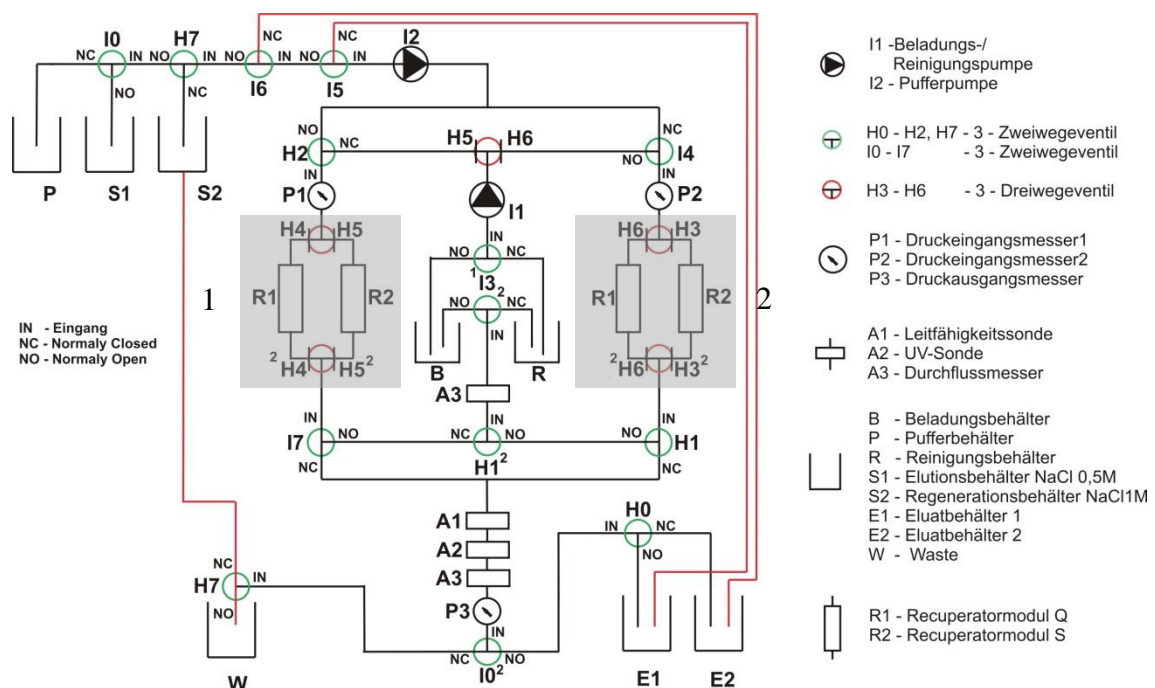


Abbildung 13: Fraktionierungsanlage im Tandemmodus mit Rückflussoption.

Auch hier konnte die Anzahl der anzusteuernenden Druckluftventile nicht verändert werden. In Tabelle 9 sind die Prozessschritte mit den jeweils angesteuerten Ventilen für die rechte (2) und die linke Seite (1) aufgelistet.

Tabelle 9: Angesteuerte Ventile während der jeweiligen Prozessschritte.

	Beladen	Waschen	Eluieren R1	Eluieren R2	Regenerieren	Reinigen
Rechts	I1, H3, H6	I0, I2, I4, I6, H1, H3, H6	I2, I4, I6, H1, H6	I2, I4, I6, H0, H1, H3	I2, I4, I6, H1, H3, H6, H7	I1, I3, H3, H6
Links	I1, H2, H4, H5	I0, I2, I5, I7, H4, H5	I2, I5, I7, H4	I2, I5, I7, H0, H5	I0, I2, I5, I7, H4, H5, H7	I1, I3, H2, H4, H5

Um Flüssigkeiten sowie Zeit zu sparen, wurden zunächst Membranadsorber mit einer geringeren Membranfläche als die in der Technikumsanlage verwendeten getestet. Daher werden zunächst im Folgenden Membranen mit verschiedenen Flächen und unterschiedlich weiten Abstandshaltern aufgeführt. In Tabelle 10 sind die benutzten Module mit ihren Membranflächen und den dazugehörigen Bindungskapazitäten (BK) aufgelistet. Die BK wurde auf die jeweiligen Membranflächen bezogen berechnet. Der Proteingehalt des Eluats wurde über den Proteinassay nach Bradford (siehe Anhang Kapitel 6.4.1) ermittelt. Sie sind jeweils auf die mit der Membran gewonnenen Proteine Patatin bei der Q-Membran und PI bei der S-Membran bezogen.

Tabelle 10: Übersicht über die verschiedenen Module mit ihren Bindungskapazitäten und Produktausbeuten.

Bezeichnung	Bindungstyp	Modulgröße [mL]	Abstandsweite [µm]	Membranfläche [m ²]	Bindungskapazität [mg/cm ²]	Ausbeute [g]
Q15E48	Q	15	480	0,0083	0,15	0,01
S15E48	S	15	480	0,0072	0,17	0,01
Q4000E48	Q	4.000	480	2,44	0,12	2,0
S4000E48	S	4.000	480	2,44	0,14	2,4

Tabelle 10 zeigt, dass identisch aufgebaute Module, die sich stark in ihrer Membranfläche unterscheiden, trotzdem vergleichbare Bindungskapazitäten aufweisen. Zudem sind diese mit Bindungskapazitäten aus anderen Literaturquellen vergleichbar [45]. Daher ist davon auszugehen, dass ein Upscale, bzw. Downscale der Q- und S- Module möglich ist. Dies hat den Vorteil, dass Langzeit- und Stabilitätstests einfacher und schneller durchgeführt werden können.

Die verwendeten Direct-Capture-Module sind Prototypen, die zurzeit noch nicht kommerziell vermarktet werden. Daher gibt es vom Hersteller keine Angaben über die Bindungskapazität. Zudem lassen sich über Standardproteine ermittelte Bindungskapazitäten nur bedingt mit den hier ermittelten Bindungskapazitäten vergleichen, da jedes Protein andere Bindungseigenschaften zeigt. Die ermittelten Bindungskapazitäten lassen sich daher nur untereinander und mit den Bindungskapazitäten aus anderen Arbeiten vergleichen [45].

4.1.2 Mehrfachnutzung der Elutionslösung

Für die ökonomischere Nutzung der Elutionslösungen wurden Experimente an einer FPLC-Anlage (BioLogic AVR7-3, BIO-RAD Laboratories GmbH, München) mit kleineren Modulen durchgeführt. Die Module sind wie die an der Technikumsanlage genutzten Module in Wickelform aufgebaut (siehe Abbildung 8). Der maximale Druck auf die Membranen darf 4 bar nicht überschreiten. Um die Membranen nicht unnötig zu belasten wurde ein Druck von 3 bar als Abbruchbedingung gewählt. Die FPLC-Anlage ist nicht für stark partikelhaltige Medien geeignet, daher wurde das KFW zunächst 10 min bei 40.000 x g zentrifugiert und mit dem Überstand weitergearbeitet (der Aufbau der FPLC-Anlage ist im Anhang Kapitel 0 dargestellt). Zur Vereinfachung und Erläuterung der einzelnen Aufarbeitungsschritte zeigt Abbildung 14 zunächst einen einzelnen Lauf einer Q-Membran. Es wurde das Modul Q15E48 benutzt.

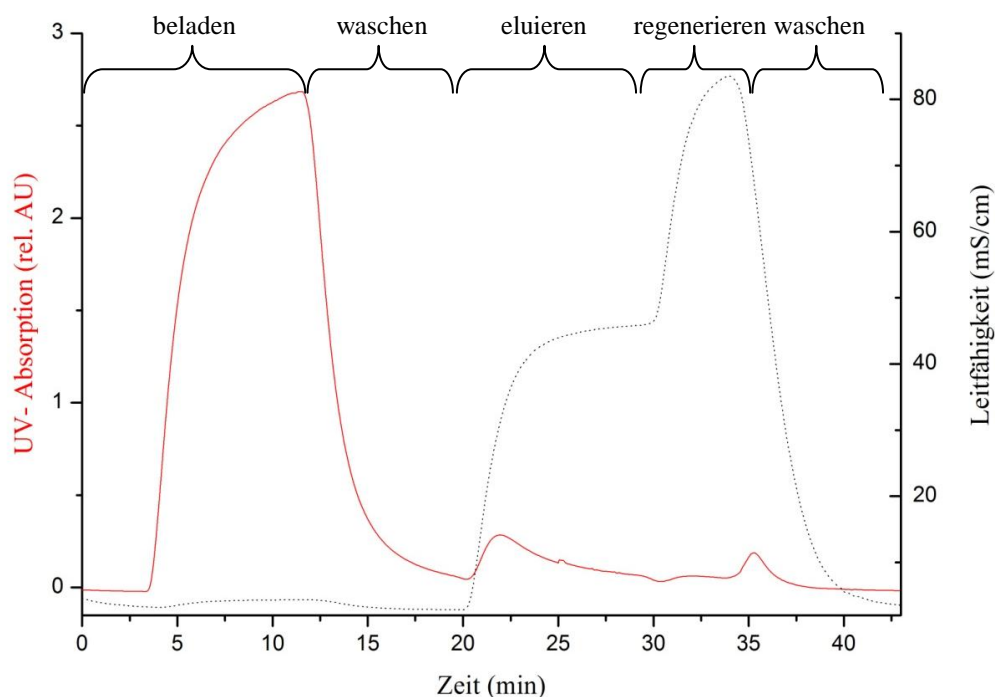


Abbildung 14: Einzellauf der Q15E480-Membran bei 280 nm (Daten wurden mit einer FPLC-Anlage aufgenommen).

Zunächst wird die Membran mit KFW beladen. Nach 10 min beginnt der Waschschrift. Die Membran wird mit 20 mM Natriumphosphatpuffer gewaschen, bis der UV-Wert auf unter 0,2 rel. AU sinkt. Anschließend werden die Proteine mithilfe 0,5 M NaCl-Lösung von der Membran eluiert. Dies ist an dem 2. UV-Peak bei etwa 22 min zu erkennen. Anschließend wird die Membran mit 1 M NaCl-Lösung regeneriert. Die restgebundenen Proteine eluieren von der Membran (3. UV-Peak) und die Membran kann nach erneutem Waschen mit Puffer wieder beladen werden.

Die folgenden Versuche zielten darauf ab, die Elutionslösungen mehrfach zu verwenden, um das jeweilige Protein aufzukonzrieren und so die Aufreinigung ökonomischer und ökologischer zu gestalten. Die vorgelegte Elutionslösung wurde für den S-MA in zehn aufeinanderfolgenden Zyklen verwendet. Abbildung 15 zeigt den Verlauf der Peakmaxima (UV-Absorption) in Abhängigkeit von der Leitfähigkeit.

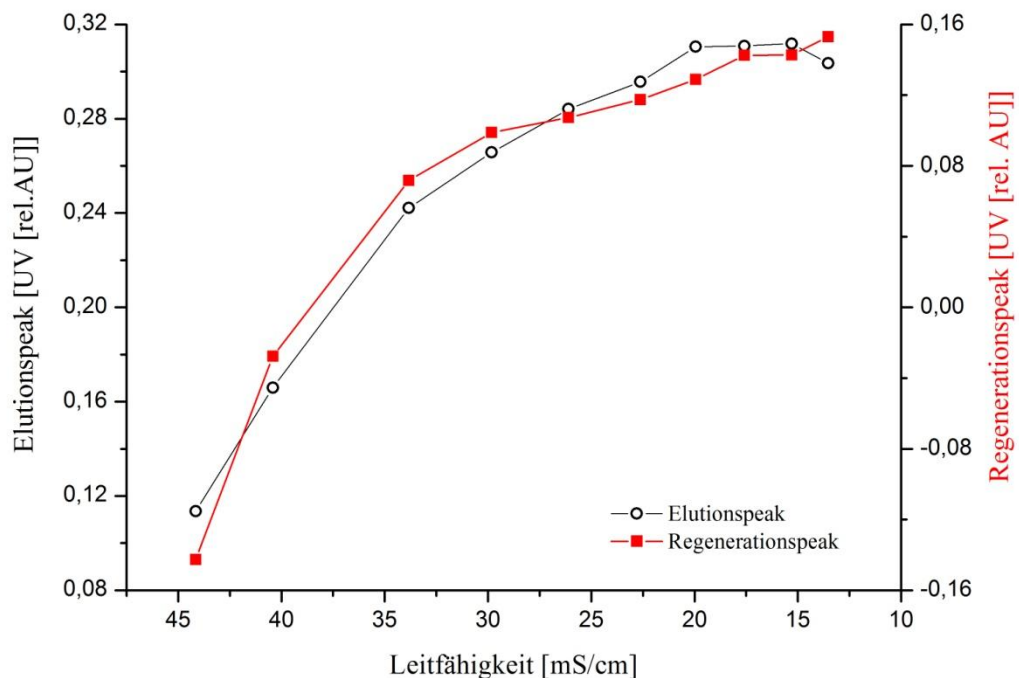


Abbildung 15: Peakmaxima (rel. AU) des Elutions- (○) und des Regenerationspeaks (■) aufgetragen gegen die Leitfähigkeit.

Die Elutionslösung wird im Kreislauf gepumpt und verdünnt sich mit jedem Durchlauf, da der in den Schläuchen verbliebene Restpuffer zum Teil mit in den Elutionsvorlagebehälter gelangt. Dies hat einen kontinuierlichen Abfall der Leitfähigkeit zur Folge, die innerhalb der 10 Durchläufe von ursprünglich ca. 45 mS/cm auf unter 15 mS/cm sinkt. Die UV-Werte des Elutionspeaks nehmen über 7 Durchgänge kontinuierlich zu. Danach ist keine deutliche Zunahme mehr in der UV-Absorption des

Elutionspeaks zu erkennen. Die Leitfähigkeit der Regenerationslösung bleibt konstant (nicht in der Graphik dargestellt), jedoch nimmt die UV-Absorption des Regenerationspeaks ebenfalls mit sinkender Leitfähigkeit der Elutionslösung zu. Dies zeigt, dass mit der Abnahme der Leitfähigkeit der Elutionslösung in diesem Schritt weniger Proteine eluiert werden, die dann während der Regenerationsphase von der Membran gelöst werden. Bei diesem kontinuierlichen Verdünnungsgrad kann die Elutionslösung in 5-7 aufeinanderfolgenden Zyklen verwendet werden, bis die Leitfähigkeit unter 22 mS/cm sinkt. Danach ist die Elutionslösung zu stark verdünnt, um die Proteine von der Membran zu lösen.

Ein wichtiger Anteil weiterführender Untersuchungen sollte darin bestehen, die Ionenstärke der Elutionslösung konstant bei 0,5 mol/L und einer Leitfähigkeit von mind. 38,5 mS/cm bei 25 °C zu halten [63]. Damit könnte die Anzahl der Zyklen bis zur Sättigung der Elutionslösung noch weiter erhöht werden. Eine Möglichkeit bestünde in einer Art Titrationsanlage, die kontinuierlich den Salzgehalt der Elutionslösung überwacht und bei Bedarf erhöht.

Da sich die Membranadsorber lediglich in ihrem Volumen unterscheiden, ist davon auszugehen, dass sich die Daten auf die Technikumsanlage übertragen lassen. Auch ohne weiterführende Untersuchungen kann dieselbe Elutionslösung jetzt schon für die S-MA für vier bis fünf Durchläufe verwendet werden. Die Elutionslösung für die Q-Membran kann unter diesen Bedingungen drei bis vier Mal genutzt werden (siehe Anhang 6.2.6). Damit würde sich der Flüssigkeitsverbrauch ohne weitere Untersuchungen um ca. 60-70 % verringern.

4.1.3 Langzeitstabilität der Membranen

Ein nicht unerheblicher Kostenfaktor zur Gewinnung der Proteine liegt in der Reinigung der Module. Diese Reinigung erfolgt mit 0,1 M NaOH, die im Kreislauf über die Module gepumpt wird. Die Zyklenanzahl, bis das Modul gereinigt werden muss, wurde bisher auf 4 festgelegt [45]. Ließe sich diese Anzahl an Zyklen erhöhen, könnten nicht nur Chemikalien eingespart, sondern auch Zeit gewonnen werden.

Daher wurden die Module auf Langzeitstabilität getestet. Wie schon bei den Versuchen zur Mehrfachnutzung der Elutionslösungen wurden diese Tests an einer FPLC durchgeführt. Es wurden ein neues, unbenutztes Q- und S-Modul in mehreren aufeinanderfolgenden Zyklen mit KFW be- und entladen. Als Abbruchbedingung wurde

ein maximaler zulässiger Gesamtdruck von 3 bar bestimmt, da die Module bei einem höheren Druck beschädigt werden könnten.

Abbildung 16 zeigt den Verlauf für die S-Membran S15E48. Rot stellt die UV-Absorption bei 280 nm dar. Im Hintergrund in grau ist die Leitfähigkeit in Siemens (mS/cm) dargestellt.

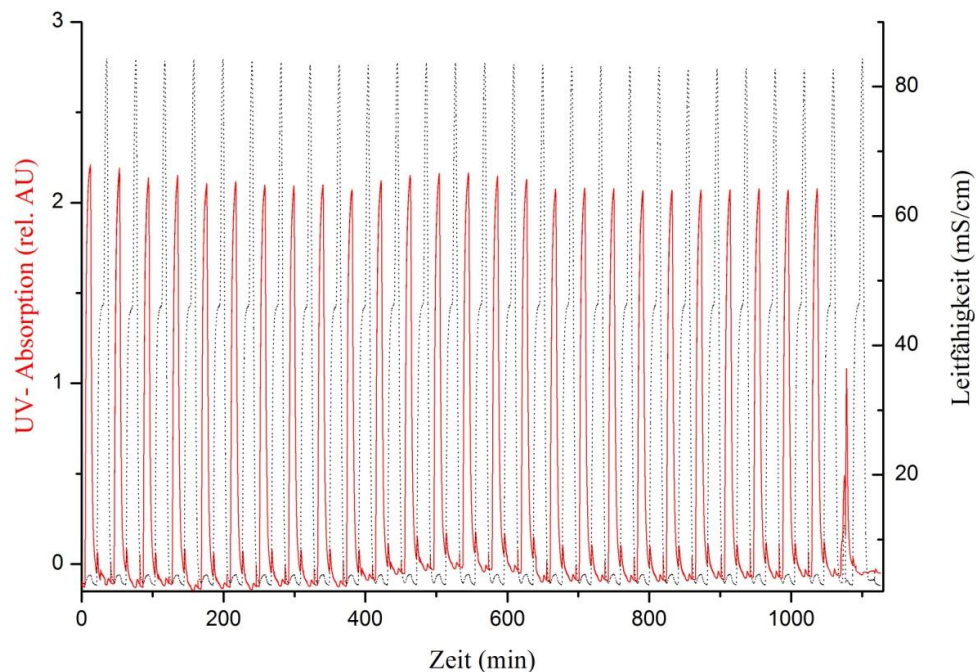


Abbildung 16: FPLC-Daten der Langzeitstabilität der S-Membran S15E48.

Jeder einzelne Zyklus gleicht dem in Abbildung 14 dargestellten Verlauf. Der erste UV-Peak ist der Beladungspeak, gefolgt vom Elutions- und Regenerationspeak. Zu erkennen ist, dass der UV-Wert, sowie die Leitfähigkeit über 26 Läufe konstant bleiben. Erst danach zeigt der UV-Wert während der Beladungsphase einen deutlichen Einbruch. Auch die Elutions-, sowie Regenerationsphase zeigen deutliche Einbrüche in der Peakfläche, sowie –höhe. Die durchschnittliche Bindungskapazität der Membran liegt über 25 Läufe bei $0,17 \text{ mg/cm}^2$ und wurde über den Bradfordassay (siehe Anhang 6.4.1) bestimmt. Der zulässige Gesamtdruck auf die Membranen wurde bei der S-Membran nicht überschritten. Die durchschnittliche Bindungskapazität von $0,17 \text{ mg/cm}^2$ ist vergleichbar mit den schon ermittelten Bindungskapazitäten in Tabelle 6 und Tabelle 10. Dies zeigt, dass die S-Membran ohne Einschränkungen in der Bindungskapazität kontinuierlich über 25 Zyklen betrieben werden kann.

Das Q-Modul Q15E48 wurde ebenfalls auf Langzeitstabilität getestet (siehe Abbildung 17). Auch bei diesem Modul blieben, bis auf kleinere Schwankungen die

UV-Werte der Beladung, der Elution und der Regeneration über 23 Läufe annähernd konstant. Hier wurde allerdings nach 23 Zyklen der zulässige Druck von 3 bar auf die Membran überschritten und die Messung abgebrochen.

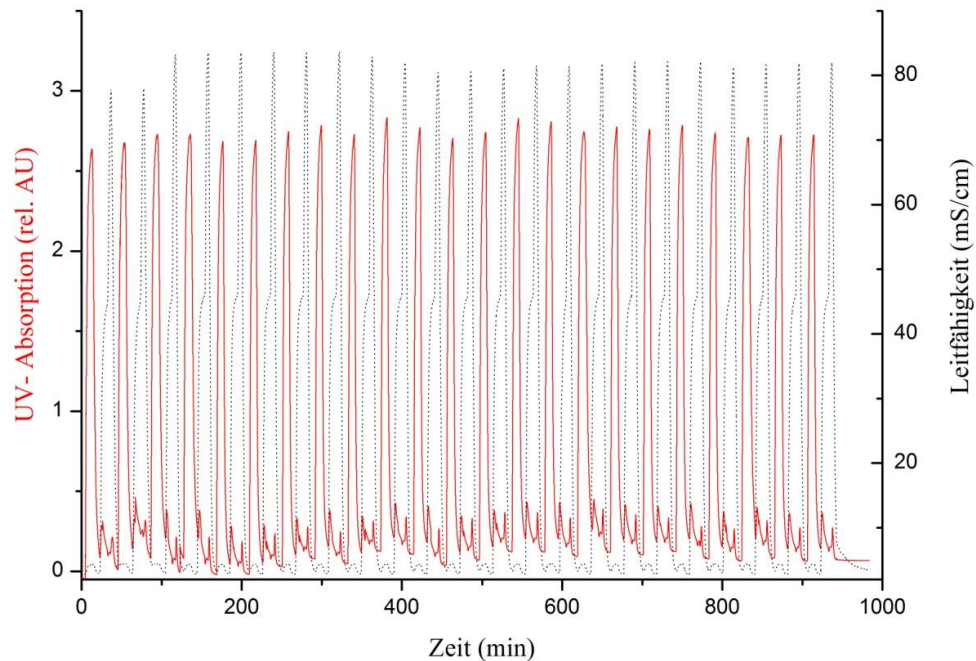


Abbildung 17: FPLC- Daten der Langzeitstabilität der Q- Membran Q15E48.

Die durchschnittliche Bindungskapazität über die 23 Läufe liegt bei $0,15 \text{ mg/cm}^2$. Damit liegen die Bindungskapazitäten der 15 ml Membranen in der gleichen Größenordnung wie die der 4.000 mL Module (siehe Tabelle 10) und der 2.000 mL Module (Tabelle 6). Die Auswertung der beiden FPLC-Läufe macht deutlich, dass die Q-Module schneller verblocken als die S-Module und bereits nach spätestens etwa 23 Läufen gereinigt werden müssen.

Diese Daten zeigen jedoch auch, dass eine Reinigung der Module nach nur 4 Durchläufen noch nicht notwendig ist. Um das Q- und das S-Modul gleichzeitig reinigen zu können, damit die Anlage weiterhin im Tandemmodus betrieben werden kann, sollten beide Membranadsorber nach 23 Durchläufen mit 0,1 M NaOH gereinigt werden.

4.1.4 Aufreinigung und Konfektionierung der gewonnenen Proteine

Die Proteine werden mit 0,5 M NaCl von der Membran gelöst. Anschließend muss das Salz abgetrennt werden. Hierfür wird eine Crossflow-Filtrationsanlage von Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen, verwendet. Mithilfe eines Sartocoon-Slice

Kassettenmoduls Hydrosart mit einem Größenausschluss von 10 kDa wurden die Proteine entsalzt und eingengt. Anschließend wurden die Proteine getrocknet. Dies geschah mithilfe eines Sprühtrockners der Firma Büchi GmbH, Essen. Die Einstellungen am Sprühtrockner, sowie an der Crossflow-Filtrationsanlage sind im Anhang (6.2.2 und 6.2.3) dargestellt. Die Proteinproben wurden anschließend ausgewogen, auf ihre Aktivität überprüft und im Gefrierschrank gelagert.

4.1.5 Reinheit und Aktivität der aufgereinigten Proteaseinhibitoren und Patatin

Die Aufreinigung wurde mit Hilfe von Ionenaustauschchromatographie bei pH 7 durchgeführt. Hierbei bindet Patatin an einen Anionenaustauscher und die meisten PI an einen Kationenaustauscher (pI-Werte siehe Tabelle 4, Kapitel 3.3). Die Bestimmung der Reinheit der PI und des Patatin wurde mittels einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) mit anschließender Commassie Brilliant Blue Silver Stain Färbung durchgeführt (siehe Anhang Kapitel 6.4.2). Es wurde die sprühgetrocknete PI-Fraktion mit einer Konzentration von 0,2 mg/mL aufgetragen (F 2). Als unreine Kontrolle wurde das 1:10 verdünnte KFW mit einem Proteingehalt von ca. 2 mg/mL verwendet (F 3). Bei der Q-Fraktion wurde das Eluat (Proteinfracht ca. 1 mg/mL) aufgetragen (F 4). Die Ergebnisse der SDS-Gelelektrophorese sind in Abbildung 18 dargestellt.

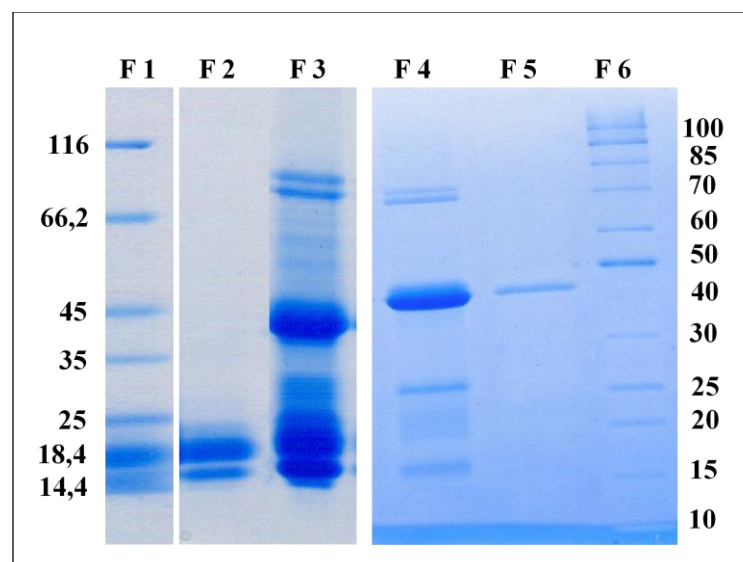


Abbildung 18: Commassie gefärbte SDS-PAGE der Elutionsfraktionen. F 1: Marker (26610), F 2: S-Fraktion, F 3: KFW, F 4: Q-Fraktion, F 5: Q-Fraktion nach Crossflow-Filtration, F 6: Marker (26614).

Bei der S-Fraktion (F 2) ist eine Bande im Größenbereich von 17-22 kDa zu erkennen. Die zu isolierenden PI haben ein Molekulargewicht zwischen 5 - 20 kDa. Die sprühgetrocknete Fraktion der PI weist im höhermolekularen Bereich keine Verunreinigungen mit anderen Proteinen auf. Das getrocknete PI-Pulver hat eine rein weiße Farbe. Die KFW-Fraktion (F3) zeigt eine deutliche Bande im Bereich 44 kDa und starke ineinander laufende Banden zwischen 15-25 kDa. Im Bereich um 70 kDa sind deutliche Banden zu erkennen, die auf die im KFW vorhandenen Polyphenoloxidasen hinweisen. Die Q-Fraktion (F 4) zeigt eine starke Bande bei ca. 44 kDa. Dies entspricht dem Molekulargewicht des Patatinmonomers [47, 50]. Zudem sind noch schwache Banden im Bereich 15-25 kDa zu erkennen. Dies könnte auf Verunreinigungen mit den PI zurückzuführen sein, die ebenfalls an die Q-Membran binden. Die Verunreinigung der Patatinfraktion mit PI führte in der Vergangenheit zu Inhibierungen verschiedener Enzyme während der Hydrolyse [64]. Zudem sind Verunreinigungen mit höhermolekularen Proteinen im Bereich um 70 kDa vorhanden. Die Patatinfraktion weist im sprühgetrockneten Zustand eine leichte Gelb-/Braunfärbung auf. Diese Verfärbung könnte durch Polyphenoloxidasen verursacht worden sein. Polyphenoloxidasen die eine Masse im Bereich von 70-100 kDa haben [65-67], oxidieren verschiedene im KFW enthaltene Polyphenole und verursachen so eine bräunlich gelbe Färbung [49, 52, 57]. Um diese Verfärbung möglichst gering zu halten bzw. zu vermeiden, wird vor dem Prozess Natriumdisulfit (5 g/L) als Antioxidationsmittel zugesetzt [45]. Die antioxidative Kapazität hat jedoch Grenzen, da nicht die Polyphenoloxidasen inhibiert werden, sondern lediglich die Oxidation der Polyphenole verhindert wird.

Um diese Fremdproteine zu entfernen wurde das Q-Eluat erneut mit einem Größenausschluss von 10 kDa und anschließend mit einem Größenausschluss von 100 kDa über die Crossflow-Filtrationsanlage filtriert. Nach dieser erneuten Filtration wurden sowohl die Verunreinigungen mit den PI sowie den Polyphenoloxidasen eliminiert (F 5). Bemerkenswert ist jedoch, wie der Abbildung 18 zu entnehmen ist, die erheblich geringere Proteinkonzentration, die sich in der deutlich schwächeren Bande bei 40 kDa zeigt. Die Proteinfracht nach der erneuten Filtration betrug ca. 0,5 mg/mL.

Die PI und das Patatin wurden zudem auf ihre Bioaktivität überprüft. Die Aktivität der PI wurde anhand ihrer inhibierenden Wirkung gegenüber Trypsin ermittelt. Sie wird als prozentualer Anteil an Soybean Trypsin Inhibitor-Äquivalenten (STI-%) angegeben. Die Aktivität des Patatin wurde über seine Lipid-Acyl-Hydrolase-Aktivität

(LAH-Aktivität) überprüft. Beide Testverfahren sind im Anhang in Kapitel 6.4.3 und 6.4.4 dargestellt. Beide Fraktionen sind aktiv. Für die PI wurde ein Wert von $34,31 \pm 1,38$ [STI-%] ermittelt. Die Patatinfraction wies eine LAH-Aktivität von 1,66 U/mg auf. Ähnliche Aktivitäten wurden schon in anderen Arbeiten ermittelt [45].

4.1.6 Zusammenfassung: Umbau und Optimierung der Technikumsanlage

Ziel dieses Kapitels war die Erweiterung der Technikumsanlage zur Gewinnung von Proteinen aus KFW auf 4 MA-Module, sowie die Optimierung der Prozessbedingungen hinsichtlich der Langzeitstabilität der Module und einer Rückführung der Elutionslösung. In Tabelle 11 ist eine Übersicht über die im Mittel verbrauchten Volumina pro m² Membranfläche und die dafür benötigte Zeit pro Prozessschritt angegeben. Das Volumen bezieht sich auf das Beladen von zwei 2,44 m² großen Membranadsorbermodulen (Q- und S-MA).

Tabelle 11: Übersicht über die benötigten Prozessvolumina, die Schrittzeiten und den durchschnittlichen Druck auf die Membranen.

Prozessschritt	V (L/m ²)	t (min)	P (bar)
KFW- Beladung	3,1	20	1,6
Waschen	5,3	5	1,4
Elution Q-Modul	5	5,2	0,7
Elution S-Modul	2,7	2,8	0,7
Membranregeneration	1,6	1,5	0,7
Äquilibrieren	5,4	5	0,7
Gesamtzyklus	23,1	ca. 40	-

Bilanzierung:

Pro Zyklus lassen sich ca. 2 g Patatin und 2,4 g Proteaseinhibitoren gewinnen. Durch die Beladung im Tandemmodus kann alle 20 min eine Q- bzw. S-Membran eluiert werden. Dies ergibt eine Proteinausbeute von 6 g Patatin und 7,2 g PI pro Stunde. Durch die Erhöhung der Zykluszahlen bis zur Reinigung mit 0,1 M NaOH von 4 auf 23 kann etwa die 5 fache Menge an Natronlauge eingespart werden. Ebenso könnte eine Mehrfachnutzung der Elutions- sowie Regenerationslösung den NaCl-Verbrauch um bis zu 70 % reduzieren. Damit würden die Produktionskosten von 8.105 € pro kg Patatin

auf 4.625 € sinken. Bei den Proteaseinhibitoren würden sich die Kosten von 6.754 € auf 3.854 € für 1 kg reduzieren.

Im Vergleich zu der alten Produktionsanlage, bei der alle 30 min eine Q- bzw. S-Membran eluiert werden konnte und in der Membranadsorbermodule mit einem geringeren Spacerabstand eingesetzt wurden, konnte die Ausbeute an PI von 3 g/h (alte Anlage) auf 7,2 g/h (neue Tandemanlage) um mehr als das doppelte gesteigert werden. Die Patatinausbeute blieb trotz der um über die Hälfte geringeren Bindungskapazität der Q-Module annähernd konstant (6,2 g/h alte Anlage, 6,0 g/h neue Anlage) [45].

Über eine SDS-Gelelektrophorese konnten die Proteine Patatin und Proteaseinhibitoren eindeutig den Membranen Q bzw. S zugeordnet werden. Eine Erhöhung des Reinheitsgrades ist nur über starke Einbußen in der Proteinmenge zu realisieren. In speziell für das Patatin und die PI entwickelten Bioaktivitätsassays konnte bestätigt werden, dass die Proteine in ihrer nativen Form aufgereinigt wurden.

4.2 Humanstudie zum Einfluss von Patatin und PI auf Sättigung und Hormonsekretion

Die in Kapitel 4.1 mit der Technikumsanlage gewonnenen Proteine können in ihrer nativen Form als Nahrungsergänzungsmittel zum Beispiel im Bereich der Sportlerernährung eingesetzt werden. Zudem wird auf dem US-Markt ein Produkt der Firma Kemin Industries unter dem Namen Slendesta[®] vertrieben, das als Hauptwirkstoff den Protease Inhibitor II (PI-II) enthält. Auch in der hier gewonnenen Gruppe von PI ist PI-II mit einem Anteil von 22 % vorhanden (siehe Tabelle 4).

Um zu überprüfen, ob die gewonnenen PI ebenfalls einen Effekt auf das Sättigungsempfinden haben, wurden sie in einer placebokontrollierten Cross-Over-Studie durch Dr. Inga Schneider und Prof. Dr. Andreas Hahn vom Institut für Lebensmittelwissenschaft und Humanernährung der Leibniz Universität Hannover getestet [68]. Ziel war die Bestimmung ihres Einflusses auf das subjektive Sättigungsempfinden und die nachfolgende ad libitum (nach Belieben) Energieaufnahme, sowie des Verlaufs der Sättigungshormone Insulin und Glukagon nach Verzehr der Proteine. Die getesteten Proteinfractionen wurden über die in Kapitel 4.1 dargestellte Technikumsanlage gewonnen. Für die Studie wurden 86,4 g Patatin und 108 g Proteaseinhibitoren zur Verfügung gestellt. Die Studie war als Machbarkeitsstudie konzipiert. Als Prüfprodukte wurden Patatin, Proteaseinhibitoren und ein Placebo getestet. Die Probandengruppe bestand ausschließlich aus männlichen Teilnehmern, da hier keine Schwankungen im Bluthormonspiegel zu erwarten sind, wie bei weiblichen Probanden. Das Alter der Teilnehmer lag zwischen 25 und 37 Jahren. Der BMI lag zwischen 22 und 28 kg/m². Es galten die üblichen Ausschlusskriterien, wie zum Beispiel Raucher, chronische Erkrankungen, Alkohol-, Drogen- und/ oder Medikamentenmissbrauch, etc.

Die Studie wurde mit 4 Probanden durchgeführt. Tatsächlich konnten jedoch 12 Fälle betrachtet werden, da die drei Prüfprodukte von jedem Teilnehmer verzehrt wurden. Somit war jeder Proband seine eigene Kontrolle. Zwischen den Untersuchungstagen lag jeweils eine Auswaschzeit von 1 Woche. Die Studienteilnehmer bekamen pro Untersuchungstag Hartgelatine kapseln mit entweder 1,8 g Patatin oder 2,25 g Proteaseinhibitoren oder einem Placebo aus Kieselerde und Siliciumdioxid. Die Menge an Patatin und PI entspricht dabei einer Tagesportion gekochter Kartoffeln (250 g). An

den Studientagen wurde nach der Nüchternblutentnahme das Studienpräparat verabreicht. Dieses wurde mit einer kleinen standardisierten Mahlzeit und 300 mL Wasser verzehrt. Nach 3 Stunden durften die Studienteilnehmer von einer vorgegebenen standardisierten Mahlzeit so viel essen, wie sie mochten (ad libitum Energieaufnahme). Nach Verabreichen der Prüfprodukte wurden nach genau 15, 30, 45, 60, 120 und 180 min Blutproben genommen. Im Anhang 6.5 sind die Blutwerte eines Probanden vor der Verabreichung der Prüfprodukte sowie nach den oben genannten Zeitpunkten zu sehen. Fett gedruckte Werte zeigen eine Abweichung von den Normwerten. Die Pfeile geben jeweils die Tendenz der Abweichung nach oben oder unten an. Vor Verzehr der Prüfprodukte wurden zudem einige Leberenzyme bestimmt, um den Gesundheitszustand des Probanden zu beurteilen. Tabelle 12 zeigt zusammengefasst die Plasma Glucose-, Insulin- und Glucagonwerte dieses Probanden.

Tabelle 12: Plasma Glucose-, Insulin- und Glucagonwerte eines Probanden vor Aufnahme des Prüfpräparats (T₀) und nach der Aufnahme (T₁₅-T₁₈₀) sowie der Referenzwerte.

Substrat/ Hormon	T ₀	T ₁₅	T ₃₀	T ₄₅	T ₆₀	T ₁₂₀	T ₁₈₀	Referenz
Glucose [mg/dL]	90	108 ↑	127 ↑	129 ↑	101	100	100	74-106
Insulin [µE/mL]	6,4	8,5	23,4 ↑	29,5 ↑	20,4 ↑	6,2	5,9	< 17,5
Glucagon [ng/L]	65	61	63	64	58 ↓	54 ↓	54 ↓	60-177

Zusätzlich wurden den Probanden visuelle Analogskalen ausgehändigt, die sie ebenfalls vor, sowie 15, 30, 45, 60, 120 und 180 min nach Verzehr der Kapseln ausfüllen sollten. Die visuellen Analogskalen sind im Anhang 6.5 dargestellt. Auf den 150 mm langen Analogskalen sollten die Probanden Fragen wie: „Wie stark ist Ihr Wunsch, jetzt etwas zu essen?“ oder „Wie hungrig fühlen Sie sich aktuell?“ bewerten. Der von den Probanden auf der Skala gesetzte Strich wurde zur Auswertung in mm ausgemessen. Die Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe des Statistikprogramms SPSS Version 20. Die Ergebnisse der Analogskalen, sowie der Blutwerte wurden zunächst auf Normalverteilung nach Kolmogorow-Smirnow getestet. Anschließend wurden sie einer einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA analysis of variance) unterzogen. Es ergaben sich für die Blutwerte Glucose, Insulin, Glukagon und der ad libitum Energieaufnahme sowie den Fragen nach der Sättigung keine signifikanten Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen.

Aus den Daten der visuellen Analogskalen lässt sich mit Hilfe der unten stehenden Formel der Appetit zu den einzelnen Zeitpunkten berechnen. Eingesetzt werden die auf den Analogskalen ausgemessenen mm.

$$\text{Appetit} = \frac{((\text{Wunsch} + \text{Hunger}) + (100 - \text{Sättigung}) + \text{Vorraus})}{4}$$

Wunsch = „Wie stark ist ihr Wunsch, jetzt etwas zu essen?“
Hunger = „Wie hungrig fühlen Sie sich aktuell?“
Sättigung = „Wie satt fühlen Sie sich derzeit?“
Vorraus = „Wieviel könnten Sie jetzt essen?“

Der Appetit der Probanden in den verschiedenen Studienzeiträumen wurde ebenfalls mit einer ANOVA ausgewertet. Auch hier ergaben sich keine signifikanten Unterschiede, die auf eine appetitbeeinträchtigende Wirkung schließen lassen könnte.

Dieses Ergebnis ist überraschend, da zum Beispiel Proteaseinhibitoren aus der Kartoffel kommerziell als Appetitzügler unter dem Namen Slendesta[®] erhältlich sind [69]. Hill et al. zeigten, dass sich nach dem Verzehr von 1,5 g Proteinase Inhibitor II (PI-II) aus Kartoffeln die Energiezufuhr um 17,5 % gesenkt werden konnte [54]. Die Studie wurde mit 11 Probanden durchgeführt, von denen 8 Frauen waren. Die Wirkung des PI-II geht laut Hill et al. von dessen Effekt auf das Hormon Cholecystokin (CCK) aus. Das Peptidhormon CCK wird nach einer Mahlzeit vermehrt vom Körper ausgeschüttet, was zu einem Sättigungsgefühl führt und die weitere Nahrungsaufnahme unterbindet [70]. Die Wirkung des PI-II auf CCK wurde nach Hill et al. in einer Studie von Peikin et al. belegt [71]. Die Studie wurde jedoch noch nicht veröffentlicht. In dieser Studie soll die Ausschüttung des CCK nach Verabreichen von 1 g PI-II um das 4-fache erhöht worden sein. Der untersuchte PI-II in der Studie von Hill et al. stammte von der Firma Kemin Industries, die auch das Produkt Slendesta[®] vertreibt.

Die Ergebnisse dieser Studien konnten in der vorliegenden Humanstudie nicht bestätigt werden. Allerdings wurde die Studie auch nur mit 4 Probanden durchgeführt und die Menge an PI-II war in der verabreichten Gesamtmenge von 2,25 g PI mit einem Anteil von 0,5 g um ein Drittel geringer als es in der Studie von Hill et al. der Fall war. Eine größer angelegte Studie mit Untersuchung des CCK-Spiegels, der gewonnenen PI sowie des kommerziell erwerblichen PI-II im Vergleich wäre eine geeignete Überprüfung der Wirksamkeit von Kartoffelproteaseinhibitoren auf das Sättigungsempfinden.

4.3 Hydrolyse der Proteinfractionen

Die Proteinfractionen Patatin und Proteaseinhibitoren zeigten in der Cross-Over-Studie des Instituts für Lebensmittelwissenschaft und Humanernährung in Hannover keine signifikanten Hinweise auf bioaktive Wirksamkeit einer der Fractionen im Menschen. Das dritte Kapitel widmet sich daher der Hydrolyse der über die Technikumsanlage gewonnenen Proteine. Wie in vielen pflanzlichen und tierischen Proteinen sind auch in Kartoffelproteinen Peptidabschnitte enthalten, die eine bioaktive Wirkung zeigen könnten, die die nativen Proteine nicht besitzen. So wurden aus Milch- und Molkenprotein schon Peptide erzeugt, die als Lebensmittelzusatzstoffe kommerziell erhältlich sind [72]. Als sehr potenter Blutdrucksenker wird zum Beispiel das Sauermilchprodukt Calpis® vertrieben [73]. Durch enzymatischen Verdau der Kartoffelproteine könnten bioaktive Peptide freigesetzt werden, die hohe ernährungsphysiologische Qualitäten besitzen und zudem vegan sind.

Zunächst wird ein Überblick über die Hydrolysebedingungen gegeben, die sowohl bei dem Verdau von Patatin als auch dem Verdau der Proteaseinhibitoren Anwendung finden. Anschließend werden die beiden Proteinfractionen getrennt voneinander betrachtet.

4.3.1 Hydrolysebedingungen

Um die Wahrscheinlichkeit zu erhöhen, dass die bioaktiven Peptidabschnitte vom Körper unverändert resorbiert werden, wurden die Proteine mit Enzymen, die im menschlichen Gastrointestinaltrakt vorkommen, hydrolysiert. Bei den Proteasen handelt es sich um Trypsin, Pepsin und α -Chymotrypsin, sowie im Fall der PI um Pancreatin, ein Gemisch aus verschiedenen Darm-Proteasen. Pepsin wird im Magen aus der Vorstufe Pepsinogen gebildet. Die höchste proteolytische Aktivität von Pepsin liegt bei einem pH-Wert zwischen pH 1-3. Die Vorstufen von Trypsin und α -Chymotrypsin werden in der Bauchspeicheldrüse gebildet. Diese Vorstufen werden nach Abgabe in den Dünndarm durch Proteolyse in die aktiven Enzyme überführt. Daher liegt das pH-Optimum dieser Enzyme bei pH 7,5. Um eine maximale Aktivität zu gewährleisten, wurde dem tryptischen Verdau Ca^{2+} als Cofaktor zugefügt. Bei den hier durchgeführten Hydrolysen wurde dem Reaktionsgemisch CaCl_2 (10 mM) zugesetzt [74].

Um zusätzlich andere Peptide zu generieren, wurden auch pflanzliche Proteasen wie Papain aus der Papaya und Bromelain aus dem Stamm der Ananas verwendet. Diese beiden Enzyme werden industriell hauptsächlich als Fleischzartmacher verwendet.

Beide Proteasen zeichnen sich zudem durch eine hohe Stabilität in einem breiten pH-Spektrum aus. Die unterschiedlichen Proteasen haben verschiedene pH-Optima, daher wurde jeder Proteinverdau in dem für die Protease günstigsten pH- und Temperaturbereich durchgeführt. Tabelle 13 gibt einen Überblick über die jeweiligen Hydrolysebedingungen.

Tabelle 13: Optimale Hydrolysebedingungen.

Protease/ Kombination	Hydrolysemethode		Temperatur
	Titrimetrisch	Puffersystem	
Pepsin	pH 2	Kaliumphosphatpuffer (100 mM, pH 2)	37 °C
Pepsin/ α -Chymotrypsin	Pepsin pH 2 α -Chymotrypsin pH 7,5	-	37 °C
Pepsin/ Trypsin	Pepsin pH 2 Trypsin pH 7,5	-	37 °C
Pepsin/ α -Chymotrypsin/ Trypsin	Pepsin pH 2 α -Chymotrypsin/Trypsin pH 7,5	-	37 °C
Pepsin/ Pancreatin	Pepsin pH 2 Pancreatin pH 7,5	-	37 °C
Trypsin	pH 7,5	-	37 °C
Papain	-	Natriumphosphatpuffer (100 mM, pH 6,2)	25 °C
Bromelain	-	Acetatpuffer (100 mM, pH 4,5)	25 °C

4.3.2 Enzymatische Hydrolyse der Proteaseinhibitoren

Die PI wurden bisher aufgrund ihrer Eigenschaften als Inhibitor von Proteasen nicht hydrolysiert. In Kapitel 3.3, Tabelle 4 ist die Inhibitoraktivität (in % gegenüber Trypsin/ α -Chymotrypsin) der in der Kartoffel vorkommenden PI aufgezeigt. Um eine Steigerung ihres bioaktiven Potential zu erreichen, mussten Möglichkeiten gefunden werden, die PI vor dem enzymatischen Verdau zu inaktivieren. Das folgende Kapitel befasst sich mit der Hydrolyse der PI nach vorangegangener saurer Hydrolyse oder durch vorherige Hitzeinaktivierung. Die Ergebnisse wurden im Rahmen der Masterarbeit von Johannes Gerding angefertigt [75].

4.3.2.1 Hydrolysefortschritt

Nachdem der Hydrolysefortschritt mit dem Proteinassay nach Bradford (siehe Anhang Kapitel 6.4.1) qualitativ bestätigt wurde, konnte er zunächst mit Hilfe des OPA-Assays quantifiziert werden. Das Prinzip des OPA-Assays beruht darauf, dass die aus der Spaltung der Peptidbindungen hervorgehenden Amino-Gruppen mit ortho-Phtaldialdehyd (OPA) derivatisiert werden und anschließend bei einer Wellenlänge von 340 nm spektroskopisch detektiert werden. Die Kalibrierung mit Hilfe eines Aminosäure-Standards ermöglicht eine indirekte Quantifizierung hydrolysierter Peptidbindungen und die Angabe des Hydrolysegrades (DH) [76].

$$DH = \frac{h}{h_{tot}} \cdot 100 \%$$

DH = degree of hydrolysis

h_{tot} = Gesamtzahl an Peptidbindungen (Näherung: 8 meqv/g/Protein [76])

h = Anzahl der hydrolysierten Bindungen

Einzelheiten zu dem Assay sind dem Anhang Kapitel 6.3.3 zu entnehmen. In Tabelle 14 sind die in der Hydrolyse eingesetzten Proteasen und der erreichte Hydrolysegrad dargestellt. Die höchsten Hydrolysegrade wurden mit Pepsinhydrolysaten erreicht. Da Pepsin einem spezifischen Spaltmechanismus folgt (hydrophobe-, vorzugsweise aromatische Reste), kann der maximale Hydrolysegrad über Pepsin nur durch die Zugabe eines weiteren Enzyms gesteigert werden. Wie jedoch in Tabelle 14 zu sehen ist, führte die Zugabe eines weiteren Enzyms nach 75 min Hydrolysezeit mit Pepsin kaum zu einer Veränderung des Hydrolysegrades. Die Hydrolyse mit der pflanzlichen

Protease Bromelain führte nach dem OPA-Assay nur zu einem Hydrolysegrad von ca. 10 %.

Tabelle 14: Hydrolysegrade der einzelnen Verdauungssimulationen

PI-Hydrolysat	Vorbehandlung	Hydrolysegrad (DH) [%]	Standardabweichung
Pepsin	S	39,0	3,4
Pepsin/Pancreatin	S	43,3	3,7
α -Chymotrypsin	Δ	32,1	3,9
Pepsin/ α -Chymotrypsin/Trypsin	S	39,4	3,2
Bromelain	Δ	10,4	0,6
Trypsin	Δ	11,2	4,5

Δ = Hitzebehandlung der PI (10 min, 95 °C)

S = Saure Hydrolyse mit Pepsin bei pH 2

Die Ergebnisse des Hydrolysefortschritts zeigen, dass vor allem die saure Hydrolyse mit Pepsin zu einer erfolgreichen Spaltung der PI führt. Der niedrige pH-Wert während der Hydrolyse verhinderte eine Inhibierung des Pepsins, wodurch eine Hydrolyse möglich wurde.

Die Hydrolyse mit den Proteasen Bromelain und Trypsin nach vorangegangener Hitzeinaktivierung der PI war mit ca. 10 % weit weniger erfolgreich. Dies könnte entweder an einer unvollständigen Inaktivierung der PI liegen oder die spezifische Spaltsequenz der Enzyme Bromelain und Trypsin war in den PI nur geringfügig vorhanden. Der OPA-Assay des PI-Hydrolyсата von Papain konnte aufgrund zu hoher Schwankungen in den Messergebnissen nicht ausgewertet werden.

Ein noch detaillierteres Bild des Hydrolysefortschritts lässt sich mit Hilfe der RP-HPLC gewinnen.

4.3.2.2 Etablierung einer RP-HPLC-Methode für die präparative Peptidanalyse

Die ersten Analysen der Peptidfraktionen verliefen über eine analytische HPLC-Säule. Um einzelne Peaks näher zu analysieren, wurde zusätzlich eine semi-präparative HPLC etabliert. Die Trennsäule wurde nach dem Vorbild der analytischen Trennsäule ausgewählt. Es handelt sich hierbei ebenfalls um eine Säule von Phenomenex. Die JupiterTM 4u Proteo 90Å, Axia packed (4 μ m; 250 x 21,2 mm).

Die Säule wurde auf 40 °C temperiert. Als Eluenten wurden zunächst deion. H₂O mit 0,1 % (v/v) TFA (A) sowie Acetonitril mit 0,1 % (v/v) TFA (B) benutzt. Die ersten Läufe zeigten jedoch extrem starke Schwankungen in der Basislinienabsorption. Dies ist auf die starke Gasentwicklung beim Mischen der beiden Eluenten zurückzuführen. Daher wurde dem Eluenten A 5 % (v/v) Acetonitril zugesetzt, um eine Ausgasung während der Analysen zu vermindern. Getestet wurde die Variation der Gradientenrate sowie der Flussrate. Es wurden jeweils 50 µL eines Standards injiziert. Der Standard bestand aus Gly-Tyr, Val-Tyr-Val, Met-Enkeph., Leu-Enkeph. und Angiotensin II. Die Methodenentwicklung mit den dazugehörigen Graphen befindet sich Anhang 0. Als optimale Bedingungen wurden für die Methode folgende Parameter ermittelt:

Säule: JupiterTM 4u Proteo 90Å, Axia packed, 4 µm; 250 x 21,2 mm
 Temperatur: 40 °C
 Eluenten: A: deion. Wasser mit 5 % (v/v) ACN und 0,1 % (v/v) TFA
 B: Acetonitril mit 0,1 % (v/v) TFA
 Gradient: 1,5 % B/min
 Flussrate: 6 ml/min

Tabelle 15: Gradientenprogramm der präparativen RP-HPLC.

Zeit (min)	A (%)	B (%)	Flussrate (mL/min)
0	100	0	6
47,4	52,6	47,4	6
50	5,3	94,7	6
64	5,3	94,7	6
66	100	0	6
90	100	0	6

4.3.2.3 RP-HPLC-Analyse und Auftrennung der Hydrolysate

Das Gesamthydrolysat wurde nach beendeter Hydrolyse zur einfacheren Handhabung gefriergetrocknet (siehe Anhang 6.2.4). Mit dem gefriergetrockneten Hydrolysat konnte eine definierte Menge auf die präp. RP-HPLC-Säule aufgetragen werden.

Die Reversed-Phase-HPLC trennt Moleküle nach ihrer Größe und Hydrophobizität. Das Ergebnis ist ein komplexer Peptidfingerprint. Dadurch können Veränderungen während des Hydrolyseverlaufs verfolgt werden. Zudem können mit Hilfe der präparativen RP-HPLC einzelne Peaks gezielter und in größerer Menge aufgereinigt werden, um

ausreichend Material für biologische Testungen bereitzustellen. Abbildung 19 zeigt verschiedene PI-Hydrolysate nach einer Hydrolysezeit von 180 min. Eine Ausnahme stellt das Hydrolysat hergestellt mit Bromelain dar, welches nach 16 h Hydrolysezeit analysiert wurde. Die längere Hydrolysezeit für den Bromelainansatz wurde aufgrund der optischen Beobachtung der Hydrolysate gewählt. Während die zunächst trübe Proteinlösung durch die anderen Enzyme mit zunehmender Hydrolysezeit immer klarer wurde, konnte beim der Hydrolyse mit Bromelain kaum eine Veränderung der Lösung festgestellt werden. Daher wurde dieser Hydrolysezeitraum bis auf ein Maximum von 16 h ausgedehnt.

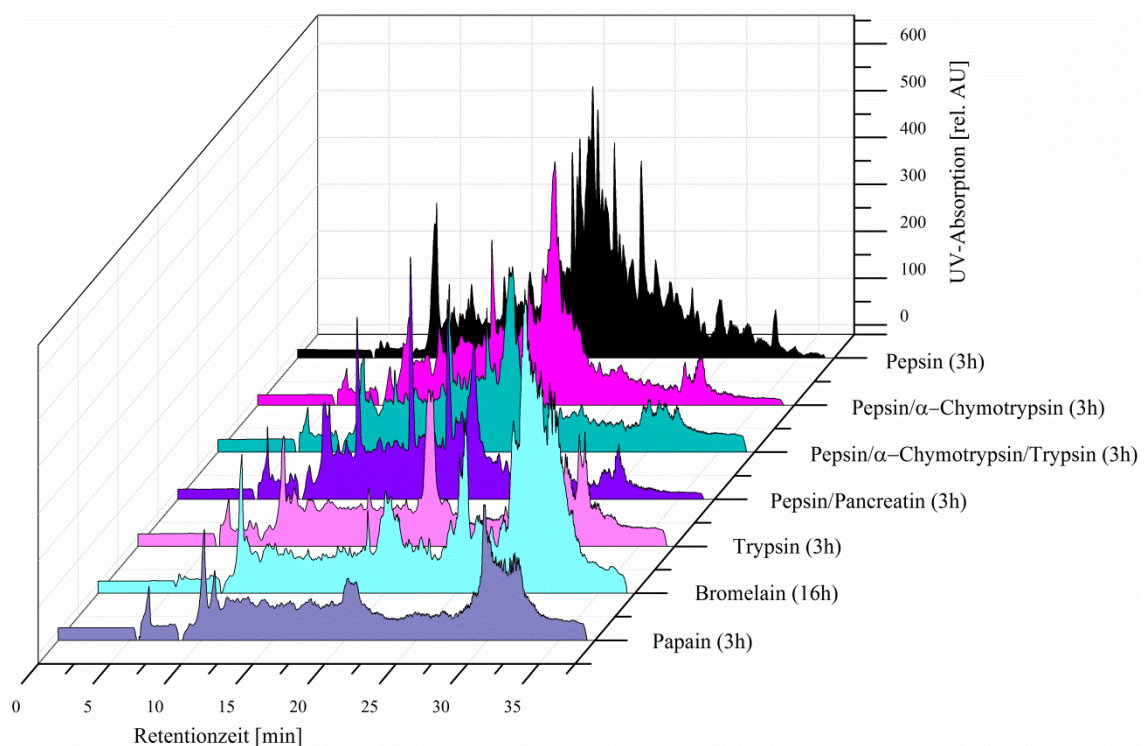


Abbildung 19: Präparativer RP-HPLC Peptid Fingerprint verschiedener Hydrolysate.

Die Auftragsmenge der gefriergetrockneten Hydrolysate auf die Säule betrug 500 µL bei einer Konzentration von 10 mg/mL. Zuerst eluieren kleine, bzw. polare Peptide. Zum Ende der chromatographischen Trennung eluieren große, bzw. unpolare Peptide. Deutlich zu erkennen ist der Unterschied in der Peptidzusammensetzung. Während die Hydrolysen mit Trypsin, Bromelain und Papain nur wenige Peptidpeaks aufweisen, zeigen der Verdau mit Pepsin sowie der Verdau mit Pepsin und weiteren Enzymen ein weniger ausgeprägtes Peptidspektrum. Die Peptide eluieren bei dem PI-Verdau mit reinem Pepsin größtenteils im mittleren Bereich, was die Vermutung nahelegt, dass durch diesen Verdau hauptsächlich Oligopeptide entstehen. Durch den anschließenden Verdau mit α-Chymotrypsin, α-Chymotrypsin/Trypsin oder Pancreatin verschiebt sich

das Spektrum weiter in den Bereich kleinerer, polarer Peptide. Diese haben ein höheres Potential intakt vom Körper resorbiert zu werden (siehe Theorie Kapitel 3.1.2). Papain, Bromelain und Trypsin zeigen ein Spektrum mit wenigen, hauptsächlich großen, bzw. unpolaren Peptiden. Dies deckt sich mit den Daten aus dem OPA-Test, in dem das reine Trypsin sowie auch das Bromelain nur geringe Hydrolysegrade aufwiesen. Papain konnte durch zu hohe Messwertschwankungen nicht über den OPA-Assay analysiert werden, jedoch zeigt sich im RP-HPLC-Fingerprint, dass für Papain ebenso wie für die andere pflanzliche Protease Bromelain entweder die Spaltsequenz nur in geringem Maß in den PI vorkommen oder die PI nicht vollständig hitzeinaktiviert wurden.

Das PI-Hydrolysat mit Pepsin/Pancreatin zeigte in der Auftrennung drei scharfe Peaks. In Abbildung 20 ist dieser Verdau zu verschiedenen Zeitpunkten der Hydrolyse zu sehen. Klar zu erkennen ist, dass ab der 60. min drei scharfe Peaks auftreten, die für einen Zeitraum von mindestens 2 h stabil bleiben. Mithilfe der präparativen HPLC wurden diese Peaks isoliert. Die Methode wurde bereits in Kapitel 4.3.2.2 beschrieben.

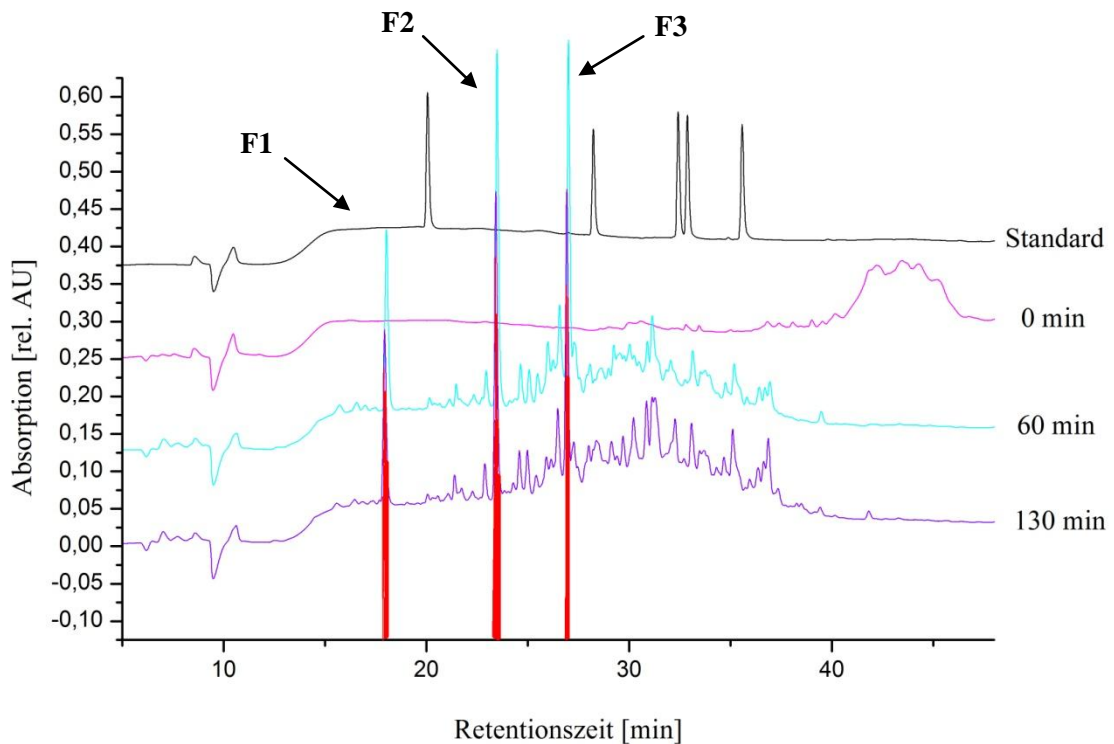


Abbildung 20: RP-HPLC Verlauf des Pepsin/Pancreatin Verdau zu Beginn, nach 60 min und nach 130 min Hydrolysezeit.

Die Peptide der einzelnen Fraktionen F1-F3 konnten nach zehn chromatographischen Trennläufen und anschließender Gefriertrocknung im Milligramm-Maßstab gewonnen werden. Die Fraktionen wurden mittels Maldi-Massenspektrometrie (siehe Anhang 6.3.4) analysiert. Anschließend wurden die ermittelten Massen mit Hilfe des

Bioinformatikprogramms ExPASy-findpept vom Swiss Institute of Bioinformatics auf ihre mögliche Sequenz untersucht [77]. Erschwert wird die genaue Suche, da nicht von allen PI die Aminosäuresequenzen bekannt sind. Die Analyse der drei Fraktionen mittels MALDI-MS ergab jeweils mehrere verschiedene Molekülmassen (siehe Tabelle 16).

Tabelle 16: Mittels MALDI-MS ermittelte Molekülmassen in Da der Fraktionen F1-F3.

Ermittelte Molekülmasse [Da]		
F1	F2	F3
331,611	356,165	303,261
355,561	356,917	303,868
356,21	972,332	356,173
356,962	1.101,452	1.186,088
409,732		

Der Vergleich der Molekülmassen mit den vom Computerprogramm generierten möglichen Peptidfragmenten von vier PI mit bekannter Aminosäuresequenz (PI-I, PCPI, PKPI und PAPI) ergab 69 mögliche Peptidabschnitte. Ein Großteil sind Tripeptide, was eine unveränderte Resorption im Magen-Darm-Trakt ermöglicht.

Dies macht die große Anzahl an möglichen Peptiden deutlich, die durch eine Hydrolyse entstehen. Mit Hilfe der präparativen RP-HPLC lassen sich die Peptide trennen und aufreinigen, jedoch müssten an den ersten Aufreinigungsschritt noch weitere angeschlossen werden, um ein bestimmtes Peptidfragment aufzureinigen. Der Aufwand hierfür müsste durch eine signifikante biologische Wirksamkeit (eines der Peptidfragmente) gerechtfertigt werden.

4.3.2.4 Bioaktivität der entstandenen Peptidverbindungen durch enzymatischen Verdau

Die Ermittlung potentiell bioaktiver Peptide der PI ist komplex. Dies kommt zum Einen durch die große Anzahl verschiedener PI im KFW. Ein Verdau dieses PI-Gemisches führt zu einer Vielzahl an möglichen Peptidabschnitten, wodurch eine genaue Bestimmung der Peptidsequenz stark erschwert wird. Zum Anderen ist zwar die genaue Zusammensetzung der PI in der Kartoffel bekannt (Tabelle 4), jedoch ist unbekannt, ob nach der in Kapitel 4.1.4 beschriebenen Aufreinigung noch alle PI vorhanden sind, da die PI unterschiedliche isoelektrische Punkte sowie Größenunterschiede aufweisen. Die

Aufreinigung wurde bei pH 7 und mit einem Kationenaustauscher durchgeführt. Anschließend wurde das Medium über Ultra-/Diafiltration mit einer 10 kDa Membran entsalzt und eingengt. Da einige der PI kleiner als 10 kDa sind, kann davon ausgegangen werden, dass diese PI nicht zur Hydrolyse bereitstanden. Um festzustellen, ob sich überhaupt bioaktive Peptidabschnitte bilden und eine spätere Auftrennung des Hydrolysats zur Isolierung der betroffenen Peptidabschnitte sinnvoll ist, wurde zunächst das Gesamthydrolysat auf Bioaktivität überprüft. Alle Hydrolysate wurden wie in Abschnitt 4.3.1 dargestellt gewonnen. Sie wurden auf ihr antioxidatives Potential, ihre ACE-hemmende Wirkung und ihren antimikrobiellen Effekt getestet.

4.3.2.4.1 Antioxidative Wirksamkeit

Die antioxidative Wirksamkeit der PI wurde mit Hilfe zwei verschiedener Assays bestimmt, dem TEAC-Assay (Trolox-Equivalent-Antioxidant-Capacity-Assay) und dem SAR-Assay (Superoxid Anion Radikalfänger Assay).

Trolox Equivalent Antioxidant Capacity Assay (TEAC-Assay)

Der TEAC-Assay gibt die antioxidative Kapazität in Trolox-Äquivalenten (mmol Eq Trolox/ g Protein) an. Das Prinzip beruht darauf, dass in Gegenwart eines geeigneten Oxidationsmittels wie z.B. Eisen(III)Chlorid und saurem pH-Wert N,N-Dimethyl-1,4-phenylendiamin (DMPD) zu einem stabilen, farbigen Semichinondiimin-Radikalkation ($\text{DMPD}^{\cdot+}$) (Abbildung 21) reagiert.

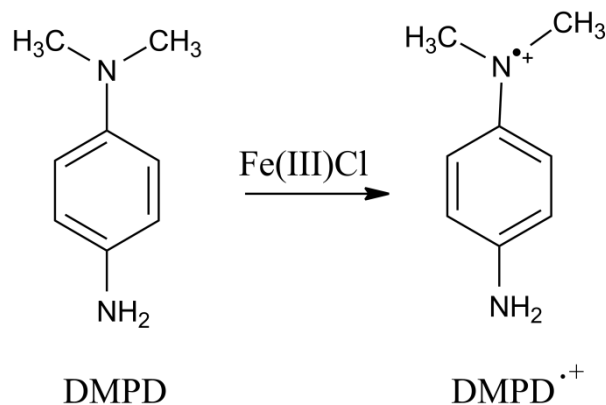


Abbildung 21: Bildung des DMPD-Radikalkations.

Das Absorptionsmaximum von $\text{DMPD}^{\cdot+}$ liegt bei 505 nm. Antioxidative Verbindungen mit der Fähigkeit ein Wasserstoffatom auf $\text{DMPD}^{\cdot+}$ zu übertragen, verursachen proportional zu ihrer Konzentration eine Entfärbung der Lösung. Diese Reaktion verläuft schnell (weniger als 10 min). Der stabile Endpunkt ist ein Maß für die antioxidative Kapazität einer Verbindung. Weitere Details zur Durchführung des Assays

befinden sich im Anhang Kapitel 6.4.8. Die Ergebnisse des TEAC-Assays für die verschiedenen Hydrolysate sind in Tabelle 17 zusammengefasst.

Tabelle 17: TEAC-Werte verschiedener Hydrolysate der Proteaseinhibitorfraktion.

PI-Hydrolysat/ Probe	TEAC [mmol Eq./g Protein]	Standardabweichung
Native Proteaseinhibitoren	0,052	0,01
Pepsin	0,070	0,02
Pepsin/Pancreatin	0,055	0,01
Pepsin/ α -Chymotrypsin	1,320	0,47
Pepsin/ α -Chymotrypsin/Trypsin	0,059	0,02
Bromelain	0,072	0,02
Trypsin	0,070	0,01
Papain	0,715	0,01

Aus der Tabelle 17 geht hervor, dass lediglich die PI-Hydrolysate des Verdau mit Pepsin/ α -Chymotrypsin sowie Papain signifikante antioxidative Eigenschaften aufweisen. Die Werte dieser beiden Hydrolysate liegen um das 10 - 25 fache höher als bei den übrigen Hydrolysaten und den nativen PI. Der TEAC-Wert für die nativen Proteaseinhibitoren liegt in der gleichen Größenordnung wie schon bei A. Graf ermittelt [45].

TEAC-Werte anderer Studien zeigen, dass die hier ermittelte antioxidative Kapazität der PI-Hydrolysate vergleichbar zu anderen Lebensmitteln ist. Pellegrini et al. gaben ihre antioxidativen Kapazitäten in mmol Eq./100 g Frischgewicht (FG) an. 1 g PI-Hydrolysat hergestellt mit Pepsin/ α -Chymotrypsin liegt etwa im Bereich von 100 g frischen Erdbeeren oder roten Johannisbeeren (1,094 und 1,405 mmol Eq./100 g FG). 1 g des mit Papain hergestellten Hydrolysats liegt im Bereich von 100 g frischem Spinat oder Orangen (0,849 und 0,874 mmol Eq./100 g FG) [78].

Superoxid Anion Radikalfänger Assay (SAR-Assay)

Eine weitere Möglichkeit die antioxidative Kapazität einer Verbindung zu ermitteln, ist der SAR-Assay. Das Prinzip des Assays beruht auf der Inhibierung der Pyrogallol-Autoxidation. Durch radikale Sauerstoffspezies ($O_2^{\cdot-}$) wird Pyrogallol zu verschiedenen chromophoren Produkten oxidiert (siehe Abbildung 22) [79].

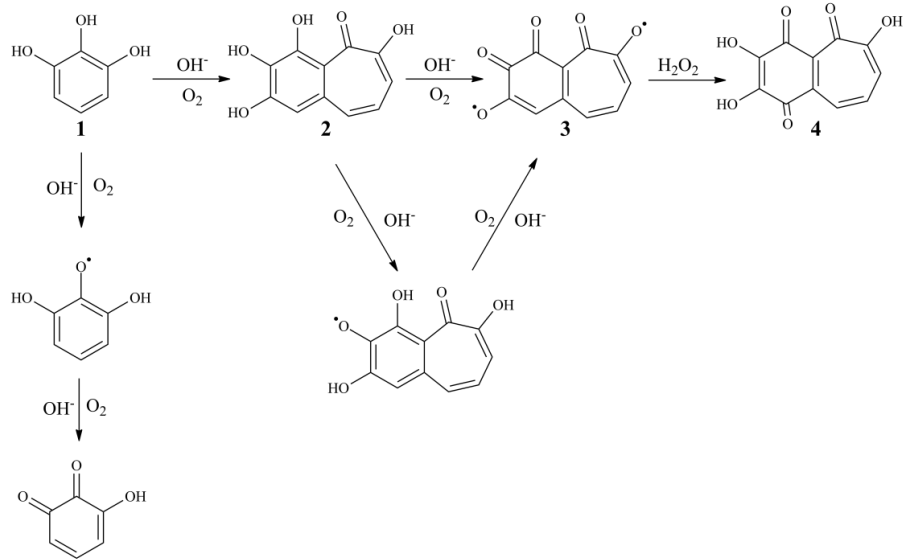


Abbildung 22: Autoxidation von Pyrogallol (1) zu verschiedenen chromophoren Oxidationsprodukten (2-4). Modifiziert nach Gao et. al. (1998) [80].

Durch Abfangen der freien Radikale wird diese Reaktion verlangsamt. Die Reaktion kann photometrisch bei einer Wellenlänge von 325 nm verfolgt werden. Die antioxidative Kapazität (OxI [%]) ist dann die prozentuale Inhibierung der Pyrogallol-Autoxidation. Details zur Durchführung des Assays befinden sich im Anhang 6.4.10. Tabelle 18 gibt einen Überblick über die mit dem SAR-Assay bestimmten Werte. Die Hydrolysate wurden je mit einer Konzentration von 2 mg/mL getestet.

Tabelle 18: OxI-Werte der PI-Hydrolysate (2 mg/mL) über den Superoxid Anion Radikalfänger Assay.

PI-Hydrolysat	OxI [%]	Standardabweichung
Pepsin	-1,48	0,03
Pepsin/Pancreatin	1,12	0,05
Pepsin/ α -Chymotrypsin	-6,70	0,14
Pepsin/ α -Chymotrypsin/Trypsin	-8,19	0,04
Bromelain	8,49	0,60
Trypsin	-0,60	0,01
Papain	-2,83	0,02

Die Pyrogallol-Autoxidation wurde lediglich mit dem Bromelainhydrolysat (8,49 %) inhibiert. Alle anderen Hydrolysate zeigten einen geringen oder sogar einen förderlichen Effekt auf die Pyrogallol-Autoxidation. Im Vergleich zu anderen pflanzlichen Proteinen zeigt jedoch selbst das Bromelainhydrolysat nur einen schwach radikal-maskierenden Effekt. In der Literatur sind OxI-Werte um über 60 % für Hydrolysate aus Kichererbsenprotein, Rapssaatprotein und Luzerne nachgewiesen worden [79, 81, 82].

Die beiden Assays zur Bewertung der antioxidativen Kapazität der PI-Hydrolysate beruhen auf unterschiedlichen Prinzipien. Der TEAC-Assay misst die Kapazität einer Verbindung in Bezug auf ihr Potential ein Wasserstoffatom zu übertragen, um das gebildete DMPD^{•+} wieder zu DMPD zu reduzieren [83]. Das Prinzip des SAR-Assay beruht auf einem Abfangen der radikalen Sauerstoffspezies, um eine Autoxidation des Pyrogallol zu verhindern [80]. Die unterschiedlichen Ergebnisse beider Tests zeigen, dass die bioaktiven Peptide in den PI-Hydrolysaten zwar reduzierende Wirkung auf eine bereits oxidierte Verbindung besitzen, jedoch nicht in der Lage sind radikale Sauerstoffspezies abzufangen.

4.3.2.4.2 ACE-hemmende Wirkung

Die PI-Hydrolysate wurden ebenfalls auf ihre inhibierende Wirkung gegenüber dem Angiotensin Converting Enzyme (ACE) getestet. Das Substrat Hippuryl-L-Histidyl-L-Leucin (HHL) wird durch ACE in Hippursäure (HA) und L-Histidyl-L-Leucin (HL) gespalten. Der Produktumsatz der durch das ACE-katalysierten Reaktion wird mittels RP-HPLC quantifiziert. Wird das ACE inhibiert, verläuft die Reaktion entsprechend weniger effizient [84]. Aus dem Inhibitionswert kann über die jeweilige Protein- bzw. Peptidkonzentration der IC₅₀-Wert berechnet werden. Je niedriger der IC₅₀-Wert, desto höher das ACE-inhibierende Potential.

Abbildung 23 zeigt den Reaktionsmechanismus des Umsatzes von HHL zu HA und HL.

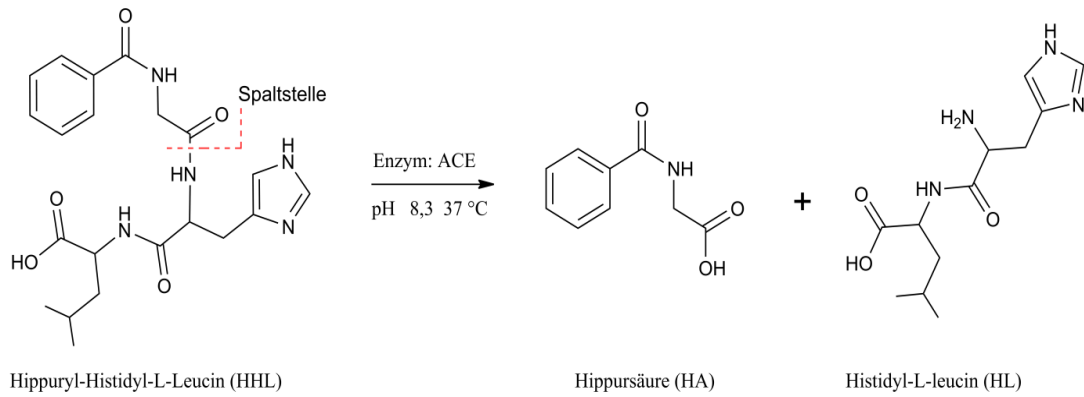


Abbildung 23: ACE katalysierter Umsatz von Histidyl-Hippuryl-L-Leucin (HHL) zu Hippursäure (HA) und Histidyl-L-Leucin (HL).

Weitere Details zu der Durchführung des ACE-Tests befinden sich im Anhang Kapitel 6.4.7. In Tabelle 19 befinden sich die IC_{50} -Werte der PI-Hydrolysate.

Tabelle 19: IC_{50} -Werte der Kartoffelproteine und der PI-Hydrolysate.

PI-Hydrolysat/ Probe	IC_{50} [mg/mL]
Native Proteaseinhibitoren	leicht aktivitätsfördernd
Pepsin	$0,46 \pm 0,01$
Pepsin/Pancreatin	leicht aktivitätsfördernd
Pepsin/ α -Chymotrypsin/Trypsin	leicht aktivitätsfördernd
Bromelain	$0,56 \pm 0,01$
Papain, Trypsin	aktivitätsfördernd

Ein Vergleich der ermittelten IC_{50} -Werte mit dem sehr potenten ACE-Hemmer Captopril (IC_{50} : 0,005 mg/mL [85]) zeigt, dass die Werte der PI-Hydrolysate um den Faktor 100 höher liegen. Für die getesteten PI-Hydrolysate ergeben sich IC_{50} -Werte von $0,46 \pm 0,01$ mg/mL für den Verdau mit Pepsin und $0,56 \pm 0,01$ mg/mL für den Verdau mit Bromelain. Die mit Papain, Trypsin und α -Chymotrypsin hergestellten Hydrolysate wiesen sogar eine aktivitätsfördernde Wirkung auf das ACE auf.

In der Literatur ist allerdings belegt, dass diese Werte in vivo relativiert werden können. So wurden die Peptide YAEERYPIL und RADHPFL aus Pepsinhydrolysiertem Eiweiß nach Verdau im Gastrointestinaltrakt in die Peptide YAEER, YPI und RADHP gespalten. YPI und RADHP zeigten in-vitro nur eine leichte ACE-hemmende Wirkung, doch zeigte sich ein starker blutdrucksenkender Effekt nach oraler Aufnahme durch SHR [28]. Auch Hydrolysate aus Rinder-casein, die sich in ihrem IC_{50} -Wert in vitro um den Faktor 10 unterschieden, zeigten in vivo einen ähnlichen Effekt. Zudem wurde die

blutdrucksenkende Wirkung von Captopril trotz eines in der gleichen Größenordnung liegenden IC_{50} -Wertes nicht erreicht [86]. Diese Studie zeigt, dass eine in-vivo-Studie zur Überprüfung des blutdrucksenkenden Potentials nötig ist, um in Lebensmitteln als blutdrucksenkendes Mittel eingesetzt zu werden. Die in vitro-Aktivitäten lieferten jedoch Hinweise auf das generelle Potential.

4.3.2.4.3 Antimikrobielles Potential

Aus der Literatur ist bekannt, dass Peptide auch antimikrobielle Wirksamkeit entfalten können, diese ist jedoch sehr pathogenspezifisch. Daher wurde die antimikrobielle Wirksamkeit der PI-Hydrolysate an zwei Standardorganismen mit unterschiedlichem Zellaufbau getestet. Als Testorganismen wurden das prokaryotische gram-negative Bakterium *E. coli K1* und die eukaryotische Hefe *Kluveromyces marxianus* ausgewählt. Zunächst wurden die Hydrolysate über den Agardiffusionstest getestet, jedoch konnten keine Hemmhöfe verzeichnet werden. Daher wurde auf den Broth Mikroverdünnungsassay zurückgegriffen. Hierbei werden die zu untersuchenden Bakterien (*E. coli K1* und *Kluveromyces marxianus*) in einem Schüttelkolben bis zur exponentiellen Phase kultiviert. Anschließend wird ein Teil dieser Vorkultur entnommen und auf eine Zellzahl von 10^6 Zellen/mL verdünnt. Anschließend werden die Bakterien in einer 96-well-Platte mit und ohne PI-Hydrolysate, sowie mit dem Standard Antibiotikum (Tetracyclin) kultiviert. Über die optischen Dichte (OD_{600}) wurde anschließend die Inhibierung des Bakterienwachstums bestimmt. Die Methode ist im Anhang Kapitel 6.4.11 dargestellt.

In Tabelle 20 sind die prozentualen Inhibitionswerte der einzelnen Hydrolysate gegen *Kluveromyces marxianus* und *E. coli K1* aufgelistet.

Tabelle 20: Antimikrobielles Potential in % der PI-Hydrolysate gegen *Kluveromyces marxianus* und *E. coli K1* über den Mikroverdünnungsassay.

PI-Hydrolysat/ Probe	Antimikrobielles Potential [%]			
	<i>Kluveromyces marxianus</i>	Standard-abweichung	<i>E. coli K1</i>	Standard-abweichung
Native Proteaseinhibitoren	32,8	2,4	-43,0	12,6
Pepsin	45,8	2,2	-22,5	9,5
Pepsin/Pancreatin	25,4	5,3	-16,3	10,4
Pepsin/ α -Chymotrypsin	20,7	1,7	-22,5	6,5
Pepsin/ α -Chymotrypsin/Trypsin	1,1	9,7	-55,2	13,4
Trypsin	19,2	2,8	-28,8	13,5
Bromelain	38,8	1,5	-38,2	1,2
Papain	11,9	5,3	-21,0	0,9

Alle Hydrolysate zeigten einen Einfluss auf das Wachstum beider Mikroorganismen. Durch die PI-Hydrolysate kann das Wachstum der Hefe *K. marxianus* um bis zu $45,79 \pm 2,17$ % (Pepsin) gehemmt werden. Diese hemmende Wirkung liegt allerdings nur um ca. 13 % höher als bei den nativen PI. Die inhibierende Wirkung wurde bei einigen Hydrolysaten (Pepsin/ α -Chymotrypsin/Trypsin und Papain) sogar stark reduziert. Im Gegensatz zu der hemmenden Wirkung auf die Hefe *K. marxianus* haben alle Hydrolysate einen wachstumsfördernden Einfluss auf *E. coli K1*. Im Vergleich zu den nativen Proteaseinhibitoren ließ sich die wachstumsfördernde Wirkung der Proben auf *E. coli K1* durch Hydrolyse um bis zu 27 % verringern. Im Fall des Pepsin/ α -Chymotrypsin/Trypsin-Hydrolysats erhöhte sich jedoch die wachstumsfördernde Wirkung um ca. 12 %.

Die unterschiedliche Wirkung der Peptide auf die beiden Testorganismen kann mit dem Aufbau der Zellmembran begründet werden. So führt zum Beispiel die Anwesenheit von Sterolen in der Zellmembran von Eukaryotischen Zellen (z.B. Hefen) sowie die relativ neutrale Ladung der Zytoplasmamembran zu einer erhöhten Angreifbarkeit durch antimikrobielle Peptide. Prokaryotische Zellen besitzen meist eine elektronegative Ladung der Zytoplasmamembran und nur geringe Anteile an Sterolen in der Zellmembran [87].

4.3.2.5 **Zusammenfassung: Enzym. Hydrolyse der Proteaseinhibitoren**

Die Hydrolyse der PI konnte mit vorhergehender saurer Hydrolyse mit Pepsin oder durch vorherige Hitzeeinwirkung realisiert werden. Durch die Hitzebehandlung wird die 3D-Struktur des Proteins zerstört und die Proteasen können besser mit dem Protein interagieren [1, 88]. Mit Hilfe der präp. RP-HPLC konnten die Hydrolysen verfolgt und einige der Fraktionen gezielt aufgereinigt werden. Aufgrund der Vielzahl an möglichen Peptidabschnitten, deren einzelne Aufreinigung sehr aufwändig gewesen wäre, wurden die Gesamthydrolysate auf Bioaktivität untersucht. So konnte zum Einen festgestellt werden, durch welches Enzym oder Enzymgemisch sich die bioaktiven Peptide erzeugen lassen und zum Anderen, ob durch die Hydrolyse Peptide mit signifikanter Wirkung entstehen, sodass sich die aufwändige Aufreinigung lohnt.

Die Untersuchung der Hydrolysate auf blutdrucksenkende, antioxidative und antimikrobielle Wirksamkeit zeigte, dass zwei der Hydrolysate (Pepsin/ α -Chymotrypsin und Papain) eine gesteigerte antioxidative Wirkung über den TEAC-Assay aufweisen. Die Antioxidative Kapazität dieser beiden Hydrolysate liegt, im Gegensatz zu den nativen PI, um das 25, bzw. 10 fache höher. Eine signifikante radikalmaskierende Eigenschaft über den Superoxid Anionen Radikalfänger Assay konnte bei keinem der Hydrolysate bestätigt werden.

Eine antimikrobielle Wirkung konnte bei allen Hydrolysaten gegenüber der Hefe *K. marxianus* festgestellt werden. Das höchste Antimikrobielle Potential zeigt das PI-Hydrolysat mit Pepsin (ca. 46 %). Auf *E. coli K1* hatten alle Hydrolysate einen aktivitätsfördernden Effekt.

Auch die blutdrucksenkende Wirkung über die Hemmung des ACE brachte Werte, die mit in der Literatur beschriebenen Werten vergleichbar sind [89].

Ein ACE-hemmender Effekt wurde jedoch nur bei zwei der sechs Hydrolysate festgestellt (Pepsin und Bromelain). Diese zeigten Werte, die allerdings gegenüber dem sehr potenten ACE-Hemmer Captopril (IC_{50} : 0,005 mg/mL) um den Faktor 100 höher liegen. In der Literatur ist allerdings belegt, dass diese Werte in vivo relativiert werden können [28].

4.3.3 Enzymatische Hydrolyse des Patatin

Viele Aspekte der enzymatischen Hydrolyse von Patatin wurden bereits in der Arbeit von A. Graf behandelt [45]. Hier konnte gezeigt werden, dass die Hydrolysate des Pepsin- und des Papainverdaus eine ausgeprägte Bioaktivität aufweisen. Aus diesem Grund wurde sich in diesem Kapitel hauptsächlich auf die Hydrolysate dieser beiden Enzyme konzentriert. Um ausschließen zu können, dass die Bioaktivität nicht auf die Autohydrolyse der Enzyme und die dadurch entstandenen Peptidverbindungen zurückzuführen ist, wurden die beiden Enzyme Pepsin und Papain auf einem geeigneten Trägermaterial immobilisiert und die Hydrolysate anschließend auf Bioaktivität überprüft.

Zudem wurde in der Arbeit von A. Graf gezeigt, dass die Hydrolyse mit Trypsin, sowie α -Chymotrypsin nicht zur Gewinnung von Peptiden geeignet erscheint, da während des Aufreinigungsprozesses geringe Mengen an Proteaseinhibitoren mit dem Patatin zusammen abgetrennt werden (siehe Kapitel 4.1.5), die die Enzyme zur Hydrolyse des Patatin inhibieren. Daher wurde der Hydrolyseprozess dem Weg durch das menschliche Verdauungssystem nachempfunden. Die Proteine gelangen zunächst mit dem Speisebrei in den Magen, wo sie bei saurem pH-Wert durch Pepsin in Poly- und Oligopeptide gespalten werden. Anschließend gelangen diese mit dem Speisebrei in das Dünndarmlumen. Die im Pankreas gebildeten Zymogene von Trypsin, α -Chymotrypsin und verschiedenen Carboxypeptidasen werden durch das alkalische Milieu im Dünndarm in ihre aktiven Formen überführt und spalten die Peptide nun weiter in Di- und Tripeptide sowie freie Aminosäuren [70]. Mit dieser Methode wurde versucht einen Verdau des Patatins mit den Enzymen Trypsin und α -Chymotrypsin zu realisieren. Der Hydrolyseprozess in Kapitel 4.3.3.3 ist diesem Verdauungsweg ansatzweise nachempfunden.

Die Hydrolysebedingungen für das gesamte Kapitel sind bereits in Kapitel 4.3.1 beschrieben. Die in Kapitel 4.3.3.1 und 4.3.3.2 dargestellten Ergebnisse wurden im Rahmen der Bachelorarbeit von Heiko Kluge angefertigt.

4.3.3.1 Immobilisierung von Papain und Pepsin

Die Immobilisierung von Papain und Pepsin wurde auf dem Trägermaterial Eupergit CM durchgeführt. Eupergit CM ist sphärisch und besteht aus einem Methylacrylamid copolymer und Epoxidgruppen, die als funktionelle Gruppen eine kovalente Bindung zur Aminogruppe des Enzyms ausbilden. Die Partikelgröße liegt

zwischen 50-300 µm. Die Proteine Papain sowie Pepsin wurden in 2 mL Eppendorf Reaktionsgefäße eingewogen und in Puffer gelöst. Das Verhältnis von Enzym zu Träger betrug jeweils 1:4. Als Puffer wurde für Papain ein Natriumphosphatpuffer 50 mM bei pH 7 gewählt. Pepsin wurde in einem Natriumphosphatpuffer 50 mM bei pH 2,5 gelöst. Die Immobilisierung erfolgte über 24 h bei Raumtemperatur auf einem Überkopfschüttler. Die Schüttelgeschwindigkeit betrug 30 rpm.

Im Anschluss wurden die Proben bei 4.000 x g 2 min zentrifugiert und die Puffer-Überstände abgenommen. Das Immobilisat wurde anschließend dreimal mit je 500 µL Puffer gewaschen. Die Überstände sowie die vereinigten Waschwasser der einzelnen Immobilisate wurden zur Bestimmung des Bedeckungsgrades benutzt.

4.3.3.1.1 Bedeckungsgrad

Der Bedeckungsgrad wurde mit Hilfe des modifizierten Lowry-Protein-Assays in Dreifachbestimmung bestimmt. Als Kalibrationsreihe wurde jeweils das zu bestimmende Enzym eingesetzt. Ermittelt wurden die Proteinkonzentration des eingesetzten Enzyms, des Überstands und des Waschwassers der Immobilisate. Damit kann sowohl der Bedeckungsgrad (mg Enzym pro mg Träger), als auch der prozentuale Anteil an gebundenem Enzym berechnet werden.

Bedeckungsgrad:

$$\beta \left(\frac{\text{mg Enzym}}{\text{mg Träger}} \right) = \frac{\text{Enzym}_{\text{eingesetzt}} - \text{Enzym}_{\text{Überstand+Waschwasser}}}{\text{Träger}_{\text{eingesetzt}}}$$

Tabelle 21: Bedeckungsgrad und gebundener Anteil der eingesetzten Enzyme.

Enzym	Bedeckungsgrad	Standardabweichung	Gebundener Anteil [%]
Papain	0,148	$2,06 \cdot 10^{-5}$	57,5
Pepsin	0,167	$7,94 \cdot 10^{-6}$	74,5

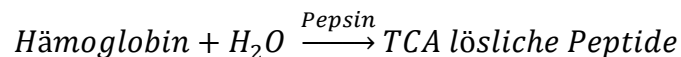
Sowohl Papain als auch Pepsin lassen sich gut auf dem Träger immobilisieren. Die Bindung eines Enzyms an einen Träger ist jedoch häufig mit Aktivitätsverlusten verbunden. Es gibt verschiedene Ursachen für einen Aktivitätsverlust. So ist eine Konformationsänderung des Proteins möglich, wenn es sich kovalent an einen Träger bindet. Auch kann das aktive Zentrum des Enzyms nach der Bindung verdeckt sein. Daher wurden die immobilisierten Enzyme anschließend auf Aktivität überprüft.

4.3.3.1.2 Aktivitätstests der immobilisierten Enzyme

Aktivitätstests sind in der Regel für native Enzyme vorgesehen. Eine Übertragung der Reaktionsbedingungen auf immobilisierte Enzyme ist nicht immer ohne Weiteres möglich. Auch die Aktivitätsassays für Papain und Pepsin sind nicht für immobilisierte Enzyme geeignet. So lässt sich zum Beispiel für die Assays lediglich eine über den Bedeckungsgrad ermittelte Enzymmenge einwiegen. Dennoch eignet sich der Test um eine qualitative Aussage über die Enzymaktivität zu treffen. Es lässt sich lediglich keine genaue Angabe über die spezifische Enzymaktivität machen.

Pepsin Aktivitätsassay

Für die Aktivitätsprüfung des Pepsins wurde eine photometrische Punktmessung bei 280 nm genutzt. Zunächst wird das Hämoglobin bei 37 °C und pH 2 durch Pepsin hydrolysiert. Hierbei entstehen Peptide, die in Trichloressigsäure (TCA) löslich sind. Nach dem Filtrieren der Lösung lassen sich die Peptide anschließend bei 280 nm detektieren [90].



Papain Aktivitätsassay

Die Aktivität des Papains wurde über seine Enzymkinetik ermittelt. Dabei wird N-Benzoyl-L-Argininethylester (BAEE) bei 25 °C und pH 6,2 von Papain hydrolysiert. Die entstehende Säure wird mittels Titration, als eine Funktion von verbrauchter NaOH (aq) gegen die Zeit gemessen [91].

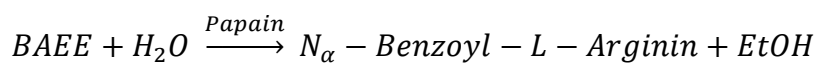


Tabelle 22 zeigt die Aktivitäten der beiden Enzyme, die über die Assays ermittelt wurden. Die Werte wurden in Dreifachbestimmung ermittelt. Allerdings sollte hier lediglich die qualitative Aussage getroffen werden, dass beide Enzyme auch im immobilisierten Zustand Aktivitäten aufweisen. Der Aktivitätsverlust von 45 - 55 % ist lediglich auf Grundlage der für immobilisierte Enzyme sehr ungenauen Aktivitätsassays berechnet.

Tabelle 22: Aktivität der Enzyme vor und nach der Immobilisierung.

Enzym	Aktivität [U/mg]	Standardabweichung	Aktivitätsverlust [%]
Papain nativ	5,62	$2,22 \cdot 10^{-3}$	
Papain immobilisiert	2,52	$1,55 \cdot 10^{-2}$	55,2
Pepsin nativ	4.063,91	$3,66 \cdot 10^{-7}$	
Pepsin immobilisiert	2.183,28	524,68	46,3

Die Messungen zeigen, dass sich beide Enzyme sehr gut auf dem Trägermaterial Eupergit® CM immobilisieren lassen. Die Aktivitätstests machen deutlich, dass die Enzyme auch nach der Immobilisierung noch aktiv sind und sich zur Hydrolyse von Patatin eignen. In den nachfolgenden Untersuchungen zur Bioaktivität der entstandenen Peptide wurde der Aktivitätsverlust durch die Immobilisierung nicht berücksichtigt. Durch den ungenauen Aktivitätstest konnte keine äquivalente Menge an nativem Enzym berechnet werden. Die Menge an eingesetztem Enzym wurde daher auf den Bedeckungsgrad des Trägermaterials bezogen.

4.3.3.2 Bioaktivität der entstandenen Peptidverbindungen durch enzymatischen Verdau im Vergleich nativ/ immobilisiert

Die mit den beiden Enzymen entstandenen Hydrolysate wurden auf ihre bioaktive Wirksamkeit getestet. Dazu wurde das gesamte Hydrolysat gegebenenfalls nach Abtrennung des Trägermaterials, auf Bioaktivität überprüft. Getestet wurden die Hydrolysate auf ihr antioxidatives Potential, ihre ACE-hemmende Wirkung und ihren antimikrobiellen Effekt.

4.3.3.2.1 Antioxidative Wirksamkeit

Die antioxidative Kapazität wurde wie schon bei den PI, über zwei verschiedene Assays bestimmt. Für die Patatin-Hydrolysate wurden der TEAC-Assay (Trolox Equivalent Antioxidant Assay) und der ORAC-Assay (Oxygen-Radical Absorbing Capacity) ausgewählt.

Trolox Equivalent Antioxidant Capacity Assay (TEAC-Assay)

Der TEAC-Assay bestimmt die antioxidative Kapazität einer Verbindung über die Entfärbung des violetten N,N-Dimethyl-1,4-phenylendiamin-Radikalkations (DMPD⁺). Dieses entsteht aus DMPD bei saurem pH-Wert in Gegenwart eines geeigneten Oxidationsmittels wie z.B. FeCl₃. Antioxidative Verbindungen mit der Fähigkeit ein

Wasserstoffatom auf DMPD^{+} zu übertragen, verursachen eine Entfärbung der Lösung proportional zu ihrer Konzentration. Die antioxidative Kapazität wird in mmol Troloxäquivalente/ g Antioxidans angegeben. Weitere Details zur Durchführung des Assays finden sich im Anhang Kapitel 6.4.8. Tabelle 23 zeigt das antioxidative Potential der Hydrolysate im Vergleich zum nativen Patatin.

Tabelle 23: TEAC Troloxäquivalente der aus der Hydrolyse gewonnenen Peptide.

Patatinhydrolysat/ Probe	TEAC [mmol Eq./g Protein]	Standardabweichung
Patatin	0,188	$7,26 \cdot 10^{-5}$
Papain nativ	0,596	$2,216 \cdot 10^{-5}$
Papain immobilisiert	0,512	0,047
Pepsin nativ	0,394	$8,158 \cdot 10^{-5}$
Pepsin immobilisiert	0,499	0,014

Die Tabelle 23 zeigt, dass die Hydrolysate mit den immobilisierten Enzymen in beiden Fällen eine geringere antioxidative Kapazität aufweisen. Allerdings liegen alle Werte noch in der gleichen Größenordnung. Zudem weisen alle Hydrolysate ein höheres antioxidatives Potential als das native Patatin auf.

Wang et al. (2005) konnten antioxidative Eigenschaften in einem Kartoffelproteinhydrolysat durch Alcalaseverdau dokumentieren [92]. Zudem wiesen verschiedene Fruchtextrakte TEAC-Werte zwischen 0,0016 - 0,0202 mmol/g auf [78], was eine um den Faktor 20 geringere Aktivität gegenüber den Patatin-Hydrolysaten ist. Über den TEAC-Assay können jedoch nur Verbindungen auf antioxidative Wirksamkeit getestet werden, die in der Lage sind ein Wasserstoffatom zu übertragen. Daher wurde das antioxidative Potential über einen weiteren Assay bestimmt.

ORAC-Assay (Oxygen-Radical Absorbing Capacity)

Mittels des ORAC-Assays wird die oxidative Degradation einer fluoreszierenden Spezies durch Peroxylradikale fluoreszenz-spektroskopisch untersucht. Peroxylradikale werden beim thermischen Abbau von 2,2'-Azobis-(2-Methylpropionamidin) (AAPH) freigesetzt und schädigen das Fluorescein. Antioxidative Substanzen schützen die Fluoresceinmoleküle vor dem oxidativen Angriff und beeinflussen somit die Kinetik der Fluoreszenzabnahme. Weitere Details zur Durchführung des Assays befinden sich im Anhang Kapitel 6.4.9.

In Tabelle 24 sind die Ergebnisse des Papain- und Pepsinverdaus sowie des reinen Patatin zusammengestellt.

Die antioxidative Kapazität des Patatins konnte durch die Hydrolyse um den Faktor 10 bis 50 gesteigert werden.

Tabelle 24: Troloxäquivalente von Patatin und seinen Hydrolysaten über den ORAC-Assay.

Patatin-Hydrolysat/ Probe	ORAC [mmol Eq./g Protein]	Standardabweichung
Patatin	0,0236 ^{*)}	-
Papain nativ	0,434	0,304
Papain immobilisiert	0,224	0,015
Pepsin nativ	0,451	0,309
Pepsin immobilisiert	1,007	0,094

*) Graf, A.M, Dissertation Universität Hannover, 2010

Die über den ORAC-Assay ermittelten Werte sind vergleichbar mit im Handel erhältlichen Nahrungsergänzungsmitteln, die Werte von 0,0079 - 2,27 mmol/g aufweisen [93].

Die mit den nativen Enzymen hergestellten Hydrolysate besitzen eine ähnliche antioxidative Kapazität. Allerdings weist das mit immobilisiertem Papain hergestellte Hydrolysat nur die Hälfte der Kapazität auf. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass sich im Hydrolysat mit nativem Papain Peptidabschnitte befinden, die von der Autohydrolyse des Papains stammen und ebenfalls antioxidative Eigenschaften aufweisen. Bei dem mit immobilisiertem Pepsin hergestellten Hydrolysat verhält es sich genau anders herum. Die Antioxidative Kapazität konnte um mehr das Doppelte gesteigert werden. Die Ursache hierfür könnte in einer gesteigerten oxidativen Kapazität einiger durch Autohydrolyse entstandener Peptidabschnitte des Pepsins liegen, da diese mit der Immobilisierung ausgeschlossen wurden. Um diese Hypothese zu bestätigen müsste jedoch noch ein Autohydrolysat des Pepsins auf antioxidative Wirkung überprüft werden.

4.3.3.2.2 ACE-hemmende Wirkung

Die Hydrolysate wurden mittels des ACE-Tests auf ihre potentielle blutdrucksenkende Wirkung getestet. Die durch das Angiotensin Converting Enzyme (ACE) katalysierte Reaktion von HHL zu HA und HL wird mittels RP-HPLC quantifiziert. Weitere Details zum Assay sind in Kapitel 4.3.2.4.2 und im Anhang 6.4.7 dargestellt. Aus dem Inhibitionswert kann über die jeweilige Protein- bzw. Peptidkonzentration der IC₅₀ (Inhibitor Concentration)-50-Wert berechnet werden. Je niedriger der IC₅₀-Wert, desto höher das ACE-inhibierende Potential.

In Tabelle 25 sind die IC₅₀-Werte der Patatin-Hydrolysate dargestellt.

Tabelle 25: IC₅₀-Werte der Kartoffelproteine und der Patatin-Hydrolysate.

Patatin-Hydrolysat/ Probe	IC ₅₀ [mg/mL]	Standardabweichung
Patatin	1,08	6,114·10 ⁻²
Papain nativ	2,54	0,059
Papain immobilisiert	fördernd	
Pepsin nativ	0,38	0,059
Pepsin immobilisiert	0,42	0,057

Im Gegensatz zu der Patatinprobe weisen alle Hydrolysate einen Effekt auf das ACE auf. Das native Hydrolysat mit Papain hat zwar nur einen geringen hemmenden Effekt auf das ACE, jedoch weist das mit immobilisiertem Papain hergestellte Hydrolysat einen fördernden Effekt auf das ACE auf. Diese gesteigerte Wirkung des ACE stammt von Peptiden aus dem Patatinverdau, da eine Vermischung mit Papainautohydrolysaten ausgeschlossen werden kann. Es ist jedoch noch zu überprüfen, ob ein Papainautohydrolysat eine so starke ACE-hemmende Wirkung aufweist, das sie das fördernde Potential der Patatinpeptide aufhebt.

Das Hydrolysat aus dem Pepsinverdau hingegen weist kaum einen Unterschied zwischen dem immobilisierten und dem nativen Enzym auf.

Alle ermittelten IC₅₀-Werte wurden mit dem sehr potenten ACE-Hemmer Captopril (IC₅₀: 0,005 mg/mL [85]) verglichen, der einen sehr niedrigen IC₅₀ aufweist. Die Werte der Patatin-Hydrolysate dagegen liegen um den Faktor 100-500 höher, was eine entsprechende schlechtere ACE-hemmende Wirkung bedeutet. In der Literatur ist allerdings belegt, dass diese Werte in vivo relativiert werden können [86], was das Potential in Lebensmitteln als blutdrucksenkendes Mittel eingesetzt zu werden nicht unbedingt ausschließt.

4.3.3.2.3 Antimikrobielles Potential

Wie schon in Kapitel 4.3.2.4.3 beschrieben, konnten die antimikrobiellen Eigenschaften nicht über einen Agardiffusionstest belegt werden, da das antimikrobielle Potential zu gering ausgeprägt ist. Daher wurde auch hier auf den Broth Mikroverdünnungsassay zurückgegriffen. Als Testorganismus wurde hier ausschließlich das gram-negative Bakterium *E. coli K12* verwendet.

Broth Mikroverdünnungs Assay

Tabelle 26 zeigt das antimikrobielle Potential gegenüber *E. coli K12* der Patatin-Hydrolysate mit den Enzymen Pepsin und Papain.

Tabelle 26: Antimikrobielles Potential von Patatin und seinen Hydrolysaten über den Broth-Mikroverdünnungs-Assay.

Patatin-Hydrolysat/ Probe	P_{anti} (%)	Standardabweichung
Papain nativ	38,2	0,94
Papain immobilisiert	40,7	4,22
Pepsin nativ	44,1	3,49
Pepsin immobilisiert	49,5	8,85

Die Messungen ergaben einen wachstumshemmenden Effekt aller Hydrolysate auf die *E.coli K12* Kultur. Die mit den immobilisierten Enzymen hergestellten Hydrolysate wiesen jeweils ein leicht höheres antioxidatives Potential auf, jedoch liegen alle Werte in der gleichen Größenordnung. Es lässt sich somit kein signifikanter Unterschied zwischen dem mit immobilisierten Enzym und dem mit nativem Enzym hergestellten Hydrolysat machen. Weitere Untersuchungen des antimikrobiellen Potentials mit anderen Bakterienstämmen oder Hefen würde die Aussage über das antimikrobielle Potential verbessern.

4.3.3.3 Hydrolyse von Patatin mit Trypsin und α -Chymotrypsin

Die Hydrolyse mit den Enzymen Trypsin und α -Chymotrypsin wurde, wie in der Einleitung des Kapitels 4.3.3 beschrieben, dem menschlichen Verdauungssystem nachempfunden. Es wurde in einem zweistufigen Prozess hydrolysiert. Zunächst wurde 60 min mit Pepsin bei pH 2 hydrolysiert und anschließend nach einem pH-shift auf pH 7,5 jeweils die Enzyme Trypsin, α -Chymotrypsin und α -Chymotrypsin/Trypsin zugesetzt und je weitere 60 min hydrolysiert. Die Gesamthydrolysezeit betrug somit je 120 min.

Anschließend wurden die Protein-Hydrolysate mittels einer analytischen RP-HPLC und einer speziell für Peptide (< 10 kDa) entwickelten Trennsäule (Jupiter™Proteo C12, Phenomenex) analysiert. Als mobile Phase wurde ein Zwei-Komponenten-Gradientensystem aus deion. H₂O mit 0.1 % (v/v) TFA und Acetonitril mit 0.1 % (v/v) TFA verwendet. Detektiert wurde bei einer Wellenlänge von 214 nm (Gradient im Anhang).

Mit Hilfe der schon von A. Graf und I. Pepelanova etablierten RP-HPLC-Methode [45, 94] wurden Peptid-Fingerprints erstellt, um den Proteinabbau qualitativ zu verfolgen. In Abbildung 24 sind die Peptidfingerprints der Verdauungssimulationen zu sehen. Die reine Patatinprobe in blau zeigt einen breiten Peak bei einer Retentionszeit von etwa 42 min. Dieser Peak ist in geringerem Ausmaß auch bei den Hydrolysaten durch Pepsin, Trypsin und α -Chymotrypsin zu erkennen. Der höchste Hydrolysegrad wurde nach 60 min Hydrolyse Pepsin und anschließender Zugabe von Trypsin in Kombination mit α -Chymotrypsin nach 120 min erreicht.

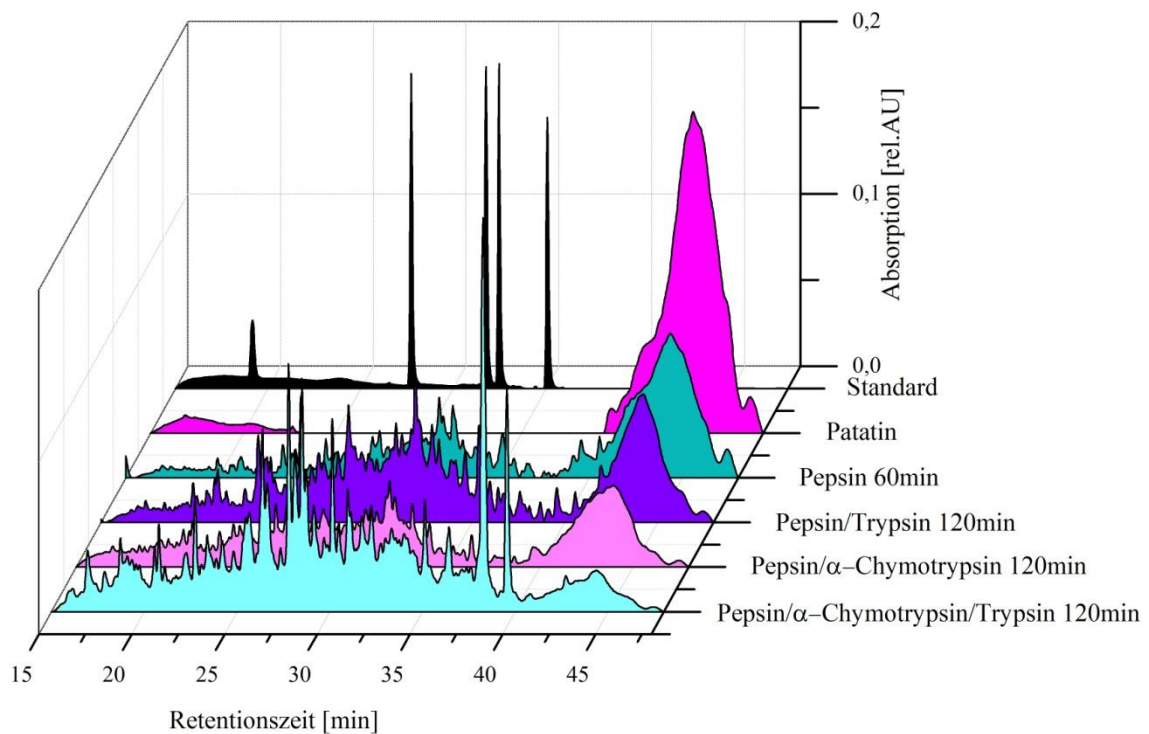


Abbildung 24: HPLC-Fingerprint der verschiedenen Hydrolysate. Standard: Gly-Tyr, Val-Tyr-Val, Methionin-Enkephalin, Leucin-Enkephalin, Angiotensin II.

Hier konnte gezeigt werden, dass durch die vorhergehende saure Hydrolyse mit Pepsin weitere Peptide mit α -Chymotrypsin sowie Trypsin erzeugt werden können. Abbildung 24 ist deutlich zu entnehmen, dass der Verdau mit Pepsin/ α -Chymotrypsin/ Trypsin zu einem breiten Spektrum an Peptiden führt. Anschließend wurden die

Hydrolysate auf ihre antioxidative Kapazität (über den TEAC-Assay) und auf ihre blutdrucksenkende Wirkung getestet. Die Funktionsweisen sind bereits in Kapitel 4.3.3.2 dargestellt.

Tabelle 27 gibt einen Überblick über die ermittelten Bioaktivitäten der Hydrolysate.

Tabelle 27: Bioaktivität der Patatin-Hydrolysate durch Trypsin und α -Chymotrypsin.

Patatin-Hydrolysat/ Probe	TEAC [mmol Eq./g Protein]	Standard- abweichung	ACE IC ₅₀ [mg/mL]	Standard- abweichung
Patatin	0,188	$7,26 \cdot 10^{-5}$	1,077	$6,114 \cdot 10^{-2}$
Pepsin	0,361	$4,93 \cdot 10^{-5}$	0,037	$2,229 \cdot 10^{-4}$
Pepsin/ α - Chymotrypsin	0,146	$8,76 \cdot 10^{-5}$	0,039	$4,334 \cdot 10^{-4}$
Pepsin/Trypsin	0,112	$5,96 \cdot 10^{-5}$	0,039	$2,130 \cdot 10^{-4}$
Pepsin/ α - Chymotrypsin/Trypsin	0,002	$6,78 \cdot 10^{-4}$	0,036	$1,952 \cdot 10^{-4}$

Die antioxidative Kapazität des Patatin konnte durch die Hydrolyse mit den in der Tabelle 27 verzeichneten Enzymen nur geringfügig gesteigert werden. Die höchste antioxidative Kapazität wies das Pepsin/ α -Chymotrypsin/Typtsin-Hydrolysat auf. Es zeigte ein etwa doppelt so hohes antioxidatives Potential wie das native Patatin. Die Tatsache, dass das Hydrolysat mit dem höchsten Hydrolysegrad und damit auch den kleinsten Peptidabschnitten das höchste Potential aufweist, ist von Vorteil, da die Wahrscheinlichkeit auf vollständige Resorption bei Di- und Tripeptiden höher als bei längeren Aminosäuresequenzen ist [25]. Zudem zeigte dasselbe Hydrolysat im Test auf ACE-hemmende Wirkung die höchste Aktivität. Dies legt die Vermutung nahe, dass die gleichen Peptide, die das ACE inhibieren, auch für die antioxidative Wirkung verantwortlich sind, denn auch Captopril besitzt antioxidative Eigenschaften [95]. Diese Hydrolysate zeigen ein hohes Potential auf Bioaktivität. Zudem ist die Wahrscheinlichkeit vollständig und unverändert im Magen-/Darmtrakt resorbiert zu werden durch die Größe der Peptide relativ hoch. Allerdings waren die zur Hydrolyse herangezogenen Enzyme nicht immobilisiert. Daher ist die Kontamination mit bioaktiven Peptidfragmenten der Enzyme nicht auszuschließen.

4.3.3.4 Untersuchungen aufgereinigter Fraktionen mittels MALDI-TOF MS

Wie schon in Kapitel 4.3.2 wurden auch aus dem Patatinverdau mit den Enzymen Pepsin/ α -Chymotrypsin/ Trypsin Peaks mit der präparativen RP-HPLC aufgereinigt. In Abbildung 25 wurde ein Hydrolysat aus Patatin mit Pepsin, α -Chymotrypsin und Trypsin (ges. Hydrolysezeit 120 min) aufgetrennt. Rot markiert sind zwei der gesammelten Fraktionen. Da jeweils nur 100 μ L injiziert wurden, wurde dasselbe Hydrolysat viermal aufgetrennt. Die gesammelten Fraktionen wurden anschließend mit Zip Tip[®] (C₁₈ Pipette Tips for sample preparation, Millipore Corporation, USA) aufkonzentriert und einzeln im Massenspektrometer MALDI-MS-TOF charakterisiert.

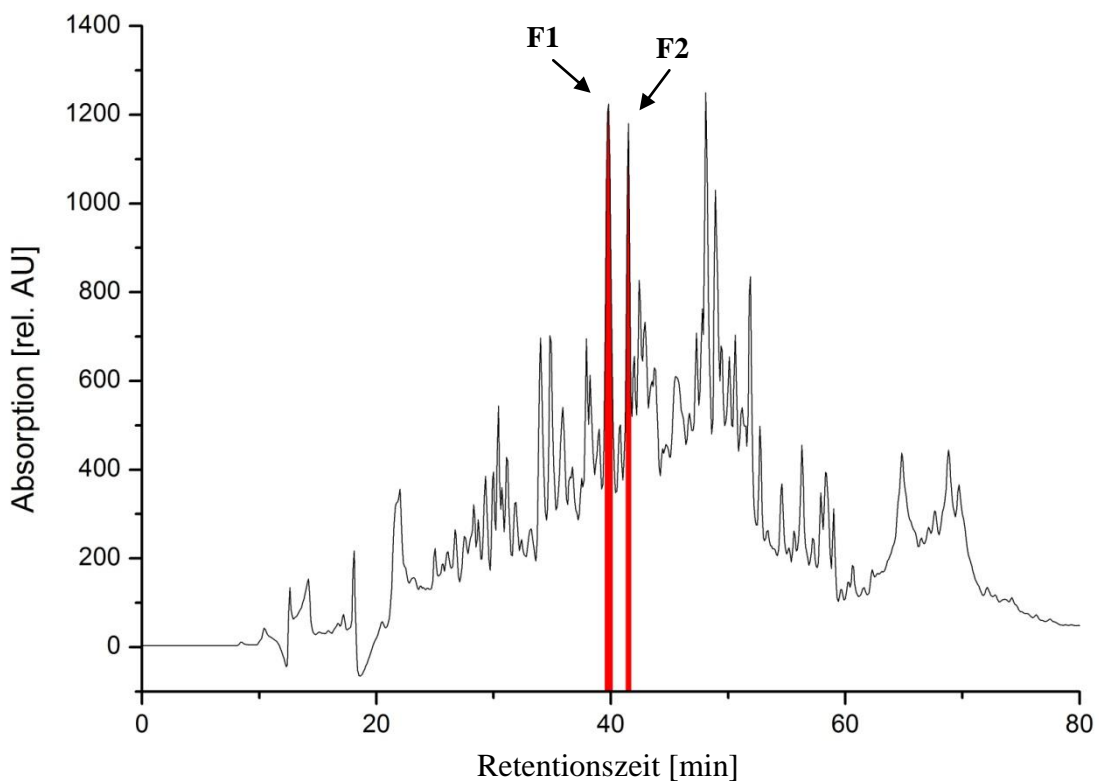


Abbildung 25: RP-HPLC-Diagramm, rot markiert die gesammelten Fraktionen.

Die gesammelten Fraktionen eluieren im mittleren Bereich des Peptidfingerprints. Es ist davon auszugehen, dass es sich bei den Fraktionen um Oligopeptide handelt. Wie jedoch bereits in der Theorie beschrieben (3.1.2) können auch Oligopeptide unverändert in den Körper aufgenommen werden. Zudem können diese durch weitere Hydrolyse im Magen-Darmtrakt eine physiologische Wirkung freisetzen [28].

Für die erste gesammelte Fraktion (F1) bei einer Retentionszeit von 40 min wurden zwei verschiedene Massen erhalten: 1.077 Da und 1.775 Da. Diese Massen wurden in allen Proben der gleichen Retentionszeit ermittelt. Der zweite Peak (F2) bei 41 min ergab nur einen einzigen Peak im Massenspektrometer. Die Masse lag bei 1.316 Da.

Mit Hilfe des Computerprogramms findpept lassen sich die durch eine Hydrolyse möglichen Peptidabschnitte ermitteln [77]. Mit dem Programm ist es allerdings nicht möglich einen Verdau mit verschiedenen Enzymen durchzuführen. Daher wurde für jedes Enzym nach den ermittelten Massen gesucht. Die Bedingungen wurden so gewählt, das nicht alle möglichen Schnittstellen von den Enzymen gespalten wurden. Dies ergibt ein größeres Spektrum an möglichen Peptidsequenzen. Zudem ist nicht sichergestellt, dass nach der Hydrolysezeit von 60 min pro Protease alle potentiellen Bindungsstellen gespalten wurden. Daher wurde dem Programm die Option für drei verpasste Schnittstellen gegeben.

Die mit dem Programm erhaltenen Massen und das zugehörige Enzym zur Generierung des Peptidabschnitts sind in Tabelle 28 dargestellt.

Tabelle 28: Ermittelte Aminosäuresequenzen der Fraktionen F1 und F2 über die im Massenspektrometer erhaltene Masse (Aminosäuresequenz im Ein Buchstabencode).

Ermittelte Masse (Da)	Fraktion	Aminosäuresequenz (Ein Buchstabencode)	Verpasste Schnittstellen	Enzym
1077	F 1	KLEEMVTVL	3	Pepsin
		FAKLLSDRK	2	Trypsin
1775	F 1	-	-	-
1316	F 2	FSSIKSLDYKQ	3	Pepsin
		SSIKSLDYKQM	2	α -Chymotrypsin
		EEALKRFAKLL	3	α -Chymotrypsin

Für die Masse von 1.775 Da wurde keine entsprechende Sequenz im Patatin gefunden, die mit einem der benutzten Enzyme hätte generiert werden können. Lediglich bei einer unspezifischen Spaltung konnten zwei Peptidfragmente aus der Patatinsequenz generiert werden, die diese Masse aufweisen. Dies liefert einen weiteren Hinweis auf eine Kontamination des Gesamthydrolysats mit Peptidfragmenten aus der Autohydrolyse der Enzyme.

4.3.3.5 Zusammenfassung: Enzym. Hydrolyse des Patatin

Die beiden Enzyme Pepsin und Papain konnten erfolgreich auf dem Trägermaterial Eupergit CM immobilisiert werden. Die Aktivität der Enzyme konnte qualitativ bestätigt werden. Die Hydrolyse von Patatin mit den immobilisierten Enzymen im Vergleich zu den nativen Enzymen zeigte zum Teil erhebliche Unterschiede. So konnte über den ORAC-Assay eine doppelt so hohe antioxidative Kapazität mit immobilisiertem Pepsin festgestellt werden, als mit nativem. Bei Papain war die antioxidative Kapazität beim immobilisierten Enzym um die Hälfte geringer, als beim nativen. Auch der Test auf ACE-hemmende Wirkung zeigte beim immobilisierten Papain eine fördernde Wirkung auf das ACE anstatt eine inhibierende, wie die anderen Hydrolysate. Die Untersuchungen der Patatinhydrolysate auf ihre antimikrobielle Wirksamkeit ergab wachstumshemmende Wirkung auf *E. coli K12*, jedoch konnte kein signifikanter Unterschied zwischen immobilisiertem und nativem Enzym festgestellt werden. Diese Ergebnisse zeigen deutlich, dass die Eigenhydrolysate der Enzyme einen Einfluss auf die Bioaktivität des Gesamthydrolysats haben. Um sicher zu gehen, dass die Peptide aus dem Patatinverdau stammen, sollte der Verdau ausschließlich mit immobilisierten Enzymen durchgeführt werden. Zudem sollten die verwendeten Enzyme nach ihrer Eigenhydrolyse auf Bioaktivität untersucht werden, um diese Theorie zusätzlich zu bestätigen.

Die Hydrolyse des Patatin mit den Enzymen Trypsin und α -Chymotrypsin konnte nach vorangegangener saurer Hydrolyse mit Pepsin realisiert werden. Die Untersuchungen auf antioxidative- und ACE-hemmende Eigenschaften zeigten, dass das Hydrolysat aus Pepsin/ α -Chymotrypsin/Trypsin mit dem höchsten Hydrolysegrad auch die höchste Bioaktivität aufweist. Über die präparative RP-HPLC konnten zwei Peaks aus dem Pepsin/ α -Chymotrypsin/Trypsin-Hydrolysat aufgereinigt werden, die anschließend im Massenspektrometer Maldi MS TOF analysiert wurden. Die ermittelten Massen konnten mithilfe eines Bioinformatikprogramms theoretischen Aminosäuresequenzen aus dem Patatin zugeordnet werden. Eine der ermittelten Massen konnte mit keinem der zur Hydrolyse verwendeten Enzyme dargestellt werden. Es ist davon auszugehen, dass diese Aminosäuresequenz aus der Hydrolyse eines der Enzyme stammt, da diese nicht immobilisiert waren.

5. Fazit und Ausblick

In der heutigen Zeit wird es immer bedeutender ressourcensparend zu produzieren. In einer Zeit des Recycling und des zunehmend umweltbewussten Denkens ist es daher wichtig, industrielle Nebenstromprodukte zu nutzen, um sie einer weiteren Verwendung zuzuführen. Dieser ökologische Aspekt ist jedoch in unserer kommerziell geprägten Welt nicht genug. Für die Wirtschaft ist der ökonomische Gesichtspunkt ein entscheidender Faktor. Kartoffelbruchwasser (KFW) als industrielles Nebenstromprodukt könnte durch die enthaltenen wertvollen Proteine ein solch hochpreisiges und aufgewertetes Nebenstromprodukt werden. Die Aufreinigung der Proteine aus dem KFW in einem Schritt mittels Membranadsorbertechnologie ermöglicht eine schnelle und kostengünstige Methode zur Gewinnung. Ziel dieser Arbeit war die Optimierung einer Proteingewinnungsanlage aus KFW hinsichtlich einer Prozessierung der Proteine im Tandemmodus. Dabei wurde die Langzeitstabilität der verwendeten MA-Module sowie eine Rückführung der Elutions- und Regenerationslösungen um Verbrauchsmaterialien und Abwasser einzusparen und die Proteinlösung aufzukonzentrieren getestet.

Die Raum-Zeit-Ausbeute der Proteingewinnungsanlage konnte mit dem Umbau auf eine über vier Membranadsorbermodule laufende Anlage verbessert werden. Pro Stunde können im Schnitt 6 g Patatin und 7,2 g PI gewonnen werden (zuvor 6,2 g/h Patatin und 3 g/h PI). Stabilitätstests mit kleineren Modulen zeigten, dass eine Reinigung der Module erst nach 23 Durchläufen anstatt vier erfolgen muss. Die Etablierung der Mehrfachnutzung der Elutionslösung brachte gleich zwei Vorteile mit sich. Zum Einen wurden die Proteine aufkonzentriert, zum Anderen konnten Chemikalien eingespart werden. Die Kosten der Verbrauchskemikalien für 1 kg Patatin reduzieren sich durch den Umbau von 8.105 € auf 4.625 €, die Kosten für 1 kg Proteaseinhibitoren von 6.754 € auf 3.854 € gegenüber der vorherigen Proteingewinnungsanlage.

Die isolierten Proteine haben zum Beispiel die Möglichkeit durch ihre hohe Biologische Wertigkeit von 76 (Vollei als Referenz) als zusätzliche und vegane Proteinquelle in Nahrungs- und Nahrungsergänzungsmitteln eingesetzt zu werden. Zudem wird auf dem US-amerikanischen Markt in Appetitzügler unter dem Namen Slendesta[®] vertrieben. Als Wirkbestandteil ist der aus der Kartoffel isolierte Proteaseinhibitor II enthalten. Daher wurden die in dieser Arbeit aufgereinigten Proteine auch in einer

cross-over-Humanstudie getestet, um eine eventuelle Auswirkung auf das Sättigungsempfinden oder das Hungergefühl festzustellen. Der Proteaseinhibitor II ist mit einem Anteil von 22 % im KFW enthalten. Aufgrund seines pI von pH 5,5-6,9 könnte er bei der Aufreinigung bei pH 7 sowohl über die Kationen- als auch über die Anionenaustauschermembran aufgereinigt worden sein. Beide Proteinfractionen wurden in der Humanernährungsstudie getestet, ergaben jedoch keine signifikanten Hinweise auf eine sättigende Wirkung.

Zur Erweiterung der Wertschöpfungskette wurden aus den Proteinfractionen durch enzymatische Hydrolyse bioaktiver Peptidabschnitte generiert. Sowohl aus den Proteaseinhibitoren, als auch aus Patatin konnten mit den ausgewählten Proteasen Hydrolysate erzeugt werden. Die Proteaseinhibitoren wurden vor der Hydrolyse hitzeinaktiviert oder wurden zuerst einer sauren Hydrolyse bei pH 2 unterzogen. Bei der anschließenden Untersuchung der PI-Hydrolysate auf bioaktive Eigenschaften zeigte sich, dass zwei der Hydrolysate (Pepsin/ α -Chymotrypsin und Papain) eine 25 bzw. 10 mal so hohe antioxidative Kapazität gegenüber den reinen PI über den TEAC-Assay aufweisen. Eine ACE-hemmende Wirkung konnte beim Verdau mit Pepsin und Bromelain festgestellt werden. Da jedoch lediglich ein in-vitro Test durchgeführt wurde, kann über die tatsächliche blutdrucksenkende Wirkung nur spekuliert werden. Ein in vivo Test würde Aufschluss über die tatsächliche blutdrucksenkende Wirkung liefern, da es Hinweise auf eine Relativierung der ACE-Werte in vivo gibt [86].

Mit Hilfe von immobilisierten Enzymen konnten Hinweise darauf gefunden werden, dass einige der bioaktiven Eigenschaften der Hydrolysate nicht auf Peptidfragmente des Patatin, sondern auf Peptidabschnitte der Autohydrolyse der Enzyme zurückzuführen sind. So zeigte zum Beispiel ein mit immobilisiertem Papain hergestelltes Hydrolysat in ersten Tests eine fördernde Wirkung auf das Angiotensin Converting Enzyme, während das mit nativem Enzym dargestellte Hydrolysat eine leicht inhibierende Wirkung aufwies.

Die Hydrolysate der humanen Gastrointestinalenzyme Pepsin, α -Chymotrypsin und Typsin zeigten antioxidative sowie ACE-hemmende Eigenschaften. Jedoch waren die Enzyme während der Hydrolyse nicht immobilisiert und eine eindeutige Zuordnung der bioaktiven Peptide zu Patatin damit nicht möglich. Aus zwei aufgereinigten Fraktionen dieses Hydrolysats konnten über ein Massenspektrometer drei verschiedene Massen ermittelt werden, von denen nur zwei als Peptidabschnitte aus dem Patatin identifiziert werden konnten. So gab es auch hier indirekt Hinweise darauf, dass eine

Immobilisierung der Enzyme unerlässlich ist, um die gewonnenen Peptidabschnitte eindeutig dem hydrolysierten Protein aus dem KFW zuzuordnen. Um sicher zu gehen, dass alle bioaktiven Peptidabschnitte aus den Kartoffelproteinen stammen, sollten umfangreiche Versuche mit immobilisierten Enzymen durchgeführt werden. Eine Isolierung einzelner Peptidabschnitte ist nur nach vorangegangener Analyse der Gesamthydrolysate sinnvoll, wenn diese eine ausgeprägte Bioaktivität aufweisen. Die inhibierende Wirkung einzelner Peptidabschnitte auf das Angiotensin Converting Enzyme sollte anschließend *in vivo* getestet werden, um die Aufnahme- und Abbaukinetik genauer zu prüfen.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich die Wertschöpfungskette zur Gewinnung bioaktiver Proteine und Peptide aus KFW immer weiter optimieren lässt. Ein Einsatz der gewonnenen Proteine in Lebensmitteln ist als zusätzliche Proteinquelle in Sportler- und Babynahrung denkbar. Die Proteinhydrolysate, die über zusätzliche bioaktive Eigenschaften verfügen, könnten nach erfolgreichen *in vivo* Tests in Funktional Food Produkten eingesetzt werden.

6. Anhang

6.1 Material

6.1.1 Geräteliste

Autoklav	System V-150 (System GmbH, Wettenberg/Deutschland)
Crossflow-Filtrationsanlage	Sartocon jet Pumpe, Sartocon-Slice Kassettenmodule Hydrosart 10kDa, 0,1 m ² Membranfläche, (Sartorius AG, Göttingen/Deutschland)
Fluoreszenz-Spektrophotometer	Fluoroskan Ascent (Thermo LabSystems, Vantaa, Finnland), Software Ascent
Gefriertrocknung	Christ ALPHA 1-4 LSC, Pumpe Vacubrand 6 (Christ GmbH, Osterode am Harz/Deutschland)
Gelelektrophorese:	MiniProtean® Tetracell; PowerPac Basic (BIO-RAD Laboratories GmbH, München/Deutschland)
Heizschrank	Modell 200 (Mettler, Schwabach/Deutschland)
Küvetten-Spektrophotometer	Cary50 (Varian GmbH, Darmstadt/Deutschland)
Leitfähigkeitsmessgerät	WTW, Cond 315i
MALDI-TOF-MS	Micromass M@ldi (Waters GmbH, Eschborn/Deutschland)
Microplate-Spektrophotometer	Multiskan Spectrum, Software SkanIt, (Thermo Scientific, Waltham/USA)
pH-Meter	HI 221 Calibration Check Microprocessor pH Meter (Hanna Instruments, Kehl am Rhein/Deutschland)

Präparative RP-HPLC	Säule: Jupiter® Proteo 90 Å, 10 µm, 250 x 30 mm (Phenomenex, Torrance/USA) Autosampler: FamosAS (LC Packings) Pumpe: L-6200 (Merck- Hitachi, Berkshire/ Großbritannien) Detektor: UV-Vis 201 Asorbance Detector (Linear) Fraktionssammler: SF-2120 Super Fraction Collector (Advantec MFS Inc., Dublin/USA) Software: Clarity
RP-HPLC	Säule: Jupiter® Proteo 90 Å, 4 µm, 250 x 4,6 mm (Phenomenex, Torrance/USA), C ₁₈ Resolve 5 µm, 150 x 3.9 mm (Waters GmbH, Eschborn/Deutschland) Autosampler: L-7200 (Merck- Hitachi, Berkshire/ Großbritannien) Pumpe: L-7100 (Merck- Hitachi, Berkshire/ Großbritannien) Vakuumdegaser TS 7505 (Sykam GmbH, Gilching/Deutschland) UV/VIS-Detektor S-3702 (Soma Optics LTD, Tokyo/Japan) Fluoreszenz-Detektor RF-10AXL (Shimadzu GmbH, Duisburg/Deutschland) DAD-Detektor: L-7455 (Merck- Hitachi, Berkshire/ Großbritannien) Säulenofen: L-7350 (Merck- Hitachi, Berkshire/ Großbritannien) Collector (Advantec MFS Inc., Dublin/USA) Software: Clarity
Reinstwasseranlage	Arium 611 uf uv (Sartorius AG, Göttingen/Deutschland)
Sartobind Direct-Capture-Wickelmodule	Q- und S-Ionenaustauscher, (Sartorius Stedim Biotech, Göttingen/Deutschland)
SEC-FPLC	BioLogic DuoFlow, BioLogic BioFrac Fraction Collector, Auto-Injection Valve AVR 7-3 (alle BIO-RAD Laboratories, München), Linear Uvis-20I Absorbance

	Detector und Omnifit-Säule (ID: 1,5 cm, Sigma-Aldrich GmbH, Buchs/Schweiz)
Sprühtrockner	B-191 Mini-Spray-Dryer (Büchi GmbH, Essen/Deutschland)
Sterilfilter-Spritzenaufsätze	Porengröße 0,2 µm, 0,8 µm (Sartorius Stedim Biotech, Göttingen/Deutschland)
Thermomixer:	Thermomixer compact (Eppendorf, Hamburg/Deutschland)
Titrationautomat	DL-50 Graphix Software LabX Titration (Mettler-Toledo, Giessen/Deutschland)
Überkopfschüttler	BIOSAN Rotator Multi RS-24 (BIOSAN, Riga, Lettland)
Wasserbad mit Pumpe	M3 (MGW Lauda, Baden/Deutschland)
Zellkultur-Brutschrank	Certomat® HK (B. Braun Biotech International, Melsungen/Deutschland)
Zentrifugen	Centrifuge 5415 R (Eppendorf, Hamburg/Deutschland), Centrifuge 5702 (Eppendorf, Hamburg/Deutschland), Pico (Thermo scientific, Waltham/USA) Megafuge 1.0 RS (Heraeus Instruments GmbH, Osterode/Deutschland)
Zip Tip®	C ₁₈ Pipette Tips for sample preparation (Millipore Corporation, Billerica, MA, USA)

6.1.2 Chemikalienliste

Acetonitril HPLC grade (Fluka GmbH, Buchs/Schweiz)
Acrylamid, p.a. (GE Healthcare, Chalfont St Giles/Großbritannien)
Angiotensin-Converting-Enzyme, rabbit lung (Sigma-Aldrich GmbH, Buchs/Schweiz)
2,2'-Azobis-(2-Methylpropionamidin) (Sigma-Aldrich GmbH, Buchs/Schweiz)
Bisacrylamid, p.a. (GE Healthcare, Chalfont St Giles/Großbritannien)
Borsäure (Sigma-Aldrich GmbH, Buchs/Schweiz)
Bovines Serumalbumin (Sigma-Aldrich GmbH, Buchs/Schweiz)
Bromelain from pineapple stem (Applichem, Darmstadt/Deutschland)

Caseinhydrolysat (Sigma-Aldrich GmbH, Buchs/Schweiz)
Calciumchlorid Dihydrat (Sigma-Aldrich GmbH, Buchs/Schweiz)
 α -Chymotrypsin, bovin Pankreas Typ II, 40 U (Sigma-Aldrich GmbH, Buchs/Schweiz)
L-Cystein (Merck KGaA, Darmstadt)
Dikaliumhydrogenphosphat K_2HPO_4 (Sigma-Aldrich GmbH, Buchs/Schweiz)
N,N-Dimethyl-1,4-phenylendiamin, DMPD (Sigma-Aldrich GmbH, Buchs/Schweiz)
Dinatriumhydrogenphosphat Na_2HPO_4 (Riedel de Haën, Seelze)
E. Coli Top 10 (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot)
Eisen(III)-chlorid (Fluka GmbH, Buchs/Schweiz)
Essigsäure, p.a. (Fluka GmbH, Buchs/Schweiz)
Ethylendiamintetraessigsäure, EDTA, 98 % (Fluka GmbH, Buchs/Schweiz)
Ethanol (Merck KGaA, Darmstadt)
Fleischextrakt, Rindfleischinfusion (Difco Laboratories GmbH, Augsburg)
Formaldehyd p.a. (Fluka GmbH, Buchs/Schweiz)
Fluorescein, Natriumsalz (Sigma-Aldrich GmbH, Buchs/Schweiz)
Glycerin (Fluka GmbH, Buchs/Schweiz)
Glycin (Sigma-Aldrich GmbH, Buchs/Schweiz)
Harnstoff (Sigma-Aldrich GmbH, Buchs/Schweiz)
Hämoglobin from bovine blood (Sigma-Aldrich GmbH, Buchs/Schweiz)
Hefeextrakt (Fluka GmbH, Buchs/Schweiz)
Hippuryl-histidyl-leucin Hydrat, HHL (Sigma-Aldrich GmbH, Buchs/Schweiz)
Kaliumdihydrogenphosphat KH_2PO_4 (Merck KGaA, Darmstadt)
Kaliumhexacyanoferrat(III) (Carl Roth GmbH, Karlsruhe)
Kaliumphosphat (Fluka GmbH, Buchs/Schweiz)
2-Mercaptoethanol, p.a. (Fluka GmbH, Buchs/Schweiz)
Modified Lowry Protein Test Kit (Pierce Thermo Fisher Scientific, Bonn)
Natriumacetat Trihydrat (Riedel de Haën, Seelze)
Natriumborat (Merck KGaA, Darmstadt)
Natriumcarbonat p.a. (Fluka GmbH, Buchs/Schweiz)
Natriumchlorid (VWR International GmbH, Darmstadt)
Natriumdihydrogenphosphat NaH_2PO_4 (Fluka GmbH, Buchs/Schweiz)
Natriumdisulfit, p.a. (Sigma-Aldrich GmbH, Buchs/Schweiz)
Natriumdodekylsulfat, SDS, p.a. (Fluka GmbH, Buchs/Schweiz)
Natriumhydrogencarbonat (Fluka GmbH, Buchs/Schweiz)
Natriumhydroxid Micropills (Riedel-de-Haën, Seelze)

Natriumthiosulfat p.a. (Fluka GmbH, Buchs/Schweiz)
Ortho-Phthaldiamid (Sigma-Aldrich GmbH, Buchs/Schweiz)
p-Nitrophenylcaprat, syn. p-Nitrophenyldecanoat (Sigma-Aldrich GmbH, Buchs/Schweiz)
Papain 3U (Fluka GmbH, Buchs/Schweiz)
Pepsin 3500U (Sigma-Aldrich GmbH, Buchs/Schweiz)
PageRuler™ Unstained Protein Ladder (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot)
Pyrogallol (Sigma-Aldrich GmbH, Buchs/Schweiz)
Rotiphorese® Gel 40 (37, 5:1) (Carl Roth GmbH, Karlsruhe)
Salzsäure (Fluka GmbH, Buchs/Schweiz)
Silbernitrat (Carl Roth GmbH, Karlsruhe)
Tetramethylethyldiamin, TEMED (Carl Roth GmbH, Karlsruhe)
N α -p-Tosyl-L-Arginin-Methylester, TAME (Sigma-Aldrich GmbH, Buchs/Schweiz)
Tricin (Sigma-Aldrich GmbH, Buchs/Schweiz)
Trifluoressigsäure TFA (Sigma-Aldrich GmbH, Buchs/Schweiz)
Tris-Base (Fluka GmbH, Buchs/Schweiz)
Tris-HCl (Fluka GmbH, Buchs/Schweiz)
Triton X-100 (Sigma-Aldrich GmbH, Buchs/Schweiz)
Trizma® pre-set crystals, pH 8,0, pH 8,3 (Sigma-Aldrich GmbH, Buchs/Schweiz)
Trolox, 97 % (Sigma-Aldrich GmbH, Buchs/Schweiz)
Trypton (Sigma-Aldrich GmbH, Buchs/Schweiz)
Trypsin aus Rinderpankreas, 14923 U (Fluka GmbH, Buchs/Schweiz)
Trypsininhibitor, Kunitz-Inhibitor, Sojabohne (Fluka GmbH, Buchs/Schweiz)

6.2 Downstream-Methoden

6.2.1 Fraktionierung der Kartoffelproteine

Die Technikumsanlage wurde vor jeder Fraktionierung mit VE-Wasser gespült. Im Anschluss daran wurden die Membranadsorbermodule in die Anlage integriert und mit Natriumphosphat Puffer (NaPP-Lösung) gewaschen. Nach beendeter Prozessierung wurde die Anlage incl. Der Membranadsorbermodule mit 0,1 M NaOH gereinigt. Zur Einlagerung wurden die Module nach der Reinigung in 1 M NaCl-Lösung in 20 % Ethanol gelagert.

Tandembetrieb 4 Module

Pro Zyklus wurde 1 L Kartoffelfruchtwasser (KFW) der Emsland-Stärke GmbH mit 5 g Natriumdisulfit versetzt und mit VE-Wasser auf 5 L verdünnt. Das verdünnte KFW wurde im Vorratsbehälter gegeben und die automatisierte Anlage mit folgenden Zyklusschritten und Abbruchbedingungen durchgeführt (15-25 Liter in der Vorlage):

Tabelle 29: Übersicht über die verschiedenen Zyklusschritte und Abbruchbedingungen der Fraktionierungsanlage

Zyklusschritt		Abbruchbedingungen/Parameter
Rechter Strang	Linker Strang	
Beladen S- & Q-MA	Waschen S- & Q-MA	UV<0.2; min. 10 s
Beladen S- & Q-MA	Verwerfen Q-MA	UV>0.2; min. 2 s
Beladen S- & Q-MA	Eluieren Q-MA	UV<0.5 and LF>12; min. 30 s
Beladen S- & Q-MA	Verwerfen S-MA	UV>0.2; min. 2 s
Beladen S- & Q-MA	Eluieren S-MA	UV<0.5 and LF>12; min. 30 s
Beladen S- & Q-MA	Regenerieren S- & Q-MA	UV<0.2 and LF>18; min. 30 s
Beladen S- & Q-MA	Equilibrieren Q-MA	LF<5; min. 30 s
Waschen S- & Q-MA	Beladen S- & Q-MA	UV<0.2; min. 10 s
Verwerfen Q-MA	Beladen S- & Q-MA	UV>0.2; min. 2 s
Eluieren Q-MA	Beladen S- & Q-MA	UV<0.5 and LF>12; min. 30 s
Verwerfen S-MA	Beladen S- & Q-MA	UV>0.2; min. 2 s
Eluieren S-MA	Beladen S- & Q-MA	UV<0.5 and LF>12; min. 30 s
Regenerieren S- & Q-MA	Beladen S- & Q-MA	UV<0.2 and LF>18; min. 30 s
Equilibrieren Q-MA	Beladen S- & Q-MA	LF<5; min. 30 s

6.2.2 Crossflow-Ultra-/Diafiltration

Die Crossflowfiltration wurde mittels Sartobind Hydrosart Membranfiltrationskassetten mit einem Größenausschluss von 10 kDa durchgeführt. Damit werden kleinere Bestandteile wie Salze von der Lösung getrennt. Das ursprüngliche Volumen wurde auf 1 L reduziert und die Proteine damit aufkonzentriert. Der Eingangsdruck betrug 2,8 bar bei einem konstanten Flux von 60 L/(m²·h). Die Filtration wurde bei einem Leitfähigkeitswert unter 0,5 mS/cm beendet.

6.2.3 Sprühtrocknung

Die Konfektionierung der Proteine über Sprühtrocknung wurde mit Hilfe eines Büchi Mini-Spray-Dryer vorgenommen. Die Eingangstemperatur betrug 80 °C, die Aspiratorleistung 100 %, der Sprühflow 400 L/h und die Pumpenleistung lag bei 20 %.

6.2.4 Gefriertrocknung

Die Hydrolyseprodukte (Abschnitt 4.3) wurden in 50 mL Reaktionsgefäße überführt und 20 min bei 4400 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und bei -80 °C über Nacht eingefroren. Die Reaktionsgefäße mit den gefrorenen Proben wurden anschließend mit gelochten Verschlüssen für 72 Stunden in den Gefriertrocknungsautomaten gegeben. Die Stellfläche wurde auf 10 °C temperiert, die Kondensationseinheit auf -60 °C. Desweiteren wurde ein Vakuum von 0,06 mbar angelegt. Nach Ende der Trocknung wurden die Proben bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

6.2.5 Aufbau der FPLC-Anlage zur Proteinaufreinigung

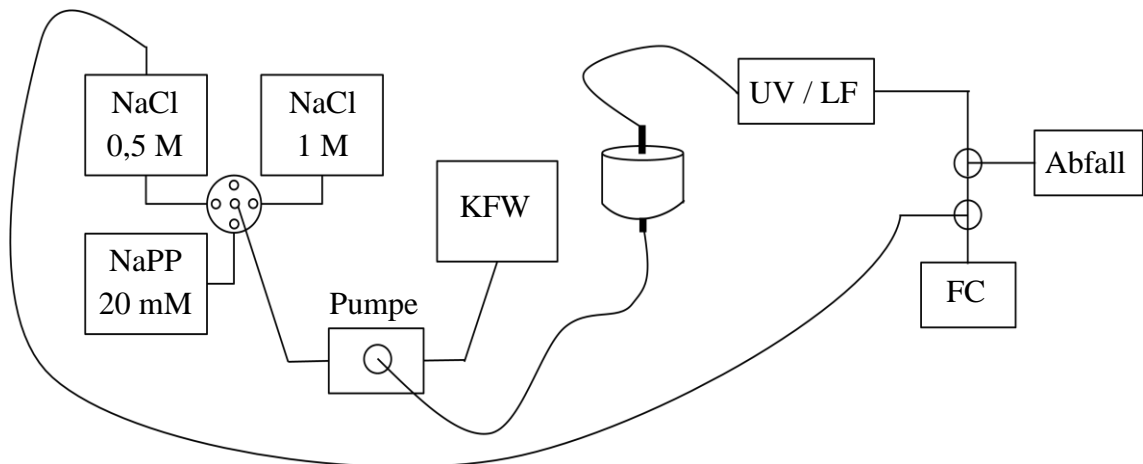


Abbildung 26: Aufbau der FPLC-Anlage zur Aufreinigung der PI und Patatin aus KFW.

Die Pufferlösungen oder das KFW werden mit Hilfe der Pumpe über die Membran geleitet. Nach der Membran passiert die Lösung den UV- und Leitfähigkeitssensor (LF). Abschließend wird die Lösung entweder in den Abfall gegeben (NaPP 20 mM, NaCl 1 M, KFW), mit dem Fraktionssammler (FC) aufgefangen (NaCl 0,5 M, Langzeitstabilität) oder in den Vorlagebehälter der Elutionslösung zurückgeleitet (NaCl 0,5 M, Elutionsrückfluss)

6.2.6 Elutionsrückfluss der Q-Membran

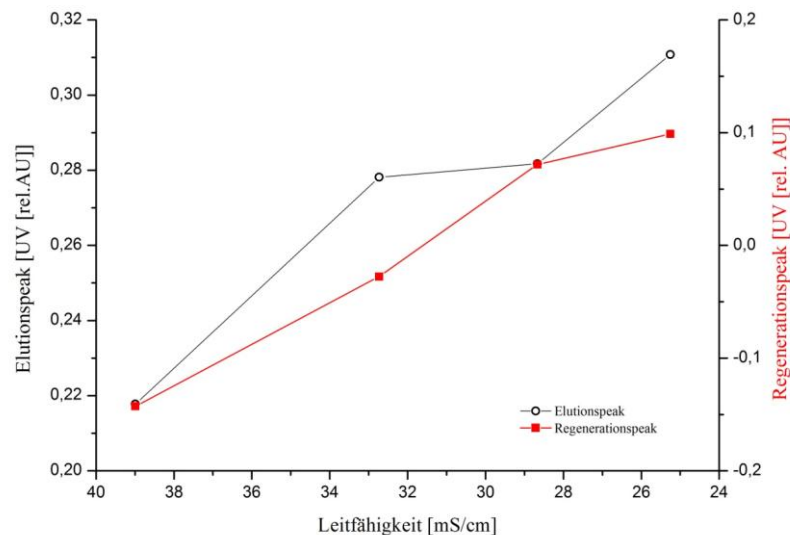


Abbildung 27: FPLC-Daten der Membranelution über vier Durchläufe.

Die Abbildung 27 zeigt den Elutionsrückfluss der Q-Membran zur Gewinnung von Patatin. Zu sehen ist, dass bereits nach 4 Durchläufen die Leitfähigkeit auf ca. 24 mS/cm gesunken ist. Wie bei der S-Membran ist hier davon auszugehen, dass die Proteine nur noch ungenügend von der Membran gelöst werden.

6.2.7 Preistabelle der Komponenten zur Proteinpulverherstellung

Preise der einzelnen Komponenten zur Produktion von Proteinpulver aus KFW.

NaCl	1 kg:	18,62 €
Na ₂ HPO ₄	1 kg:	44,80 €
NaH ₂ PO ₄	1 kg:	36,24 €
NaOH	1 kg:	19,58 €
Abwasser	/m ³ :	2,20 €
VE-Wasser	/m ³ :	3,35 €

6.2.8 Nomenklatur der Aminosäuren

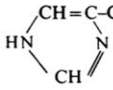
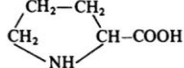
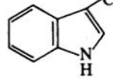
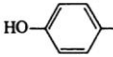
Trivial name ^a	Symbol	One-letter symbol ^b	Systematic name ^c	Formula
Alanine	Ala	A	2-Aminopropanoic acid	CH ₃ -CH(NH ₂)-COOH
Arginine	Arg	R	2-Amino-5-guanidinopentanoic acid	H ₂ N-C(=NH)-NH-(CH ₂) ₃ -CH(NH ₂)-COOH
Asparagine	Asn ^d	N ^d	2-Amino-3-carbamoylpropanoic acid	H ₂ N-CO-CH ₂ -CH(NH ₂)-COOH
Aspartic acid	Asp ^d	D ^d	2-Aminobutanedioic acid	HOOC-CH ₂ -CH(NH ₂)-COOH
Cysteine	Cys	C	2-Amino-3-mercaptopropanoic acid	HS-CH ₂ -CH(NH ₂)-COOH
Glutamine	Gln ^d	Q ^d	2-Amino-4-carbamoylbutanoic acid	H ₂ N-CO-(CH ₂) ₂ -CH(NH ₂)-COOH
Glutamic acid	Glu ^d	E ^d	2-Aminopentanedioic acid	HOOC-(CH ₂) ₂ -CH(NH ₂)-COOH
Glycine	Gly	G	Aminoethanoic acid	CH ₂ (NH ₂)-COOH
Histidine	His	H	2-Amino-3-(1 <i>H</i> -imidazol-4-yl)propanoic acid	 <chem>C1=CN=CN=C1</chem>
Isoleucine	Ile	I	2-Amino-3-methylpentanoic acid ^e	C ₂ H ₅ -CH(CH ₃)-CH(NH ₂)-COOH
Leucine	Leu	L	2-Amino-4-methylpentanoic acid	(CH ₃) ₂ CH-CH ₂ -CH(NH ₂)-COOH
Lysine	Lys	K	2,6-Diaminohexanoic acid	H ₂ N-(CH ₂) ₄ -CH(NH ₂)-COOH
Methionine	Met	M	2-Amino-4-(methylthio)butanoic acid	CH ₃ -S-(CH ₂) ₂ -CH(NH ₂)-COOH
Phenylalanine	Phe	F	2-Amino-3-phenylpropanoic acid	C ₆ H ₅ -CH ₂ -CH(NH ₂)-COOH
Proline	Pro	P	Pyrrolidine-2-carboxylic acid	 <chem>C1CCNC1C(=O)O</chem>
Serine	Ser	S	2-Amino-3-hydroxypropanoic acid	HO-CH ₂ -CH(NH ₂)-COOH
Threonine	Thr	T	2-Amino-3-hydroxybutanoic acid ^e	CH ₃ -CH(OH)-CH(NH ₂)-COOH
Tryptophan	Trp	W	2-Amino-3-(1 <i>H</i> -indol-3-yl)propanoic acid	 <chem>C1=CC=C2C(=C1)C=CN2</chem>
Tyrosine	Tyr	Y	2-Amino-3-(4-hydroxyphenyl)propanoic acid	 <chem>Oc1ccc(cc1)CC(N)C(=O)O</chem>
Valine	Val	V	2-Amino-3-methylbutanoic acid	(CH ₃) ₂ CH-CH(NH ₂)-COOH
▲ Unspecified amino acid	Xaa	X		

Abbildung 28: Aminosäuren mit Drei- und Einbuchstabencode, systematischem Namen und Summenformel [96].

6.3 RP-HPLC-Methodik

6.3.1 Methodenentwicklung präparative RP-HPLC

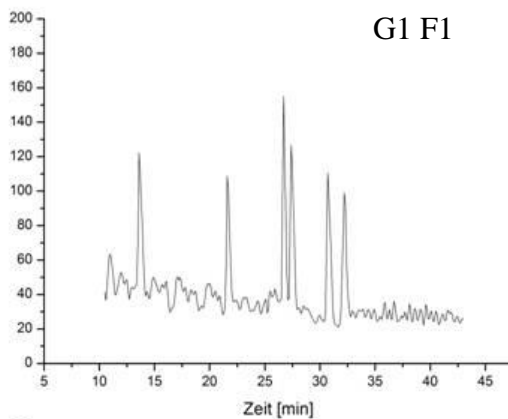
Variation der Gradientenrate und der Flussrate

Einfluss der Gradientenraten des Eluenten B bei konstanter Flussrate F1 von 9 ml/min.

1,0 % B/min.....G1

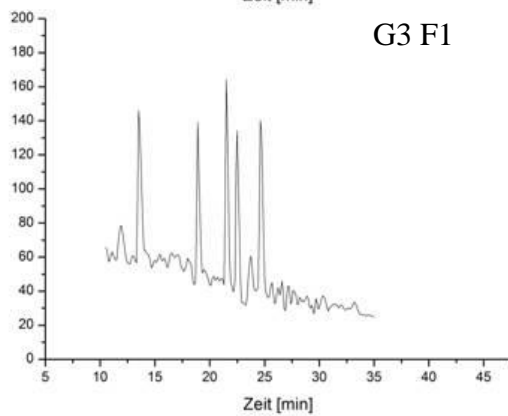
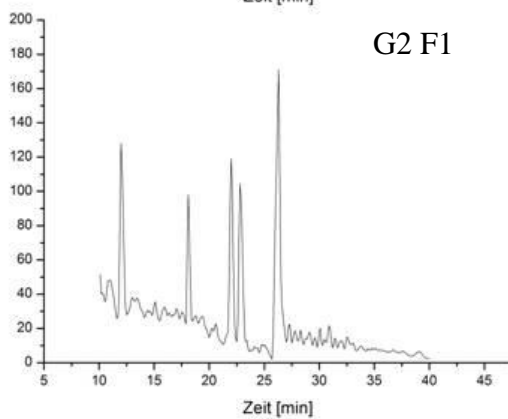
1,3 % B/min.....G2

1,5 % B/min.....G3

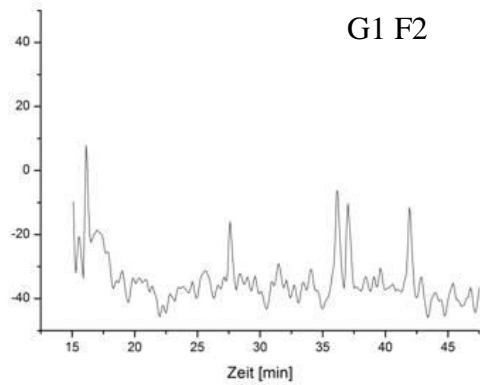


- Erhöhte Basislinienabsorption bei steigendem Anteil an Eluent B.

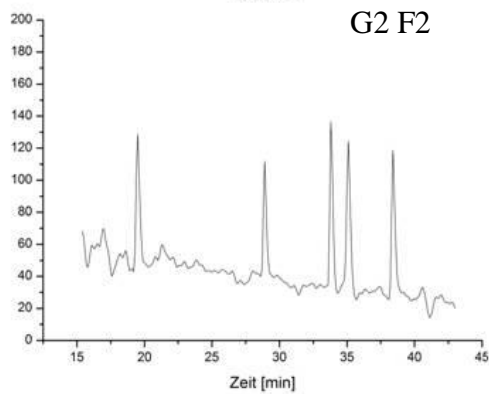
- Stark unruhige Basislinie bei allen drei Gradientenraten.



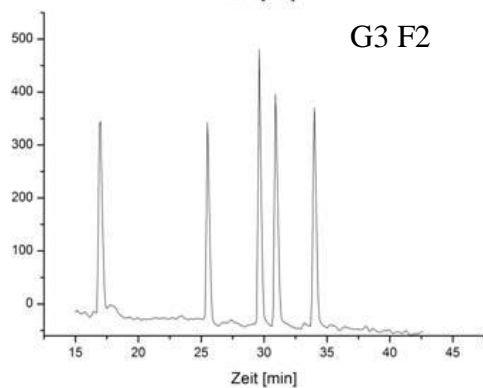
Einfluss der Gradientenraten des Eluenten B bei konstanter Flussrate F2 von 6 ml/min.



- Erhöhung der Retentionszeit durch sinkende Flussrate
- Ruhigere Basislinienabsorption mit sinkender Flußrate



- Bessere Basislinientrennung und steigende Peakhöhe bei steigendem Anteil B



Flussrate F2 (6 mL/min) mit einem Gradienten von 1,5 % B/min bietet den besten Kompromiss aus Trennzeit, guter Auflösung und minimalem Eluentenverbrauch.

6.3.2 RP-HPLC-OPA-Aminosäureanalytik

Zur Fällung der Proteine wurden 200 µL Probe mit 800 µL kaltem Methanol versetzt und für 4 Tage in den Gefrierschrank gestellt. Der Niederschlag wurde abzentrifugiert. Der Überstand wurde mit 0,4 M Boratpuffer, pH 9,5 eins zu eins verdünnt. 30 µL dieser Lösung wurden in Vials vorgelegt. Die Zugabe von 50 µL OPA sowie die Probenaufgabe erfolgten mittels eines Autosamplers in der RP-HPLC. Das Gradientenprogramm ist in Tabelle 30 dargestellt.

OPA Reagenz:

270 mg Ortho-Phthaldialdehyd (OPA) in 5 mL Ethanol (EtOH) lösen, 200 µL Mercaptoethanol (MCE) zufügen und mit 0,4 M Boratpuffer, pH 9,5 auf 50 mL auffüllen und die Lösung für 24 h altern lassen.

Säule: Waters Resolve C₁₈ 5 µm, 3,9 x 150 mm

Temperatur: 30 °C

Eluenten: A: 13,6 g (0,05 M) Natriumacetat Trihydrat, 12,0 g (0,05 M) Natriumdihydrogen-phosphat in ca.2 L deion. H₂O lösen, mit 10 M NaOH auf pH 7 einstellen. Auf 2 L auffüllen, filtrieren, 42 mL Tetrahydrofuran (THF) und 42 mL Methanol (MeOH) zugeben.

B: 920 mL H₂O (46 %) in 1080 mL MeOH (54 %).

Detektion: Fluoreszenz Ex 330 Em 420

Injektionsvolumen: 10 µL

Tabelle 30: Gradientenprogramm des OPA Aminosäureassay.

Zeit (min)	A (%)	B (%)	Flussrate (mL/min)
0	100	0	1
50	0	100	1
55	0	100	1
60	100	0	1
67	100	0	1

Die Bestimmung des Aminosäuregehalts erfolgte mit Hilfe eines Aminosäurenstandards (0,01 mg/mL) über die Differenz der Peakflächen.

6.3.3 OPA-Assay

Für die Reaktionslösung (10 mM Natriumteraborat-Dekahydrat, 6 mM o-Phtaldialdehyd, 3,5 mM SDS, 5,7 mM DTT) werden 1,905 g Natriumteraborat-Dekahydrat und 50 mg SDS im 40 mL deionisiertem Wasser gelöst und mit 1 mL einer 0,3 M o-Phtaldialdehydlösung (in Ethanol) versetzt. Anschließend werden 285 μ L DTT Lösung (1 M) zugegeben und mit deionisiertem Wasser auf 50 mL aufgefüllt.

Vor jeder Versuchsreihe wird als Standard eine L-Serin-Stammlösung (100 mg/L) frisch angesetzt. Für die Messung werden je 30 μ L Probe, Serin-Stammlösung bzw. Nullprobe in eine Mikrotiterplatte pipettiert und mit 225 μ L Reaktionslösung exakt 2 min inkubiert. Die Auswertung erfolgt mit einem Multiscan-Platereader-Spektrophotometer bei einer Wellenlänge von 340 nm. Alle Analysen werden in Dreifachbestimmung durchgeführt.

Um den Hydrolysegrad (DH) zu bestimmen, müssen zunächst die Milliäquivalente Serin-NH₂ pro Gramm Protein berechnet werden:

$$\text{Serin} - \text{NH}_2 = \frac{\text{Absorption}_{\text{Probe}} - \text{Absorption}_{\text{Nullprobe}}}{\text{Absorption}_{\text{Standard}} - \text{Absorption}_{\text{Nullprobe}}} \cdot \frac{0,9516 \frac{\text{meqv}}{\text{L}} \cdot 100}{X \cdot P}$$

Hier entspricht X der eingesetzten Probenkonzentration in g/L und P dem Proteingehalt der Probe in Prozent. Es lässt sich h berechnen:

$$h = \frac{\text{Serin} - \text{NH}_2 - \beta}{\alpha} \left[\frac{\text{meqv}}{\text{g/Protein}} \right]$$

Bei α und β handelte es sich um spezifische Proteinkonstanten. Da für das untersuchte Gemisch aus Proteaseinhibitoren keine Literaturwerte vorhanden sind, können in Näherung die Werte $\alpha=1,0$ und $\beta=0,4$ angenommen werden. Der Hydrolysegrad (DH) berechnet sich nun aus dem Wert h und dem Wert h_{tot} . Für h_{tot} ist ebenfalls kein Literaturwert vorhanden. In Näherung wird hier von $h_{\text{tot}}=8$ meqv/g Protein ausgegangen [76].

$$\text{DH} = \frac{h}{h_{\text{tot}}} \cdot 100 \%$$

6.3.4 RP-HPLC Fingerprints

Die während der Hydrolyse entnommenen Proben werden 10 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Je 150 µL des Überstandes werden 1:1 mit Eluent A verdünnt und in Doppelbestimmung mittels RP-HPLC analysiert.

Säule: C 12-Jupiter Proteo; 4µm; 250 mm x 4,6 mm
 Temperatur: 40 °C
 Eluenten: A: deion. Wasser mit 0,1 % (v/v) TFA
 B: Acetonitril mit 0,1 % (v/v) TFA
 Detektion: DAD-Detektor bei 228 nm
 Injektionsvolumen: 10 µL

Als Standard wird eine Peptidmischung (Gly-Tyr, Val-Tyr-Val, Met-Enkephalin, Leu-Enkephalin, Angiotensin II und Insulin) mit einer Konzentration von 0,05 mg/mL eingesetzt. Tabelle 31 zeigt das verwendete Gradientenprogramm.

Tabelle 31: Gradientenprogramm der RP-HPLC Peptidfingerprints.

Zeit (min)	A (%)	B (%)	Flussrate (mL/min)
0	95	5	0,4
40	50	50	0,4
41	5	95	0,4
52	5	95	0,4
54	95	5	0,4

6.3.5 MALDI-ToF Massenspektrometrie

Die Probenvorbereitung erfolgte nach den Herstellervorgaben [97]. Die gefriergetrockneten Proben und der Standard (je 1 mg/mL) wurden in 0,1 % TFA in H₂O gelöst und auf eine Konzentration von etwa 10 pmol/µL verdünnt. Als Standard wurden Leucin-Enkephalin, Bradykinin, Angiotensin I, Renin und ACTH (PI-Untersuchungen) bzw. Angiotensin I, Angiotensin II, Bradykinin, Methionin-Enkephalin, Leucin-Enkephalin und Val-Tyr-Val (Patatin-Untersuchungen) verwendet. Die Matrix (α -cyano-4-Hydroxyzimtsäure) wurde in 50 % Ethanol mit 50 % Acetonitril gelöst. Je 5 µL Probe und Matrix wurden gemischt und 1 µL des Gemischs auf den Probenhalter gegeben. Nach dem Trocknen wurden die Proben mit den unten stehenden Spezifikationen im MALDI-ToF-Massenspektrometer vermessen.

Tabelle 32: Spezifikationen des MALDI-Tof-MS.

Massenspektrometer	micromass M@LDI, Waters GmbH, Eschborn, Deutschland
Ionisierungsmodus	positiv
Messbereich	250-5.000 Da
Pulse Voltage (V)	2950,0
Source Voltage (V)	15000,0
Reflectron Voltage (V)	500,0

6.4 Bioanalytische Assays

6.4.1 Bradford-Assay

Die Proben wurden zunächst 1:5 mit deion. H₂O verdünnt. Anschließend wurden sie gemäß der Microplate Procedure A des Pierce Bradford Assay Kits [98] auf eine 96-well-Platte verteilt. Die Ermittlung der Absorption erfolgte über das Multiskan-Platereader-Spektrophotometer.

6.4.1 Lowry-Assay

Die Proben wurden entsprechend der Microplate Procedure des Pierce Modified Lowry Protein Kits durchgeführt [99]. Die Ermittlung der Absorption erfolgte über das Multiskan-Platereader-Spektrophotometer.

6.4.2 SDS-Gelelektrophorese

Probenvorbereitung:

Das Kartoffelbruchwasser wird 1:10 mit deionisiertem Wasser verdünnt. Das Retentat der Q-Fraktion wird nicht verdünnt (ca. 1 mg/mL). Die sprühgetrockneten Proteaseinhibitoren werden mit einer Konzentration von 0,2 mg/mL eingesetzt.

Je 20 µL Probe werden mit 20 µL SDS-Probenpuffer (20 mM Tris HCL pH 8,2 mM EDTA, 5 % SDS, 5 % β-Mercaptoethanol, 0,02 % Bromphenolblau) versetzt und 10 min bei 95 °C aufgeköcht. Anschließend werden die Proben bei 14400 rpm 3 min zentrifugiert.

Gelvorbereitung:

Es wird ein 12%-iges Trenn- und ein 6%-iges Sammelgel vorbereitet (siehe: Tabelle 6.3). Hierzu werden zunächst 3,5 mL Trenngel in eine Gelkammer gegeben, mit Isopropanol (70 %) überschichtet und 30 min auspolymerisiert. Das überschüssige

Isopropanol wird abgenommen, das Sammelgel bis zur Kante der Gelkammer eingefüllt, ein Kamm für die Gelkammer eingesetzt und nochmals 30 min bis zur vollständigen Polymerisation des Sammelgels gewartet.

Nach dem Entfernen des Kamms wird das Gel in die mit 1xTGS-Puffer (3,03 g/L Tris HCL, 14,41 g/L Glycine, 10,0 g/L SDS) befüllte Laufkammer gegeben. Es werden je 10 µL Probe und 4 µL Marker in eine Geltasche gegeben und für ca. 2 h eine Spannung von 100 V angelegt. Nach Abschluss des Laufes wird das Gel aus der Kammer entfernt, das Sammelgel entfernt und das Gel mit deion. Wasser gespült.

Tabelle 33: Zusammensetzung eines SDS-Gels.

Chemikalie	Trenngel	Sammelgel
Acrylamid 40 %, (37,5:1 Acrylamid/ Bisacrylamid)	3 mL	750 µL
SDS 1%	1 mL	300µL
Tris-HCL(1,5 M) pH 8,8	2,8 mL	
Tris-HCL(1,5 M) pH 6,8		630 µL
TEMED	20 µL	10 µL
APS	20 µL	10 µL

Commassiefärbung:

Das Gel wird nach dem ablösen von der Glasplatte über Nacht in Commassie Brilliant Blue Silver Stain-Lösung eingelegt.

Die in Tabelle 34 angegebenen Chemikalien (1-3) werden in 100 mL deion. Wasser. Anschließend werden 800 mL deion. Wasser hinzugegeben. Unter ständigem rühren werden abschließend 200 mL Methanol hinzugefügt. Rezept nach Candiano et. al. 2004 [100].

Tabelle 34: Chemikalien zur Herstellung von 1 L Commassie Brilliant Blue Silver Stain

Reihenfolge	Chemikalie	Anteil
1	H ₃ PO ₄	100 mL
2	(NH ₄) ₂ SO ₄	100 g
3	Commassie Blue G-250	1,2 g
4	Methanol	200 mL

Das Gel wird anschließend in Wasser eingelegt und bis zur gewünschten Farbe entfärbt.

6.4.3 Lipidacylhydrolase-(LAH)-Assay

In einer bei 25 °C thermostatisierten Halbmikroküvette wurden 10 µL p-Nitrophenylcaprat (10,22 mM in Acetonitril) vorgelegt. Anschließend wurden 250 µL Triton X-100-Detergenzlösung (4 mM in deion. H₂O) und 690 µL Tris-HCl-Puffer (10 mM in deion. H₂O, pH 8) dazu gegeben. Die Hydrolysereaktion des p-Nitrophenylcaprat wurde durch Zugabe von 50 µL Probelösung gestartet und die Zunahme an p-Nitrophenol bei 400 nm über ein Cary50-Spektrophotometer verfolgt.

Über den molaren Extinktionskoeffizient $\epsilon = 16888 \text{ L}/(\text{mol cm})$ und die lineare Steigung ließ sich die LAH-Aktivität berechnen.

6.4.4 Proteaseinhibitor-Assay

In einer Pufferlösung pH 8,3 (50 mM Tris-HCl, 10 mM CaCl₂ in deionisiertem Wasser) wurden 2 mg/mL PI gelöst und mit 50 µL 4,35 µM Trypsin in Pufferlösung gemischt. Nach 15 min Vortemperierung im Thermomixer (200 rpm) bei 25 °C wurden 20 µL dieser Lösung in Halbmikroliter UV-Küvetten vorgelegt und 580 µL Pufferlösung (25 °C) zugegeben. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 400 µl 2,64 mM p-tosyl-L-Arginin Methyl Ester (TAME) Lösung (25 °C) gestartet und die Absorption bei 247 nm im Cary50-Spektrophotometer verfolgt. Mithilfe einer Kalibrierreihe mit verschiedenen Konzentrationen an Soybean Trypsin Inhibitor (STI) in Pufferlösung kann die inhibierende Wirkung der PI in STI-Äquivalenten ausgedrückt werden.

6.4.5 Papain Aktivitäts Assay

Der Papain Aktivitätstest erfolgte gemäß der Vorschrift von Sigma-Aldrich (Enzymatic Assay of Papain) [91]. Es wurden 7 mL 80 mM N- α -Benzoyl-L-Arginin Ethyl Ester (BAEE) sowie 1 mL 50 mM L-Cystein und 1 mL 3 M NaCl in das Reaktionsgefäß des Titrators gegeben und auf 25 °C erwärmt und der pH-Wert mittels Titration auf pH 6,3 eingestellt. Nach Zugabe der Enzymlösung (~1 U/mL natives Enzym) bzw. des Immobilisats wurde der pH Wert überwacht und die Zeit gemessen, in der 50 µL 20 mM NaOH verbraucht wurden um den pH-Wert konstant auf pH 6,2 zu behalten. Aus der Steigung konnte mit Hilfe der folgenden Gleichung die Aktivität bestimmt werden.

$$\frac{\text{Units}}{\text{ml Enzym}} = \frac{0,05 \text{ mL} \cdot (\text{Normalität der NaOH}) \cdot 1000 \cdot (\text{Verdünnungsfaktor})}{(T)(\text{Volumen an eingesetzter Enzym Lösung})}$$

T Zeit in Minuten, die pro 50 µL eingesetzter NaOH benötigt wird, den pH-Wert konstant auf 6,2 zu halten.

6.4.6 Pepsin Aktivitäts Assay

Der Pepsin Aktivitätstest erfolgte gemäß der Vorschrift von Sigma-Aldrich (Enzymatic Assay of Pepsin) [90]. Die Probenvorbereitung (0,05 mg/mL Pepsin in kalter 10 mM HCL) wurde unmittelbar vor der Messung durchgeführt.

Tabelle 35: Arbeitsvorschrift des Pepsin Aktivitätsassay

Durchführung	Probe	Blank
2 % (w/v) Hämoglobinlösung auf 37 °C erwärmen	0,5 mL	0,5 mL
Zugabe von Enzymlösung	0,1 mL	---
Bei 37 °C exakt 10 Minuten schütteln		
Zugabe von 5 % TCA (w/v)	1 mL	1 mL
Zugabe von Enzymlösung	---	0,1 mL
5 min bei 37 °C unter schütteln inkubieren, filtrieren mit einen 0,8 µm Syringe Filter und überführen in eine Quarzküvette		

Die Messung der Absorption (A_{280}) von Blank und Probe erfolgte bei 280 nm. Daraus wurde über die folgende Gleichung die Aktivität der Proben bestimmt.

$$\frac{Units}{mL\ Enzym} = \frac{(A_{280}Test - A_{280}Blank)(df)}{(0,001)(10)(0,1)}$$

- (df) Verdünnungsfaktor
 (0,001) Veränderung in der Absorbanz (bei 280 nm) pro Unit Pepsin
 (10) Zeit des Assay in Minuten
 (0,1) Volumen in mL der eingesetzten Enzymlösung

Bei den immobilisierten Enzymen erfolgte die Durchführung wie beim nativen Enzym, jedoch wurden die Lösungen zum Trägermaterial gegeben. Nach der Durchführung wurde der Überstand abgenommen, gefiltert und in eine Quarzküvette zur Messung überführt.

6.4.7 ACE-Assay

20 µL Probe wurden mit 180 µL 5 mM Hippuryl-Histidyl-Leucin Hydrat (HHL), gelöst in 0,1 M Borat-Puffer (pH 8,3, 0,4 M NaCl) versetzt und 5 min bei 37 °C inkubiert. Danach wurden 60 µL 60 mU/mL Angiotensin-Converting-Enzym (ACE), gelöst in Tris-Puffer (pH 7,5, 0,3 M NaCl), hinzugeben und weitere 30 min bei 37 °C auf dem Thermoschüttler (450 rpm) inkubiert. Die Reaktion wurde danach durch pH-Shift-Inaktivierung des ACE mit 16 µL 5 M HCl beendet. Die Reaktionsprodukte wurden an

einer RP-HPLC mit C₈ Supelco-Säule (5 µm; 150 x 4.6 mm) bei 37 °C aufgetrennt und bei 228 nm detektiert. Das Injektionsvolumen betrug 10 µL.

Als mobile Phase wurde ein Gradient aus Eluent A (0,1 % TFA/H₂O) und Eluent B (0,1 % TFA/ACN) verwendet. In Tabelle 36 ist der verwendete Laufmittelgradient dargestellt.

Tabelle 36: Gradientenprogramm der RP-HPLC Analytik des ACE-Assay

Zeit (min)	A (%)	B (%)	Flussrate (mL/min)
0	100	0	0,5
24	30	70	0,5
25	0	100	0,5
30	0	100	0,5
31	100	0	0,5
38	100	0	0,5

Die Konzentration des Spaltproduktes Hippursäure wird über die Berechnung der Peakintegrale bestimmt.

Es wird eine Kalibration des Produktumsatzes mit verschiedenen Konzentrationen ACE ohne Zugabe eines Inhibitors durchgeführt. Der inhibierende Einfluss der Proben auf den Produktumsatz kann so in Bezug auf die Kalibration bestimmt werden.

6.4.8 TEAC-Assay

15 µL Probe ($c = \sim 1$ g/L) oder Trolox-Standard (in Methanol) werden in einer Mikrotiterplatte vorgelegt und mit 300 µL Reaktionslösung (100 µL 100 mM DMPD in 9,88 mL 0,1 M Acetat-Puffer (pH 5,25) und 20 µL 50 mM Eisen(III)-chlorid-Lösung) versetzt. Die Mikrotiterplatte wird 10 min bei 25 °C geschüttelt und anschließend die Absorption photometrisch bei 505 nm gemessen.

Die Werte der Oxidationsinhibition verschiedener Trolox-Standardkonzentrationen wurden über folgende Formel berechnet:

$$\text{OxI} [\%] = 1 - \frac{A_i}{A_0} \cdot 100$$

A_0 = Absorption der Blank-Probe

A_i = Absorption der Standardprobe

Über die Standardreihe der Troloxäquivalentkonzentration kann über die Formel

$$\text{TEAC} [\text{mmol Eq./g Protein}] = \frac{\text{Troloxäquivalente} [\text{mmol/L}]}{\text{Proteinkonzentration} [\text{g/L}]}$$

die antioxidative Kapazität der Proben ermittelt werden.

6.4.9 ORAC-Assay

Es werden je 20 µL der verdünnten Probe (ca. 0,1 g/L) bzw. der Trolox-Standards im Konzentrationsbereich von 10-80 µM (Endkonzentration 1-8 µM) in einer Mikrotiterplatte vorgelegt. Dazu werden 120 µL einer 117 nM Fluorescein-Lösung in 75 mM Phosphatpuffer (pH 7,4) (1,17 mM Fluorescein-Stammlösung 4 Wochen bei 4 °C haltbar) gegeben und 15 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend werden mit Hilfe einer Multichannelpipette 60 µL 2,2'-Azobis-(2-Methylpropiondiamin) (40 mM) dazu pipettiert und sofort im Fluoreszenzspektrometer die Fluoreszenz (Exitation 485-P, Emission 535-P) für 80 min jede Minute nach vorherigem Schütteln gemessen.

Die durch Auftragen der Daten gegen die Zeit entstandenen Kurven wurden normalisiert und die Fläche unter der Kurve (Area Under Curve, AUC) durch folgende Formel berechnet:

$$AUC = 1 + \sum_{i=1}^{i=80} f_i / f_0$$

Dabei ist f_0 die Fluoreszenz zum Zeitpunkt 0 und f_i die Fluoreszenz zum Zeitpunkt i . Nach Subtraktion des Blank-AUC von der Proben-AUC wurde die Netto-AUC erhalten. Diese lieferten eine Kalibrationsreihe, mit der über die Netto-AUC der Proben die µmol Troloxäquivalente berechnet werden konnten. Daraus konnten über die Formel

$$\text{ORAC [mmol Eq./g Protein]} = \frac{\text{Troloxäquivalente [mmol/L]}}{\text{Proteinkonzentration [g/L]}}$$

die antioxidativen Kapazitäten berechnet werden.

6.4.10 Superoxid Anion Radikalfänger Assay

Um den Prozess der Pyrogallolautoxidation zu verfolgen, wurden 50 µL einer Peptidprobe (1-2 mg/mL in deion. Wasser, 1,4 mL Tris-HCL-EDTA Puffer (0,1 M, pH 8) mit 50 µL einer 3 mM Pyrogallollösung (in 10 mM HCl) versetzt. Durch den pH-Shift wurde die Autoxidation initiiert und die Zunahme an Reaktionsprodukten photometrisch bei 325 nm verfolgt ($\Delta_{\text{Absorption Probe}}$). Als Negativkontrolle wurde die Autoxidation ohne Zusätze überwacht ($\Delta_{\text{Absorption Blank}}$). Die antioxidative Aktivität (OxI[%]) kann so als Prozentsatz der Inhibierung der Pyrogallol-Autoxidation wiedergegeben werden:

$$\text{OxI[\%]} = \frac{\Delta_{\text{Absorption Blank}}}{\Delta_{\text{Absorption Probe}}} \cdot 100\%$$

Eine Positivkontrolle wurde mit verschiedenen Konzentrationen von 0,25-10 mM Ascorbinsäure durchgeführt. Alle Versuche wurden in Dreifachbestimmung durchgeführt.

6.4.11 Broth-Mikroverdünnungsassays

Die gram-negativen *E. coli* Bakterien werden in einem Schüttelkolben bei 37 °C, *K. Marxianus* bei 30 °C bis zur exponentiellen Phase kultiviert. Ein Teil dieser Vorkultur wurde aus der exponentiellen Phase der Vorkultur entnommen und auf eine Zellzahl von 10⁶ Zellen/mL verdünnt. 75 µL dieser Zelllösung und 75 µL des Nährmediums wurden in einer 96-well-Platte inokuliert. In Dreifachbestimmung wurden die Proben bei 37 °C unter Schütteln für 15 h bis zur erneuten exponentiellen Wachstumsphase kultiviert. Im Anschluss wurde die optische Dichte gemessen und daraus das antimikrobielle Potential ermittelt. Dabei ist OD_{negativ} der Blank-Wert des Wachstums ohne Peptide und Tetracyclin, OD_{positiv} ist der Messwert mit Antibiotikum und P_{anti} entspricht dem antimikrobiellen Potential, wobei ein Wert von P_{anti} = 100 einer vollständigen Inhibierung des Bakterienwachstums entspricht.

$$P_{\text{anti}}[\%] = \left(1 - \frac{OD_{\text{Probe}} - OD_{\text{positiv}}}{OD_{\text{negativ}} - OD_{\text{positiv}}} \right) \cdot 100$$

Verwendete Medien:

E. Coli K12 und *E. Coli K1*:

LB Medium: 10 g/L Hefeextrakt, 5 g/L Trypton, 1 g/L NaCl.

Kluyveromyces Marxianus:

3 g/L Hefeextrakt, 3 g/L Malzextrakt 5 g/L, 5 g/L Pepton, 10 g/L Glucose

6.5 Probandeninformationen und Fragebögen zur Humanstudie

Betriebsstätte Labor Hannover
Scharnhorststraße 15 - 30175 Hannover
Tel.: 0511/901 36 11 Fax: 0511/901 36 19

Ärztliche Leitung:
Dr. rer. nat. Dr. med. Carsten Wolff, Facharzt für Laboratoriumsmedizin, Transfusionsmedizin
Dr. med. Norbert Sloot, Facharzt für Mikrobiologie & Infektionsepidemiologie

LADR GmbH - Scharnhorststraße 15 - 30175 Hannover

HAUHLE HN009

An die
Universität Hannover
Inst. für Lebensmittelwissenschaft
und Ökotrophologie
Am Kleinen Felde 30
30167 Hannover

ENDBEFUND
02.05.2011

LADR GmbH - Med. Versorgungszentrum Hannover - Scharnhorststraße 15 - 30175 Hannover - Tel.: 0511/9013670 - Fax: 0511/9013619

Pat.: AOX
geb.: ?

Labornummer : 90 1162 0327
Eingang vom : 19.04.11

Ihre Nr.: 3909501638

ENDBEFUND : 02.05.11 Seite 1/2

Material : Serum, Vollblut, EDTA-Plasma tiefgefroren, NaF/BZ kap.

klin. Angaben: | Studie Kartoffelprotein,

	Resultat	Einheit	Referenzbereich
Klinische Chemie / Substrate			
Glucose in NaF-BL.	90	mg/dl	74 - 106
Klinische Chemie / Enzyme			
GOT	37	U/l	Männer: < 50 Frauen: < 35
GPT	33	U/l	Männer: < 50 Frauen: < 35
GGT	23	U/l	Kinder: Frühgeborene: < 292 1. Tag: < 171 < 5 Tage: < 210 < 6 Monate: < 231 < 1 Jahr: < 39 < 3 Jahre: < 20 < 6 Jahre: < 26 < 12 Jahre: < 19 < 17 Jahre: weiblich: < 38 männlich: < 52 Männer: < 60 Frauen: < 40

Betriebsstätte Labor Hannover
Scharnhorststraße 15 - 30175 Hannover
Tel.: 0511/901 36 11 Fax: 0511/901 36 19

Ärztliche Leitung:
Dr. rer. nat. Dr. med. Carsten Wolff, Facharzt für Laboratoriumsmedizin, Transfusionsmedizin
Dr. med. Norbert Sloot, Facharzt für Mikrobiologie & Infektionsepidemiologie

LADR GmbH - Scharnhorststraße 15 - 30175 Hannover

HAUHLE HN009

An die
Universität Hannover
Inst. für Lebensmittelwissenschaft
und Ökotrophologie
Am Kleinen Felde 30
30167 Hannover

ENDBEFUND

02.05.2011

LADR GmbH - Med. Versorgungszentrum Hannover - Scharnhorststraße 15 - 30175 Hannover - Tel.: 0511/9013670 - Fax: 0511/9013619

Pat.: AlY

Labornummer : 90 1162 0331

geb.: ?

Eingang vom : 19.04.11

Ihre Nr.: 3909501642

ENDBEFUND : 02.05.11 Seite 1/1

Material : Serum, Vollblut, EDTA-Plasma tiefgefroren, NaF/BZ kap.

	Resultat	Einheit	Referenzbereich
Klinische Chemie / Substrate			
Glucose in NaF-Bl.	↑ 108	mg/dl	74 - 106
Hormondiagnostik			
*Insulin	8.5	µE/ml	< 17.5
#Glucagon im Plasma	61.0	ng/l	60 - 177

* = Fremdleistung aus LADR-Verbundlabor

= Fremdleistung aus externem Labor

Befund wurde medizinisch validiert durch Dr. med. C. Wolff.

Betriebsstätte Labor Hannover

Scharnhorststraße 15 - 30175 Hannover
Tel.: 0511/901 36 11 Fax: 0511/901 36 19

Ärztliche Leitung:

Dr. rer. nat. Dr. med. Carsten Wolff, Facharzt für Laboratoriumsmedizin, Transfusionsmedizin
Dr. med. Norbert Sloot, Facharzt für Mikrobiologie & Infektionsepidemiologie

LADR GmbH - Scharnhorststraße 15 - 30175 Hannover

HAUHLE HN009

An die
Universität Hannover
Inst. für Lebensmittelwissenschaft
und Ökotrophologie
Am Kleinen Felde 30
30167 Hannover

ENDBEFUND

02.05.2011

LADR GmbH - Med. Versorgungszentrum Hannover - Scharnhorststraße 15 - 30175 Hannover - Tel.: 0511/9013670 - Fax: 0511/9013619

Pat.: A2Y

Labornummer : 90 1162 0335

geb.: ?

Eingang vom : 19.04.11

Ihre Nr.: 3909501646

ENDBEFUND : 02.05.11 Seite 1/1

Material : Serum, Vollblut, EDTA-Plasma tiefgefroren, NaF/BZ kap.

klin. Angaben: | Studie Kartoffelprotein,

	Resultat	Einheit	Referenzbereich
Klinische Chemie / Substrate			
Glucose in NaF-BI.	↑ 127	mg/dl	74 - 106
Hormondiagnostik			
*Insulin	↑ 23.4	µE/ml	< 17.5
#Glucagon im Plasma	63.0	ng/l	60 - 177

* = Fremdleistung aus LADR-Verbundlabor

= Fremdleistung aus externem Labor

Befund wurde medizinisch validiert durch Dr. med. C. Wolff.

Betriebsstätte Labor Hannover
Scharnhorststraße 15 - 30175 Hannover
Tel.: 0511/901 36 11 Fax: 0511/901 36 19

Ärztliche Leitung:
Dr. rer. nat. Dr. med. Carsten Wolff, Facharzt für Laboratoriumsmedizin, Transfusionsmedizin
Dr. med. Norbert Sloot, Facharzt für Mikrobiologie & Infektionsepidemiologie

LADR GmbH - Scharnhorststraße 15 - 30175 Hannover

HAUHLE HN009

ENDBEFUND

02.05.2011

An die
Universität Hannover
Inst. für Lebensmittelwissenschaft
und Ökotoxikologie
Am Kleinen Felde 30
30167 Hannover

LADR GmbH - Med. Versorgungszentrum Hannover - Scharnhorststraße 15 - 30175 Hannover - Tel.: 0511/9013670 - Fax: 0511/9013619

Pat.: A3Y

Labornummer : 90 1162 0339

geb.: ?

Eingang vom : 19.04.11

Ihre Nr.: 3909501650

ENDBEFUND : 02.05.11 Seite 1/1

Material : Serum, Vollblut, EDTA-Plasma tiefgefroren, NaF/BZ kap.

klin. Angaben: | Studie Kartoffelprotein,

	Resultat	Einheit	Referenzbereich
Klinische Chemie / Substrate			
Glucose in NaF-Bl.	↑ 129	mg/dl	74 - 106
Hormondiagnostik			
*Insulin	↑ 29.5	µE/ml	< 17.5
#Glucagon im Plasma	64.0	ng/l	60 - 177

* = Fremdleistung aus LADR-Verbundlabor # = Fremdleistung aus externem Labor

Befund wurde medizinisch validiert durch Dr. med. C. Wolff.

Betriebsstätte Labor Hannover
Scharnhorststraße 15 - 30175 Hannover
Tel.: 0511/901 36 11 Fax: 0511/901 36 19

Ärztliche Leitung:
Dr. rer. nat. Dr. med. Carsten Wolff, Facharzt für Laboratoriumsmedizin, Transfusionsmedizin
Dr. med. Norbert Sloot, Facharzt für Mikrobiologie & Infektionsepidemiologie

LADR GmbH - Scharnhorststraße 15 - 30175 Hannover

HAUHLE HN009

ENDBEFUND

02.05.2011

An die
Universität Hannover
Inst. für Lebensmittelwissenschaft
und Ökotrophologie
Am Kleinen Felde 30
30167 Hannover

LADR GmbH - Med. Versorgungszentrum Hannover - Scharnhorststraße 15 - 30175 Hannover - Tel.: 0511/9013670 - Fax: 0511/9013619

Pat.: A4Y

Labornummer : 90 1162 0343

geb.: ?

Eingang vom : 19.04.11

Ihre Nr.: 3909501654

ENDBEFUND : 02.05.11 Seite 1/1

Material : Serum, Vollblut, EDTA-Plasma tiefgefroren, NaF/BZ kap.

klin. Angaben: | Studie Kartoffelprotein,

	Resultat	Einheit	Referenzbereich
Klinische Chemie / Substrate			
Glucose in NaF-Bl.	101	mg/dl	74 - 106
Hormondiagnostik			
*Insulin	↑ 20.4	µE/ml	< 17.5
#Glucagon im Plasma	↓ 58.0	ng/l	60 - 177

* = Fremdleistung aus LADR-Verbundlabor # = Fremdleistung aus externem Labor

Befund wurde medizinisch validiert durch Dr. med. C. Wolff.

Betriebsstätte Labor Hannover
Scharnhorststraße 15 - 30175 Hannover
Tel.: 0511/901 36 11 Fax: 0511/901 36 19

Ärztliche Leitung:
Dr. rer. nat. Dr. med. Carsten Wolff, Facharzt für Laboratoriumsmedizin, Transfusionsmedizin
Dr. med. Norbert Sloot, Facharzt für Mikrobiologie & Infektionsepidemiologie

LADR GmbH - Scharnhorststraße 15 - 30175 Hannover

HAUHLE HN009

An die
Universität Hannover
Inst. für Lebensmittelwissenschaft
und Ökotoxikologie
Am Kleinen Felde 30
30167 Hannover

ENDBEFUND
02.05.2011

LADR GmbH - Med. Versorgungszentrum Hannover - Scharnhorststraße 15 - 30175 Hannover - Tel.: 0511/9013670 - Fax: 0511/9013619

Pat.: A5Y
geb.: ?

Labornummer : 90 1162 0347
Eingang vom : 19.04.11

Ihre Nr.: 3909501658

ENDBEFUND : 02.05.11 Seite 1/1

Material : Serum, Vollblut, EDTA-Plasma tiefgefroren, NaF/BZ kap.

klin. Angaben: | Studie Kartoffelprotein,

	Resultat	Einheit	Referenzbereich
Klinische Chemie / Substrate			
Glucose in NaF-BL.	100	mg/dl	74 - 106
Hormondiagnostik			
*Insulin	6.2	µE/ml	< 17.5
#Glucagon im Plasma	↓ 54.0	ng/l	60 - 177

* = Fremdleistung aus LADR-Verbundlabor # = Fremdleistung aus externem Labor

Befund wurde medizinisch validiert durch Dr. med. C. Wolff.

Ärztliche Leitung:
Dr. rer. nat. Dr. med. Carsten Wolff, Facharzt für Laboratoriumsmedizin, Transfusionsmedizin
Dr. med. Norbert Sloot, Facharzt für Mikrobiologie & Infektionsepidemiologie

LADR GmbH - Scharnhorststraße 15 - 30175 Hannover

HAUHLE HN009

An die
Universität Hannover
Inst. für Lebensmittelwissenschaft
und Ökotoxikologie
Am Kleinen Felde 30
30167 Hannover

ENDBEFUND

02.05.2011

LADR GmbH - Med. Versorgungszentrum Hannover - Scharnhorststraße 15 - 30175 Hannover - Tel.: 0511/9013670 - Fax: 0511/9013619

Pat.: A6Y

Labornummer : 90 1162 0351

geb.: ?

Eingang vom : 19.04.11

Ihre Nr.: 3909501662

ENDBEFUND : 02.05.11 Seite 1/1

Material : Serum, Vollblut, EDTA-Plasma tiefgefroren, NaF/BZ kap.

	Resultat	Einheit	Referenzbereich
Klinische Chemie / Substrate			
Glucose in NaF-Bl.	100	mg/dl	74 - 106
Hormondiagnostik			
*Insulin	5.9	µE/ml	< 17.5
#Glucagon im Plasma	↓ 54.0	ng/l	60 - 177

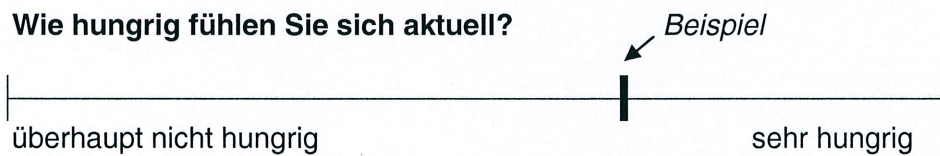
* = Fremdleistung aus LADR-Verbundlabor # = Fremdleistung aus externem Labor

Befund wurde medizinisch validiert durch Dr. med. C. Wolff.

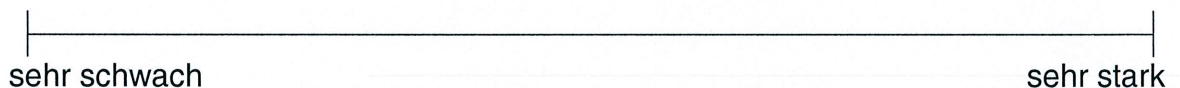
Visuelle Analogskala - Sättigung (t₃)

Uhrzeit: |_|_|_| |_|_|_| Uhr

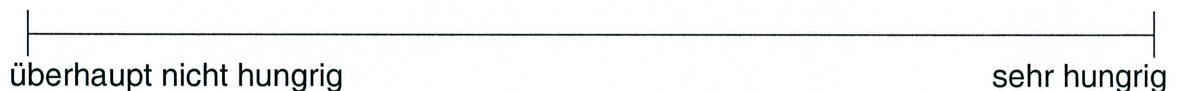
Sehr geehrter Studienteilnehmer,
bitte registrieren Sie die Stärke Ihres Wunsches etwas zu essen, wie hungrig und satt Sie sich fühlen und wie viel Sie essen könnten, jeweils für den aktuellen Zeitpunkt durch einen senkrechten Strich (|) auf der Skala, z. B.:



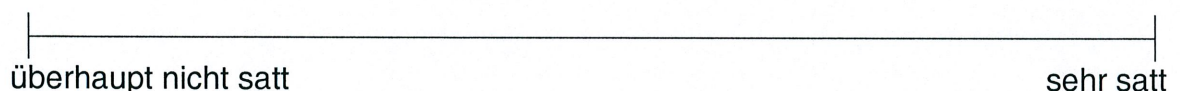
1. Wie stark ist Ihr Wunsch, jetzt etwas zu essen?



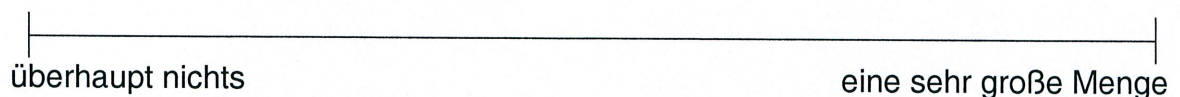
2. Wie hungrig fühlen Sie sich aktuell?



3. Wie satt fühlen Sie sich derzeit?



4. Wie viel könnten Sie jetzt essen?



Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Beispiele für Nahrungsmittel mit bioaktiven Peptiden. Modifiziert nach Korhonen et. al. (2006), Hartmann et. al. (2007) und Fitzgerald et. al. (2011) [2, 6, 20].	11
Tabelle 2: Vor- und Nachteile von immobilisierten Enzymen [32].	13
Tabelle 3: Industrielle Prozesse, in denen immobilisierte Enzyme verwendet werden [32].	14
Tabelle 4: Zusammensetzung der Proteine im KFW [45].	19
Tabelle 5: Funktionelle Gruppen an Ionenaustauschermembranen [59].	21
Tabelle 6: Von der alten Anlage verwendete MA-Module mit Angaben zu ihren Bindungskapazitäten, Membranflächen und Produktausbeuten pro Zyklus [45].	26
Tabelle 7: Prozessschritte und ihre jeweiligen Gebrauchslösungen und Flussraten... 29	
Tabelle 8: Flüssigkeitsverbrauch und Kostenkalkulation für einen Zyklus der Proteingewinnung.	30
Tabelle 9: Angesteuerte Ventile während der jeweiligen Prozessschritte.	32
Tabelle 10: Übersicht über die verschiedenen Module mit ihren Bindungskapazitäten und Produktausbeuten.	32
Tabelle 11: Übersicht über die benötigten Prozessvolumina, die Schrittzeiten und den durchschnittlichen Druck auf die Membranen.	40
Tabelle 12: Plasma Glucose-, Insulin- und Glucagonwerte eines Probanden vor Aufnahme des Prüfpräparats (T_0) und nach der Aufnahme (T_{15} - T_{180}) sowie der Referenzwerte.	43
Tabelle 13: Optimale Hydrolysebedingungen.	46
Tabelle 14: Hydrolysegrade der einzelnen Verdauungssimulationen	48
Tabelle 15: Gradientenprogramm der präparativen RP-HPLC.	49
Tabelle 16: Mittels Maldi-MS ermittelte Molekülmassen in Da der Fraktionen F1-F3. 52	
Tabelle 17: TEAC-Werte verschiedener Hydrolysate der Proteaseinhibitorfraktion.	54
Tabelle 18: OxI-Werte der PI-Hydrolysate (2 mg/mL) über den Superoxid Anion Radikalfänger Assay.	55
Tabelle 19: IC_{50} -Werte der Kartoffelproteine und der PI-Hydrolysate.	57
Tabelle 20: Antimikrobielles Potential in % der PI-Hydrolysate gegen <i>Kluveromyces marxianus</i> und <i>E. coli K1</i> über den Mikroverdünnungsassay.	59

Tabelle 21: Bedeckungsgrad und gebundener Anteil der eingesetzten Enzyme.	62
Tabelle 22: Aktivität der Enzyme vor und nach der Immobilisierung.	64
Tabelle 23: TEAC Troloxäquivalente der aus der Hydrolyse gewonnenen Peptide.	65
Tabelle 24: Troloxäquivalente von Patatin und seinen Hydrolysaten über den ORAC-Assay.	66
Tabelle 25: IC ₅₀ -Werte der Kartoffelproteine und der Patatin-Hydrolysate.	67
Tabelle 26: Antimikrobielles Potential von Patatin und seinen Hydrolysaten über den Broth-Mikroverdünnungs-Assay.	68
Tabelle 27: Bioaktivität der Patatin-Hydrolysate durch Trypsin und α -Chymotrypsin.	70
Tabelle 28: Ermittelte Aminosäuresequenzen der Fraktionen F1 und F2 über die im Massenspektrometer erhaltene Masse (Aminosäuresequenz im Ein Buchstabencode).	72
Tabelle 29: Übersicht über die verschiedenen Zyklusschritte und Abbruchbedingungen der Fraktionierungsanlage.	82
Tabelle 30: Gradientenprogramm des OPA Aminosäureassay.	88
Tabelle 31: Gradientenprogramm der RP-HPLC Peptidfingerprints.	90
Tabelle 32: Spezifikationen des MALDI-Tof-MS.	91
Tabelle 33: Zusammensetzung eines SDS-Gels.	92
Tabelle 34: Chemikalien zur Herstellung von 1 L Commassie Brilliant Blue Silver Stain	92
Tabelle 35: Arbeitsvorschrift des Pepsin Aktivitätsassay.	94
Tabelle 36: Gradientenprogramm der RP-HPLC Analytik des ACE-Assay.	95
Tabelle 37: Unterstützende Tätigkeiten am Gesamtprojekt.	118

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Physiologische Wirksamkeiten von bioaktiven Peptiden aus Milchprotein [2].	4
Abbildung 2: Funktionsweise des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) zur Regulierung des Blutdrucks [7].	5
Abbildung 3: Prolin als Beispiel für eine kurzkettige Aminosäure mit einem unpolaren Aminosäurerest [12].	6
Abbildung 4: Transportmechanismen für Peptide über die Darmschleimhaut: Parazellulär (1), Passive Diffusion (2), Endocytose (3), Transport über Carrier (4) [24].	9
Abbildung 5: Transzellulärer Peptidtransport über PepT1 [26].	10
Abbildung 6: Verschiedene Methoden der Selbstimmobilisierung [35].	15
Abbildung 7: Bindung eines Enzyms an den Träger Eupergit® C [41].	16
Abbildung 8: Sartobind-Direct-Capture-Wickelmodule der Firma Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen.	22
Abbildung 9: Prozessschritte zur Gewinnung von Proteinen mit Sartobind-Direct-Capture-Wickelmodulen [62].	23
Abbildung 10: Vorgängermodell der Fraktionierungsanlage mit zwei MA-Modulen.	25
Abbildung 11: Fraktionierungsanlage im Tandemmodus. Grau hinterlegt der 1. und 2. Strang der Anlage mit je einem Q- und einem S-Modul.	27
Abbildung 12: UV- und Leitfähigkeitswerte während der Fraktionierung, beginnend nach der Beladung von Strang 1 mit dem ersten Waschschrift.	29
Abbildung 13: Fraktionierungsanlage im Tandemmodus mit Rückflussoption.	31
Abbildung 14: Einzellauf der Q15E480-Membran bei 280 nm (Daten wurden mit einer FPLC-Anlage aufgenommen).	33
Abbildung 15: Peakmaxima (rel. AU) des Elutions- (○) und des Regenerationspeaks (■) aufgetragen gegen die Leitfähigkeit.	34
Abbildung 16: FPLC-Daten der Langzeitstabilität der S-Membran S15E48.	36
Abbildung 17: FPLC- Daten der Langzeitstabilität der Q- Membran Q15E48.	37
Abbildung 18: Commassie gefärbte SDS-PAGE der Elutionsfraktionen. F 1. Marker (26610), F 2: S-Fraktion, F 3: KFW, F 4: Q-Fraktion, F 5: Q-Fraktion nach Crossflow-Filtration, F 6: Marker (26614).	38
Abbildung 19: Präparativer RP-HPLC Peptid Fingerprint verschiedener Hydrolysate.	50

Abbildung 20: RP-HPLC Verlauf des Pepsin/Pancreatin Verdaus zu Beginn, nach 60 min und nach 130 min Hydrolysezeit.	51
Abbildung 21: Bildung des DMPD-Radikalkations.	53
Abbildung 22: Autoxidation von Pyrogallol (1) zu verschiedenen chromophoren Oxidationsprodukten (2-4). Modifiziert nach Gao et. al. (1998) [80].	55
Abbildung 23: ACE katalysierter Umsatz von Histidyl-Hippuryl-L-Leucin (HHL) zu Hippursäure (HA) und Histidyl-L-Leucin (HL).	57
Abbildung 24: HPLC-Fingerprint der verschiedenen Hydrolysate. Standard: Gly-Tyr, Val-Tyr-Val, Methionin-Enkephalin, Leucin-Enkephalin, Angiotensin II.	69
Abbildung 25: RP-HPLC-Diagramm, rot markiert die gesammelten Fraktionen.	71
Abbildung 26: Aufbau der FPLC-Anlage zur Aufreinigung der PI und Patatin aus KFW.	84
Abbildung 27: FPLC-Daten der Membranelution über vier Durchläufe.	84
Abbildung 28: Aminosäuren mit Drei- und Einbuchstabencode, systematischem Namen und Summenformel [96].	85

Abkürzungsverzeichnis

[%]	Prozent
[°C]	Grad Celsius
[µL]	Mikroliter
[Å]	Angström
[AU]	Absorptionseinheit
[cm]	Zentimeter
[Da]	Dalton
[DAD]	Diodenarraydetektor
[DH]	degree of hydrolysis
[DSZM]	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
[E.C.]	Enzyme Commission
[Eq.]	Äquivalente
[g]	Gramm
[h]	Stunde
[HPLC]	Hochleistungsflüssigchromatographie
[IC]	Inhibitory concentration
[L]	Liter
[m]	Meter
[MA]	Membranadsorber
[MALDI-ToF-MS]	Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation- time of flight-Massenspektrometrie
[mg]	Milligramm
[min]	Minute
[Mio]	Million
[mM]	Millimolar
[n. b.]	nicht bekannt
[OD]	Optische Dichte
[pH]	potentia Hydrogenii
[rel.]	Relativ
[RP]	reversed phase
[rpm]	rounds per minute
[t]	Tonne
[U]	Unit
[UV-Vis]	Ultraviolett-Visible
[w/v]	weight/volume
ACE	Angiotensin I konvertierendes Enzym
CAN	Acetonitril
APS	Ammoniumpersulfat

BHA	Butylhydroxyanisol
BHT	Butylhydroxytoluol
CN	Casein
CPP	Caseinophosphopeptid
DMPD	<i>N,N</i> -Dimethyl-1,4-phenylendiamin
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
HA	Hippursäure
HHL	Histidyl-Hippuryl-L-Leucin
HL	Histidyl-L-Leucin
KFW	Kartoffelfruchtwasser
LA	Lactalbumin
LG	Lactoglobulin
OPA	<i>o</i> -Phthaldialdehyd
PI	Proteaseinhibitoren
SDS	Sodium dodecyl sulfate
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
SN-TCA	Soluble nitrogen-trichloroacetic acid
<i>STI</i>	<i>Soybean Trypsin Inhibitor</i>
TAME	<i>N</i> - α -Tosyl L-Arginin Methylester
TEAC	Trolox equivalent antioxidant capacity
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TFA	Trifluoressigsäure
TNBS	Trinitrobenzolsulfonsäure
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

Literaturverzeichnis

1. Udenigwe, C.C. and R.E. Aluko, *Food Protein-Derived Bioactive Peptides: Production, Processing, and Potential Health Benefits*. Journal of Food Science, 2012. **77**(1): p. R11-R24.
2. Korhonen, H. and A. Pihlanto, *Bioactive peptides: Production and functionality*. International Dairy Journal, 2006. **16**(9): p. 945-960.
3. Pripp, A.H., et al., *Quantitative structure activity relationship modelling of peptides and proteins as a tool in food science*. Trends in Food Science & Technology, 2005. **16**(11): p. 484-494.
4. Erdmann, K., B.W.Y. Cheung, and H. Schroder, *The possible roles of food-derived bioactive peptides in reducing the risk of cardiovascular disease*. Journal of Nutritional Biochemistry, 2008. **19**(10): p. 643-654.
5. Hernandez-Ledesma, B., C.C. Hsieh, and B.O. de Lumen, *Lunasin, a novel seed peptide for cancer prevention*. Peptides, 2009. **30**(2): p. 426-430.
6. Fitzgerald, C., et al., *Heart Health Peptides from Macroalgae and Their Potential Use in Functional Foods*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2011. **59**(13): p. 6829-6836.
7. http://tu-dresden.de/die_tu_dresden/fakultaeten/medizinische_fakultaet/inst/phy/forschung/deussen/vascularprotection/functionalfood. [cited 26. März 2013].
8. Ferreira, S.H., D.C. Bartelt, and L.J. Greene, *Isolation of Bradykinin-Potentiating Peptides from Bothrops-Jararaca Venom*. Biochemistry, 1970. **9**(13): p. 2583-&.
9. Ondetti, M.A. and D.W. Cushman, *Design of Specific Inhibitors of Angiotensin-Converting Enzyme - New Class of Orally Active Antihypertensive Agents*. Science, 1977. **196**(4288): p. 441-444.
10. Ondetti, M.A., et al., *Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitors from Venom of Bothrops-Jararaca Isolation, Elucidation of Structure, and Synthesis*. Biochemistry, 1971. **10**(22): p. 4033-&.
11. Fuglsang, A., et al., *Lactic acid bacteria: inhibition of angiotensin converting enzyme in vitro and in vivo*. Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology, 2003. **83**(1): p. 27-34.
12. <http://www.nawipro.de/arbeitsmaterialien/as/403-pro.html>. [cited 04. April 2013].
13. Meisel, H., et al., *ACE inhibitory peptides*, in *Nutraceutical Proteins and Peptides in Health and Disease*, V. Mine, F. Shahidi, and T.a. Francis, Editors. 2006. p. 269-315.
14. Sato, M., et al., *Angiotensin I-Converting Enzyme Inhibitory Peptides Derived from Wakame (Undaria pinnatifida) and Their Antihypertensive Effect in Spontaneously Hypertensive Rats*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2002. **50**(21): p. 6245-6252.
15. Choi, J., et al., *Bioactive peptides in dairy products*. International Journal of Dairy Technology, 2012. **65**(1): p. 1-12.
16. Udenigwe, C.C., et al., *Kinetics of the inhibition of renin and angiotensin I-converting enzyme by flaxseed protein hydrolysate fractions*. Journal of Functional Foods, 2009. **1**(2): p. 199-207.

17. Girgih, A.T., et al., *Kinetics of Enzyme Inhibition and Antihypertensive Effects of Hemp Seed (Cannabis sativa L.) Protein Hydrolysates*. Journal of the American Oil Chemists Society, 2011. **88**(11): p. 1767-1774.
18. Sharma, S., R. Singh, and S. Rana, *Bioactive Peptides: A Review*. Int. J. BIOautomation, 2012. **15**(4): p. 223-250.
19. Huang, D.J., B.X. Ou, and R.L. Prior, *The chemistry behind antioxidant capacity assays*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005. **53**(6): p. 1841-1856.
20. Hartmann, R. and H. Meisel, *Food-derived peptides with biological activity: from research to food applications*. Current Opinion in Biotechnology, 2007. **18**(2): p. 163-169.
21. Mine, Y. and J. Kovacs-Nolan, *New insights in biologically active proteins and peptides derived from hen egg*. Worlds Poultry Science Journal, 2006. **62**(1): p. 87-95.
22. Hori, G., et al., *Soy protein hydrolyzate with bound phospholipids reduces serum cholesterol levels in hypercholesterolemic adult male volunteers*. Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 2001. **65**(1): p. 72-78.
23. Kirana, C., et al., *Naturally derived micelles for rapid in vitro screening of potential cholesterol-lowering bioactives*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005. **53**(11): p. 4623-4627.
24. Vermeirssen, V., J. Van Camp, and W. Verstraete, *Bioavailability of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides*. British Journal of Nutrition, 2004. **92**(3): p. 357-366.
25. Roberts, P.R., et al., *Effect of chain length on absorption of biologically active peptides from the gastrointestinal tract*. Digestion, 1999. **60**(4): p. 332-337.
26. Brodin, B., et al., *Transport of peptidomimetic drugs by the intestinal di/tripeptide transporter, PepT1*. Pharmacology & Toxicology, 2002. **90**(6): p. 285-296.
27. Foltz, M., et al., *Angiotensin converting enzyme inhibitory peptides from a lactotripeptide-enriched milk beverage are absorbed intact into the circulation*. Journal of Nutrition, 2007. **137**(4): p. 953-958.
28. Segura-Campos, M., et al., *Bioavailability of Bioactive Peptides*. Food Reviews International. **27**(3): p. 213-226.
29. Arhewoh, I.M., E.I. Ahonkhai, and A.O. Okhamafe, *Optimising oral systems for the delivery of therapeutic proteins and peptides*. African Journal of Biotechnology, 2005. **4**(13): p. 1591-1597.
30. <http://www.bodylab24.de/Bodylab24/100%25-Whey-Protein-2000-g-1076?gclid=CJ7Dtomq0bYCFa7MtAodHm0ADg>. [cited 17. April 2013].
31. http://www.bvl.bund.de/DE/01_Lebensmittel/04_AntragstellerUnternehmen/ImAntragstellerUnternehmer_node.html. [cited 27. März 2013].
32. DiCosimo, R., et al., *Industrial use of immobilized enzymes*. Chemical Society Reviews, 2012.
33. http://www.researchandmarkets.com/reports/1417771/global_industrial_enzymes_market_an_analysis.pdf. [cited 30. März 2013].
34. Aehle, W., *Immobilization*, in *Enzymes in industry*, W. Aehle, Editor. 2007, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim. p. 68-78.
35. Tischer, W. and V. Kasche, *Immobilized enzymes: crystals or carriers?* Trends in Biotechnology, 1999. **17**(8): p. 326-335.
36. Brady, D. and J. Jordaan, *Advances in enzyme immobilisation*. Biotechnology Letters, 2009. **31**(11): p. 1639-1650.

37. Persichetti, R.A., et al., *Cross-Linked Enzyme Crystals (Clecs) of Thermolysin in the Synthesis of Peptides*. Journal of the American Chemical Society, 1995. **117**(10): p. 2732-2737.
38. Sheldon, R.A., *Cross-linked enzyme aggregates (CLEA (R) s): stable and recyclable biocatalysts*. Biochemical Society Transactions, 2007. **35**: p. 1583-1587.
39. Wilson, L., et al., *Cross-linked aggregates of multimeric enzymes: A simple and efficient methodology to stabilize their quaternary structure*. Biomacromolecules, 2004. **5**(3): p. 814-817.
40. Moolman, F.S., et al., *Stabilization of Enzymes*. 2005.
41. Sheldon, R.A., *Enzyme immobilization: The quest for optimum performance*. Advanced Synthesis & Catalysis, 2007. **349**(8-9): p. 1289-1307.
42. Mateo, C., et al., *Advances in the design of new epoxy supports for enzyme immobilization-stabilization*. Biochemical Society Transactions, 2007. **35**: p. 1593-1601.
43. <http://www.cma.de/content/kartoffeln/kartoffeln-inhaltsstoffe.php#>. [cited 02.Dezember 2007]
44. Baltes, W., ed. *Lebensmittelchemie*. 5. Auflage ed. 2000, Springer-Verlag.
45. Graf, A.M., *Entwicklung und Anwendung prozesstechnischer und analytischer Systeme zur Wertschöpfung bioaktiver Inhaltsstoffe aus Kartoffeln*, in *Dissertation Universität Hannover*. **2010**.
46. <http://berichte.bmelv-statistik.de/SJT-4022800-0000.pdf>. [cited 30. März 2013].
47. Shewry, P.R., *Tuber storage proteins*. Annals of Botany, **2003**. **91**(7): p. 755-769.
48. Alt, V., *Entwicklung verschiedener Aufreinigungs- und Analysestrategien für Proteine und Glykoalkaloide in Kartoffelfruchtwasser* Dissertation Universität Hannover, **2006**.
49. van Koningsveld, G.A., *Physico-chemical and functional properties of potato proteins*. Dissertation Universität Wageningen, **2001**.
50. Bohac, J.R., *A Modified Method to Purify Patatin from Potato-Tubers*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, **1991**. **39**(8): p. 1411-1415.
51. Hirschberg, H., et al., *Cloning, expression, purification and characterization of patatin, a novel phospholipase A*. European Journal of Biochemistry, **2001**. **268**(19): p. 5037-5044.
52. Pots, A.M., *Physico-chemical properties and thermal aggregation of patatin, the major potato tuber protein*. Dissertation Universität Wageningen, **1999**.
53. Racusen, D., *Lipid acyl hydrolase of patatin*. Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne De Botanique, **1984**. **62**(8): p. 1640-1644.
54. Hill, A.J., et al., *Oral-Administration of Proteinase Inhibitor-Ii from Potatoes Reduces Energy-Intake in Man*. Physiology & Behavior, 1990. **48**(2): p. 241-246.
55. Pouvreau, L., et al., *Relative abundance and inhibitory distribution of protease inhibitors in potato juice from cv. Elkana*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2001. **49**(6): p. 2864-2874.
56. Pots, A.M., et al., *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): p. 1557-1564.
57. Ulber, R., *Biotechnologische Methoden zur effizienteren Rohstoffnutzung*. Habilitationsschrift Universität Hannover, **2002**.

58. Knorr, D., *Protein Quality of Potato and Potato Protein-Concentrates*. Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie, 1978. **11**(3): p. 109-115.
59. Fischer-Frühholz, S., *Membranadsorber*. GIT Fachzeitschrift für das Laboratorium, 2004. **6**.
60. Scheper, T. and O.-W. Reif, *Angewandte Mikrobiologie (Ed: G. Antranikian*. Springer Verlag, Berlin, 2006: p. 430-445.
61. Schwarz, J., *Downstream-Processing und Biotransformation von nachwachsenden Rohstoffen*. Dissertation Universität Hannover, 2006.
62. Steinhof, R., *Aufbau eines Downstream-Prozesses zur Proteingewinnung mittels Membrantechnologie am Beispiel von Kartoffelfruchtwasser*. Dissertation Universität Hannover, 2007.
63. Deutsches Institut für Normung, *DIN 38404-C10R3*. 1995.
64. Graf, A.M., et al., *Downstream-Processing mit Membranadsorbern zur Isolierung nativer Proteinfractionen aus Kartoffelfruchtwasser*. Chemie Ingenieur Technik, **2009**. **81**(3): p. 267-274.
65. Patil, S.S. and M. Zucker, *Potato Phenolases*. Journal of Biological Chemistry, 1965. **240**(10): p. 3938-&.
66. Salzbrunn, K.U., *Über die Funktion und Struktur der Tyrosinase aus Streptomyces antibioticus*. 2007, Universität Mainz: Mainz.
67. Sanchezferrer, A., et al., *Tyrosinase - a Comprehensive Review of Its Mechanism*. Biochimica Et Biophysica Acta-Protein Structure and Molecular Enzymology, 1995. **1247**(1): p. 1-11.
68. Schneider, I. and A. Hahn, *Institut für Lebensmittelwissenschaften und Humanernährung, Hannover*. 2011.
69. www.slendesta.com. [cited 07. Februar 2013].
70. Hahn, A., A. Ströhle, and M. Wolters, *Ernährung - Physiologische Grundlagen, Prävention, Therapie*. 2002, Hannover: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH.
71. Peikin, S.R., et al., *Oral administration of proteinase inhibitor II from potatoes stimulates release of cholecystokinin in man*. In preperation.
72. Meisel, H. and R.J. FitzGerald, *Biofunctional peptides from milk proteins: Mineral binding and cytomodulatory effects*. Current Pharmaceutical Design, 2003. **9**(16): p. 1289-1295.
73. Hata, Y., et al., *Placebo-controlled study of the effect of sour milk on blood pressure in hypertensive subjects*. American Journal of Clinical Nutrition, 1996. **64**(5): p. 767-771.
74. Rinderknecht, H., et al., *Mesotrypsin: a new inhibitor-resistant protease from a zymogen in human pancreatic tissue and fluid*. Gastroenterology, 1984. **86**(4): p. 681-92.
75. Gerding, J., *Analyse und Charakterisierung von Peptiden aus der Proteaseinhibitor-Fraktion von Kartoffelfruchtwasserproteinen, in Masterarbeit Universität Hannover*. 2011.
76. Nielsen, P.M., D. Petersen, and C. Dambmann, *Improved method for determining food protein degree of hydrolysis*. Journal of Food Science, 2001. **66**(5): p. 642-646.
77. <http://web.expasy.org/findpept/>. [cited 26.Februar 2013].
78. Pellegrini, N., et al., *Total antioxidant capacity of plant foods, beverages and oils consumed in Italy assessed by three different in vitro assays*. Journal of Nutrition, 2003. **133**(9): p. 2812-2819.
79. Pan, M., T. Jiang, and J. Pan, *Antioxidant Activities of Rapeseed Protein Hydrolysates*. Food and Bioprocess Technology. **4**(7): p. 1144-1152.

80. Gao, R.M., et al., *Mechanism of pyrogallol autoxidation and determination of superoxide dismutase enzyme activity*. Bioelectrochemistry and Bioenergetics, 1998. **45**(1): p. 41-45.
81. Li, Y.H., et al., *Antioxidant and free radical-scavenging activities of chickpea protein hydrolysate (CPH)*. Food Chemistry, 2008. **106**(2): p. 444-450.
82. Xie, Z.J., et al., *Antioxidant activity of peptides isolated from alfalfa leaf protein hydrolysate*. Food Chemistry, 2008. **111**(2): p. 370-376.
83. Fogliano, V., et al., *Method for measuring antioxidant activity and its application to monitoring the antioxidant capacity of wines*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1999. **47**(3): p. 1035-1040.
84. Wu, J.P., R.E. Aluko, and A.D. Muir, *Improved method for direct high-performance liquid chromatography assay of angiotensin-converting enzyme-catalyzed reactions*. Journal of Chromatography A, 2002. **950**(1-2): p. 125-130.
85. Hayes, M., et al., *Casein fermentate of Lactobacillus animalis DPC6134 contains a range of novel propeptide angiotensin-converting enzyme inhibitors*. Applied and Environmental Microbiology, 2007. **73**(14): p. 4658-4667.
86. Miguel, M., et al., *ACE-inhibitory and antihypertensive properties of a bovine casein hydrolysate*. Food Chemistry, 2009. **112**(1): p. 211-214.
87. Yeaman, M.R. and N.Y. Yount, *Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance*. Pharmacological Reviews, 2003. **55**(1): p. 27-55.
88. Inouye, K., et al., *Effects of Thermal Treatment on the Coagulation of Soy Proteins Induced by Subtilisin Carlsberg (vol 57, pg 717, 2009)*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2009. **57**(24): p. 11581-11581.
89. Li, G.H., et al., *Direct spectrophotometric measurement of angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity for screening bioactive peptides*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2005. **37**(2): p. 219-224.
90. Sigma-Aldrich. *Sigma Quality control Test Procedure, Enzymatic Assay of Pepsin*. [cited 2013].
91. Sigma-Aldrich. *Sigma Quality control Test Procedure, Enzymatic Assay of Papain*. [cited 2013].
92. Wang, L.L. and Y.L.L. Xiong, *Inhibition of lipid oxidation in cooked beef patties by hydrolyzed potato protein is related to its reducing and radical scavenging ability*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005. **53**(23): p. 9186-9192.
93. Davalos, A., C. Gomez-Cordoves, and B. Bartolome, *Extending applicability of the oxygen radical absorbance capacity (ORAC-fluorescein) assay*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2004. **52**(1): p. 48-54.
94. Pepelanova, I., *The Digestion of Functional Ingredients by Detergent Enzymes*. Master Thesis, Universität Hannover, 2007.
95. Gurer, H., et al., *Captopril as an antioxidant in lead-exposed Fischer 344 rats*. Human & Experimental Toxicology, 1999. **18**(1): p. 27-32.
96. *Nomenclature and Symbolism for Amino-Acids and Peptides*. Pure and Applied Chemistry, 1984. **56**(5): p. 595-624.
97. micromass, *TofSpec 2E/M@ldi Sample Preparation*. 2008.
98. PIERCE, *Comassie Plus, the Bradford Assay Kit*. 23236 product information.
99. PIERCE, *Modified Lowry Protein Assay Kit*. 23240 product information.
100. Candiano, G., et al., *Blue silver: A very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis*. Electrophoresis, 2004. **25**(9): p. 1327-1333.

Kooperierende Arbeiten

Die vorgelegte Dissertation entstand im Rahmen des Niedersächsischen Verbundprojekts FAEN (Forschungsverbund Agrar- und Ernährungswissenschaften Niedersachsen).

Im Rahmen dieser Dissertation wurde ein Teil der praktischen Arbeiten für studentische Abschlussarbeiten zur Verfügung gestellt. Die Tätigkeiten hierzu entstanden nach Vorgabe von und in Zusammenarbeit mit der Autorin. Die beteiligten Personen wurden ggf. im Text erwähnt. In Tabelle 37 sind die unterstützenden Tätigkeiten aufgelistet.

Tabelle 37: Unterstützende Tätigkeiten am Gesamtprojekt.

Unterstützende Tätigkeiten am Gesamtprojekt	Beteiligte Personen
Praktische Arbeiten im Rahmen der Masterarbeit	J. Gerding, Institut für Technische Chemie, Leibniz Universität Hannover
Praktische Arbeiten im Rahmen der Bachelorarbeit	H. Kluge, Institut für Technische Chemie, Leibniz Universität Hannover
Humanernährungsstudie	Prof. Dr. A. Hahn und Dr. I. Schneider, Institut für Lebensmittelwissenschaft und Humanernährung, Leibniz Universität Hannover

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Isabelle Schoenbeck
Geburtsdatum: 17. November 1981
Geburtsort: Hannover
E-Mail: isabelleschoenbeck@web.de
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig, keine Kinder

Ausbildung:

2013 **Promotion** am Institut für Technische Chemie
Thema: vorliegende Arbeit

10/2009 – 09/2012 **Wissenschaftliche Mitarbeiterin**
Gottfried Wilhelm Leibniz-Universität Hannover,
unter der Leitung von Prof. Dr. Thomas Scheper

07/2007 – 01/2008 **Examensarbeit** am Institut für Technische Chemie,
Gottfried Wilhelm Leibniz-Universität Hannover,
unter der Leitung von Prof. Dr. Thomas Scheper; Note: 1,5

10/2001 – 06/2009 **Lehramtstudium (1. Staatsexamen)**
Gottfried Wilhelm Leibniz-Universität Hannover,
Schwerpunkt Lebensmittelwissenschaften/ Chemie; Note: 1,9

1995 – 2001 **Schülerin**
Karl Friedrich Gauß Schule, 30966 Hemmingen
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife; Note: 3,0

Publikationsliste:

Vorträge

- I. Schoenbeck, J. Gerding, S. Beutel, T. Scheper (09/2012); Bioaktive Peptide aus Kartoffelproteinen (ProzessNet-Jahrestagung und 30. DECHEMA Jahrestagung der Biotechnologen; Karlsruhe)
- I. Schoenbeck, S. Beutel, T. Scheper (09/2011); Bioactive Peptides of Patatin the Major Potato Storage Protein (1st European Congress of Applied Biotechnology; Berlin)
- I. Schoenbeck, A. Graf, S. Beutel, T. Scheper (10/2010); Hochwertige Proteine und Peptide aus Kartoffelfruchtwasser (Biotechnological Innovation in Food, Biotechnica; Hannover)

Posterbeiträge

- I. Schoenbeck, S. Beutel, T. Scheper (03/2012); Aufreinigung von Kartoffelproteinen durch innovative Membranadsorbertechnik (Informationstag Membrantechnik, Membranverfahren in der Biotechnologie; Frankfurt)
- I. Schoenbeck, S. Beutel, T. Scheper (11/2011); Bioactive Peptides derived from Potato Proteins (7th Status Seminar on Chemical Biology; Frankfurt)
- I. Schoenbeck, S. Beutel, T. Scheper (10/2010); Gewinnung hochwertiger funktioneller Inhaltsstoffe aus Kartoffelfruchtwasser (ProcessNet-Jahrestagung 2010 und 28. DECHEMA Jahrestagung der Biotechnologen; Aachen)

Veröffentlichungen

- S. Holz, I. Schoenbeck, M. Stanke, M. Hartlep, J. Peters, R. Winter, S. Beutel, B. Hitzmann, T. Scheper (2011); Onlineanalyse von Proteinen mittels Ultraschall - der „PROTEINMONITOR“; Einreichung eines Kurzpapiers zur Veröffentlichung im Tagungsband „Dresdner Beiträge zur Sensorik“, TUPress Verlag der Wissenschaften GmbH