

Proteolytische Keramikkapillaren für die präparative Produktion von bioaktiven Peptiden

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

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

genehmigte Dissertation

von

Tim Sewczyk, M.Sc. RWTH
geboren am 09.10.1987 in Minden

2020

Referent: Prof. Dr. Thomas Scheper
Institut für Technische Chemie
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

Korreferent: PD. Dr. Sascha Beutel
Institut für technische Chemie
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

Tag der Promotion: 19.03.2020

Sapere aude!

Habe Mut, dich deines eigenen Verstandes zu bedienen!

Leitsatz der Aufklärung, Immanuel Kant

Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle sehr herzlich bei Herrn **Prof. Dr. Thomas Scheper** dafür bedanken, dass mir die Möglichkeit eingeräumt wurde am Institut für Technische Chemie promovieren zu dürfen. **PD Dr. Sascha Beutel** möchte ich für die Bereitstellung des Projekts und die Betreuung während der Promotionszeit danken. Auch möchte ich mich für die große Freiheit bei der Ausgestaltung des Themas und das dabei entgegengebrachte Vertrauen bedanken. Des Weiteren danke ich ihm für die Übernahme des Korreferats. Für die Übernahme Prüfungsvorsitzes danke ich **Prof. Dr., Dr. Ing Ralf Günter Berger**.

Großer Dank geht auch an die Mitarbeiter des Instituts für technische Chemie. Dabei vor allem an **Martina Weiß** für die freundliche und kompetente Betreuung bei allen technischen Fragen, an **Martin Pähler** für die schnelle Versorgung mit Laborbedarf, an **Cornelia Alic** aus dem Sekretariat, an **Ulrike Dreschel** für die Hilfe bei allen finanziellen Fragen und an **Dr. Ivo Havlik** und **Michael Dors** bei allen computertechnischen Belangen. Der Elektrowerkstatt mit **Thorleif Hentrop** und **Kai Patzer** danke ich für die Hilfe mit meinen Sonderwünschen und elektronischen Problemen bei vielen Laborgeräten. Bei **Thorsten Stempel** und **Friedbert Gellermann** sowie den Auszubildenden aus der Werkstatt bedanke ich mich für die Unterstützung bei der technischen Realisierung des Kapillarmoduls. Dank gilt auch der „Königin der Tomaten“ **Dr. Antonina Lavrentieva** für die vielen heiteren Unterhaltungen und der freundlichen Unterstützung in der Zellkultur, **Dr. Iliyana Pepelanova** mit ihrer motivierenden, begeisternden Art für die lustigen Gespräche, sowie **Dr. Christian Lindner** und **Dr. Janina Bahnemann**. **Dr. Christian Ude** danke ich besonders für die inspirierenden Gespräche im Technikum aus den Bereichen der Wissenschaft, der Technik und des Weltgeschehens.

Ich danke **Dr. Gerald Dräger** aus dem Institut für organische Chemie für die Hilfe bei den Untersuchungen mit dem Massenspektrometer und dem NMR sowie der Bearbeitung der Daten und den freundlichen Gesprächen aus der Aquaristik.

Dank gilt auch **Samuel Edward Hakim** und **Lorn Messner** für die Unterstützung mit ihren Arbeiten der Bachelor- bzw. Masterthesis und natürlich allen anderen betreuten Studenten während der Promotionszeit.

Danksagung

Meinen Kooperationspartnern **Marieke Hoog Antink** und **Dr. Michael Maas** von der Universität Bremen danke ich für die gute und spannende Zusammenarbeit und die vielen unterhaltsamen und aufschlussreichen Gespräche aus dem Wissenschaftsalltag. Weiter natürlich auch für die schnelle Herstellung und Lieferung von neuen Kapillaren.

Dem Hochschulbüro für Internationales danke ich für die Einblicke in den Hochschulalltag, dabei besonders **Markus Remmers** für die vielen guten Unterhaltungen und die kulinarischen mittäglichen Highlights.

Meinen **Mindener Freunden** möchte ich für die vielen Erlebnisse, Unternehmungen, etc. während meines Studiums danken. Ich bin froh euch zu haben und mit jedem von euch doch die eine oder andere Geschichte erzählen zu können.

Meiner Familie möchte ich an dieser Stelle ganz besonders für ihre Unterstützung und den Glauben an mich während des Studiums danken. Danke für die stetige Möglichkeit von kurzen, erholsamen Urlauben in der Heimat, die ich jederzeit genießen konnte. Dabei sei speziell mein Onkel **Günter Teichmann** genannt, ohne den ich vielleicht keine akademische Laufbahn eingeschlagen hätte.

Vielen, vielen Dank auch an meine lieben Freunde aus der Doktorzeit; **Dr. Harshvardhan Modh, Sijia Lee, Dr. Stefanie Thoms, Xenia Kraus** und meinen weiteren Bürokollegen für die lustigen Gespräche und Abende. Dank gilt auch meinen Nachbarn **Dwayne Dixon** und **Janina Herrmann** für die zahlreichen vielen wunderbaren Gespräche und tollen Kochabende, die mein Leben während der Zeit der Promotion sehr bereichert haben.

Der größte Dank gilt meiner Familie und Freunden. Waren es das ein oder andere Bier bei politisch-philosophischen Gesprächen mit Onkel und Vater in der heimischen Gartenhütte, die Albereien mit meinem Neffen, meine vielen Reisen zu den unterschiedlichsten Kulturen und Ländern der Welt oder die unzähligen, unvergesslichen Erlebnisse mit guten Freunden; ich bin sehr dankbar für diese schönen Jahre und dass sie Teil meines Lebens sind. Sie haben mir geholfen meinen Horizont zu erweitern und über mich hinauszuwachsen.

Kurzfassung

Bioaktive Peptide sind Bestandteil vieler natürlicher Nahrungsmittel. Die bioaktive Wirkung dieser Peptide umfasst antimikrobielle, antikanzerogene, antihypertensive oder antioxidative Eigenschaften. Gebildet werden diese Wirkstoffe durch proteolytische Hydrolyse tierischer als auch pflanzlicher Proteine. Lebensmittelproteinhydrolysate werden oft in unspezifischen enzymatischen Batch-Prozessen hergestellt. Dabei unterliegt die Hydrolysatzusammensetzung prozessbedingten Schwankungen, so dass der erhaltene chromatografische Peptidfingerprint und die bioaktiven Eigenschaften variieren.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Entwicklung eines kontinuierlichen biokatalytischen Prozesses für die Herstellung bioaktiver Peptide. Ein Reaktormodul zur Verwendung proteolytischer Keramikkapillaren im kontinuierlichen Betrieb wurde entwickelt, charakterisiert und die Eignung verschiedener auf natürlichen Proteinquellen basierender Proteinfeeds evaluiert. Eine kovalente Immobilisierungsmethode zur Immobilisierung von Alcalase auf den APTES-silanisierten Keramikkapillaren konnte untersucht und etabliert werden. Dadurch war eine Flussraten-abhängige Hydrolyse zur Erzeugung spezifischer und definierter Peptidfingerprints möglich. Eine Aufreinigungsstrategie zur Isolation von bioaktiven Peptiden über RP-FPLC Fraktionierung und Lyophilisation wurde getestet und mehrere Bioscreenings zur Detektion von bioaktiven Peptiden aus Lupinenproteinhydrolysat angewandt. Dabei konnten sowohl antioxidative als auch antihypertensive Eigenschaften in den Peptidfraktionen nachgewiesen werden. Die Peptide wurden über UHPLC-ESI-Q-ToF-MS unter Zunahme eines Datenbankenabgleichs und *in silico* Verdaus analysiert und charakterisiert.

Schlüsselwörter: Bioaktive Peptide, Kontinuierliche Biokatalyse, Proteolytische Kapillaren

Abstract

Bioactive peptides are found in many natural food sources. Their bioactive potential includes antimicrobial, anticarcinogenic, antihypertensive or antioxidative properties. They are formed by proteolytic hydrolysis of animal and plant proteins. Food protein hydrolysates are often produced in industrial batch processes. The hydrolysate composition is subject to process-related fluctuations. As a result, the obtained peptide fingerprint and the bioactive properties vary.

The present work deals with the development of a biocatalytic continuous process for the production of bioactive peptides. A reactor module for the use of proteolytic ceramic capillaries was developed, characterized and the applicability of a number of protein feeds based on natural protein sources evaluated. A covalent immobilization method of Alcalase on APTES-silanized ceramic capillaries was investigated and established. Thus, a flow rate-dependent hydrolysis for the production of specific and defined peptide fingerprints was possible. A purification strategy for the isolation of bioactive peptides via RP-FPLC fractionation and lyophilisation was tested and several bioscreenings for the detection of bioactive peptides from lupine protein hydrolysate were applied. Both antioxidative and antihypertensive properties were detected in the peptide fractions. The peptides were analyzed and characterized by UHPLC-ESI-Q-ToF-MS *in silico* digestion and by database comparison.

Keywords: Bioactive Peptides, Continuous Biocatalysis, Proteolytic Capillaries

Publikationsliste

Fachartikel

Sewczyk, T. (85%), Antink, M. H., Maas, M., Kroll, S., Beutel, S. (2018). Flow rate dependent continuous hydrolysis of protein isolates. *AMB Express*, 8(1), 18

Verantwortungsbereiche: Durchführung und Planung der Experimente und Analysen, sowie Auswertung und Manuskripterfassung

Marieke Hoog Antink, Tim Sewczyk (10%), Stephen Kroll, Pál Árki, Sascha Beutel, Kuroschi Rezwan, Michael Maas (2019), Proteolytic ceramic capillary membranes for the production of peptides under flow. *Biochemical Engineering Journal*, 147, 89-99

Verantwortungsbereiche: Entwicklung der Methodik, Diskussion der Ergebnisse und die Kontrolle des Manuskripts

Konferenzbeiträge

Sewczyk T., Hoog Antink M., Maas M., Beutel S. (2018): Continuous protein hydrolysis for the production of bioactive peptides, BioCat 2018, Hamburg (Poster/ Vortrag)

Sewczyk T., Scheper T., Beutel S (2018): Immobilized proteases for industrial bioactive peptide production, 16th Naples Workshop on Bioactive Peptides, Neapel, Italien (Vortrag)

Sewczyk T., Hoog Antink M., Kroll S., Scheper T., Beutel S.(2016): Proteolytic ceramic capillary membranes for the preparative production of bioactive peptides, BioCat 2016, Hamburg (Poster)

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	II
Kurzfassung	IV
Abstract	V
Publikationsliste	VI
Inhaltsverzeichnis	VII
Kooperationen.....	IX
Abkürzungsverzeichnis	X
1 Einleitung.....	1
2 Zielsetzung.....	2
3 Theoretische Grundlagen	3
3.1 Bioaktive Peptide.....	3
3.1.1 Was sind bioaktive Peptide?	3
3.1.2 Bioaktive Peptide aus natürlichen Proteinquellen in der Industrie	5
3.1.3 Bioaktive Peptide in funktionellen Lebensmitteln	7
3.1.4 Nachweis bioaktiver Peptide mit Bioaktivitätsassays	8
3.1.5 Messung der antioxidativen Kapazität	9
3.1.6 Nachweis der antihypertensiven Eigenschaften	10
3.1.7 Nachweis antimikrobieller Peptide	11
3.1.8 Nachweis antikanzero gener Peptide.....	13
3.2 Proteinquellen.....	14
3.2.1 Proteinisolate in der Industrie.....	14
3.2.2 Proteine der Süßlupine.....	15
3.3 Enzyme	18
3.3.1 Proteasen.....	18
3.4 Durchflussbiokatalyse zur Herstellung bioaktiver Peptide	19
3.4.1 Prinzip der Immobilisierung	19
3.4.2 Das Modul des Keramikmembranreaktors.....	21
3.4.3 Aufreinigung des Proteinhydrolysats	23
3.4.4 Sequenzierung von BAPs	24
4 Experimentelle Grundlagen.....	25
4.1 Die kontinuierliche Biokatalyse	25
4.1.1 Entwicklung eines proteolytischen Kapillarmoduls.....	25

Inhaltsverzeichnis

4.1.2	Proteinfeeds für die kontinuierliche Hydrolyse	37
4.1.3	Fazit	43
4.2	Aufreinigung der Peptide	44
4.2.1	Entwicklung der Peptidseparation des Lupinenhydrolysats an der RP-HPLC	45
4.2.2	Upscaling auf die präparative RP-FPLC.....	48
4.2.3	Entwicklung der Lyophilisation.....	51
4.2.4	Fazit	52
4.3	Bioscreening der Lupinenproteinhydrolysatfraktionen	53
4.3.1	Untersuchung der antioxidativen Kapazität.....	55
4.3.2	Untersuchung der antihypertensiven Eigenschaften.....	58
4.3.3	Untersuchung der antimikrobiellen Eigenschaften.....	61
4.3.4	Untersuchung der antikanzerogenen Eigenschaften	66
4.3.5	Fazit	68
4.4	Massenspektrometrische Analyse der Peptidfraktionen	70
4.4.1	Analyse der Peptidsequenzen über UHPLC-ESI-QTOF-MS	72
4.4.2	Tandem-massenspektrometrische Analyse der bioaktiven Substanz.....	76
4.4.3	Fazit	78
5	Diskussion und Ausblick	79
6	Anhang.....	82
6.1	Ergänzende Daten	82
6.2	Methoden.....	91
	Geräteverzeichnis.....	97
	Chemikalienverzeichnis.....	100
	Abbildungsverzeichnis.....	103
	Tabellenverzeichnis	105
	Literaturverzeichnis.....	106
	Unterstützende Arbeiten	119
	Lebenslauf	120

Kooperationen

Dieses Projekt wurde durch eine Förderung der Deutschen Forschungsgesellschaft (DFG) ermöglicht. Die hauptsächliche Kooperation fand zwischen der Leibniz Universität Hannover und der Universität Bremen statt. Hierbei sind vor allem:

Dr. Michael Maas

Universität Bremen

Advanced Ceramics /Keramische Werkstoffe und Bauteile

Am Biologischen Garten 2

28359 Bremen

und

Dr. Stephen Kroll

Hochschule Hannover

Institut für Biokunststoffe und Bioverbundwerkstoffe

Heisterbergallee 10A

30453 Hannover

zu nennen.

Abkürzungsverzeichnis

µL	Mikroliter
AAPH	2,2'-Azobis(2-methyl-propionamidin)-dihydrochlorid
ACE	Angiotensin Converting Enzyme
ACN	Acetonitril
ACP	Anti Cancerogenous Peptides
ADH	Antidiuretisches Hormon
AEBSF	4-(2-Aminoethyl)benzensulfonylfluorid
AMP	Antimikrobielle Peptide
APDIPES	(3-aminopropyl)diisopropylethoxysilane
API	Active Pharmaceutical Ingredient
APS	Ammoniumpersulfat
APTES	(3-Aminopropyl)triethoxysilane
AS	Aminosäure
AUC	Area under the curve
BAN	Boc-L-alanine p-nitrophenyl ester
BAP	Bioaktive Peptide
BCA	Bicinchoninsäure
BLAST	Basic local alignment search tool
BSA	Bovine Serum Albumin
CTB	CellTiter-Blue®
CVD	Kardiovaskulären Erkrankungen
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDC	N-3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimid
EMR	Enzymmembranreaktor
FA	Ameisensäure
FKS	Fetales Kälberserum
FL	Fluorescein
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
G	Gravitationskraft

Abkürzungsverzeichnis

g/L	Gramm/Liter
HA	Hippursäure
HHL	Histidyl-Hippuryl-L-Leucin
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
IPP	Isoleucin-Prolin-Prolin
kDa	Kilodalton
mbar	Millibar
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
mL	Milliliter
MS	Massenspektrometrie
mU	Milliunits
n.v.	nicht vorhanden
NHS	N-Hydroxysuccinamid
nm	Nanometer
OD	Optische Dichte
OD ₆₀₀	Extinktion bei 600 nanometer
ORAC	Oxygen Radical Absorbance Capacity
p-NP	p-Nitrophenol
Pen-Strep	Penicillin-Streptomycin
PEP	Prolyl-endo-Peptidase
PES	Polyethersulfon
PTFE	Polytetrafluorethylen
Q-ToF	Quadrupole Time of Flight
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RNA	Ribonukleinsäure
RP-HPLC	Umkehrphase Hochleistungsflüssigchromatographie
R _t	Retentionszeit
S	Svedberg Einheit
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfat- Polyacrylamid Gel Elektrophorese
SPPS	Solid Phase Peptide Synthesis
TE	Troloxäquivalent
TEMED	Tetramethylethylendiamin

Abkürzungsverzeichnis

TFA	Trifluoressigsäure
TRH	Thyrotropin releasing Hormone
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Trolox	(±)-6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid
UHPLC	Ultra High Performance Liquid Chromatography
VE-Wasser	Vollentsalztes Wasser

Aminosäure	Dreibuchstabencode	Einbuchstabencode
Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Asparaginsäure	Asp	D
Cystein	Cys	C
Glutamin	Gln	Q
Glutaminsäure	Glu	E
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V
Selenocystein	Sec	U
Pyrrolysin	Pyl	O
Beliebige AS	Xaa	X

1 Einleitung

Die klinische Erforschung und Entwicklung von Peptidwirkstoffen gewann in den letzten Jahren stark an Relevanz. Über 60 Peptidwirkstoffe wurden bisher in den USA, Europa und Japan zugelassen und über 150 sind in klinischer Entwicklung bzw. befinden sich weitere 260 in der klinischen Phase [1]. Die Vielfalt ist dabei enorm, so sind allein bei den antimikrobiellen Peptiden, als möglicher Antibiotikum-Ersatz, inzwischen mehr als 3.000 Peptidsequenzen bekannt [2]

Bioaktive Peptide stellen eine eigene Klasse von pharmazeutischen Wirkstoffen dar. Größentechnisch sind sie im Bereich zwischen den Small Molecules und den Proteinen anzusiedeln, wobei sie Peptidlängen von 2 – 40 Aminosäuren oder bei Makropeptiden sogar bis zu 100 Aminosäuren aufweisen können. Eines der prominentesten Beispiele für den therapeutischen Einsatz von Peptiden ist die medizinische Verwendung von Insulin. Dabei handelt es sich um ein Peptidhormon mit Blutzuckerspiegel senkenden Eigenschaften, welches um 1920 erstmals isoliert und klinisch angewandt wurde. Die bioaktiven Eigenschaften können jedoch auch weitere Funktionen umfassen. So sind vor allem die blutdrucksenkenden, antioxidativen oder die oben erwähnten antimikrobiellen Eigenschaften zu nennen.

Die Peptidsequenzen liegen, vor vorzeitigem Verdau geschützt, inaktiviert in den Proteinen vor oder werden zunächst als Propeptide synthetisiert. Durch den enzymatischen Verdau mittels Proteasen, welche sich beim Menschen im Verdauungstrakt befinden, werden diese freigesetzt bzw. aktiviert. Durch Resorption entfalten sie im menschlichen Körper ihre bioaktive Wirkung. Die Proteinhydrolysate können sowohl aus tierischen, als auch pflanzlichen Proteinquellen erzeugt werden. In der Industrie werden die Proteinhydrolysate meist durch den Einsatz von Säuren in Totalhydrolysen oder unter Verwendung von Enzymen in partiellen Hydrolysen, erzeugt. Dabei sind natürliche, prozessbedingte Schwankungen die Regel. Der Fortschritt in der Technik ermöglicht heutzutage alternative Prozesse zur kontrollierten Herstellung definierter Proteinhydrolysate.

2 Zielsetzung

Ziel ist die Herstellung bioaktiver Peptide im präparativen Maßstab mittels kovalent auf makroporösen Keramikkapillarmembranen immobilisierten Proteasen. Unter Verwendung eines Proteinfeeds soll ein robustes und skalierbares Reaktorsystem entwickelt und evaluiert werden. Durch das Reaktorsystem soll der Grad der enzymatischen Hydrolyse über die Betriebsbedingungen und somit die Proteaseaktivität regulierbar sein, um definierte und reproduzierbare Peptidfingerprints zu erzeugen. Die aus den Proteinen hergestellten Peptide werden im präparativen Maßstab über Reversed Phase Chromatographie separiert und aufgereinigt. Die Isolate sollen anschließend mit standardisierten Bioaktivitätsassays auf ihre bioaktiven Eigenschaften untersucht und Peptidsequenzen über massenspektrometrische Analysen charakterisiert werden.

3 Theoretische Grundlagen

3.1 Bioaktive Peptide

3.1.1 Was sind bioaktive Peptide?

Das Wort „Peptid“ stammt von dem altgriechischen „Peptós“ ab, welches mit „verdaut“ oder „gekocht“ übersetzt werden kann [3]. Die Proteine, die wir mit der Nahrung zu uns nehmen, liefern dem Körper nicht nur Energie, sondern vor allem wichtige Grundbausteine für den Aufbau von Organen, Muskeln, Blut, aber auch Enzymen und Hormonen. Die Aminosäuren (AS) werden durch anabole Prozesse entweder zu kurzkettigen Oligopeptiden (2-10 AS), Polypeptiden (11-100 AS) oder Makropeptiden (>100 AS) synthetisiert und können unterschiedliche Funktionen erfüllen.

Eine Klasse von Peptiden besitzt eine, durch ihre Struktur bzw. Aminosäuresequenz gegebene, physiologische Funktion. Erst durch den proteolytischen Verdau der Proteine im Verdauungstrakt werden die verschlüsselten physiologischen Eigenschaften aktiviert. Durch Resorption über die Schleimhaute entfalten die Peptide ihre bioaktive Wirkung im Körper [4]. Die bioaktiven Eigenschaften können sehr vielfältig sein (siehe Abbildung 1) und sind auf die Peptide zurückzuführen, sodass diese Klasse als bioaktive Peptide (BAP) bezeichnet wird.

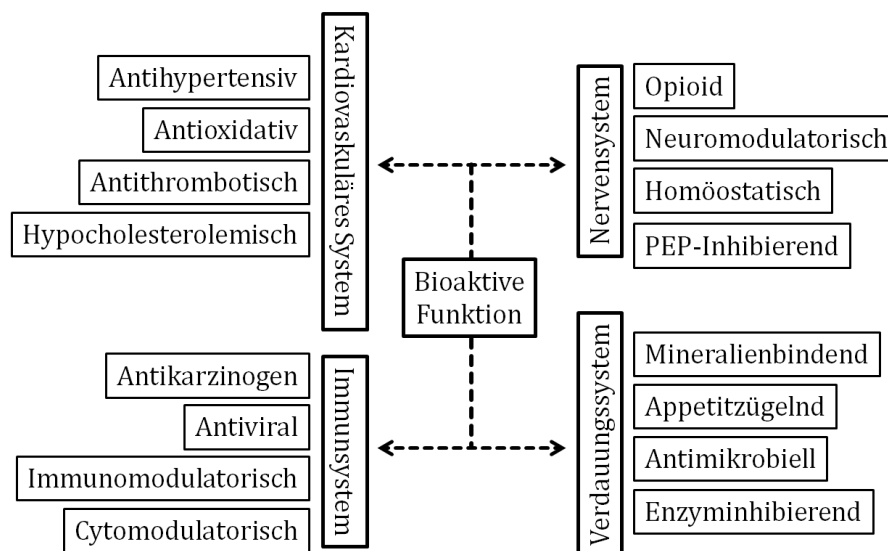


Abbildung 1: Wirkungsweisen von bioaktiven Peptiden (modifiziert nach [5])

Über die Blutbahn gelangen die BAPs in den gesamten Körper, um zum Beispiel im Nervensystem Opioid-ähnlich zu wirken [6] oder um das Immunsystem zu beeinflussen [7]. Im Allgemeinen wurde besonders in Milchproteinen eine Vielzahl an verschlüsselten

BAPs mit unterschiedlichen Funktionen entdeckt [8], [9], [10]. Erste aus Nahrungsmitteln erzeugte Opioid-ähnliche Peptide stammen aus dem Milchprotein Casein und werden daher Casomorphine genannt [6]. Des Weiteren besitzen aus Casein stammende Casokinine antihypertensive Eigenschaften [9] und nehmen direkten Einfluss auf den Blutdruck. Andere BAPs wirken lokal auf das Verdauungssystem, indem der Appetit gezügelt wird [11]. Die Milchproteine gehören zu den bestuntersuchten Proteinquellen für bioaktive Peptide. Bisher sind über 944 BAPs bekannt [12].

Neben den positiven oder regulatorischen Effekten der bioaktiven Peptide auf den menschlichen Körper, haben auch Tiere peptidbasierte Stoffe entwickelt. So bestehen viele Tiergifte aus niedermolekularen Peptidtoxinen. Aus dem Speichel des Egels (*Hirudo medicinalis*) konnte ein 65 AS langes Peptid isoliert werden, welches durch Thrombininhibition die Blutgerinnung hemmen kann [13]. Captopril hingegen ist ein bekanntes Mittel zur Blutdrucksenkung und wurde auf Grundlage eines Prolin-reichen Peptidtoxins entwickelt, welches aus dem Gift der Jararaca-Lanzenotter (*Bothrops jararaca*) isoliert wurde [14]. Doch auch viele andere Organismen sind in der Lage bioaktive Peptide zu sekretieren. So konnte man diese unter anderem bei Bakterien [15], Amphibien [16] und vielen Meeresbewohnern [17] finden (siehe Tabelle 1).

Tabelle 1: Bioaktive Peptide unterschiedlichen Ursprungs und ihre Funktion

Protein	Ursprung	Funktion	AS-Sequenz	Referenz
Gewebe	Schwamm	Antikanzerogen	Tripeptid	[18]
β -Casein	Bovine Milch	Antihypertensiv	KVLPVPQ	[19]
Apalbumin 2	Bienenhonig	Antihypertensiv	AHLL	[20]
Hautsekret	Goldlaubfrosch	Antimikrobiell	GLFDIIKKIAESF	[16]
Glutelin	Amaranth	Antikanzerogen	43 AS	[21]
β -Conglycinin	Sojabohne	Antioxidativ	VNPHDHQN	[22]
TRH	Mensch	Neuropeptid	HP	[23]

Die bekannten Wirkungsweisen von bioaktiven Peptide haben also in den letzten Jahren stetig zugenommen und einige Funktionen sind inzwischen gut erforscht. Die Entdeckungen der letzten Jahre lassen das Interesse an bioaktiven Peptiden für therapeutische Ansätze oder als Alternative für die Behandlung von multiresistenten Keimen wachsen. Besonders das Vorkommen von antimikrobiellen Peptiden (AMP) wurde bisher stark unterschätzt. Inzwischen lässt sich sagen, dass nahezu überall dort wo

Organismen sich gegen ihre Umwelt schützen müssen AMPs entdeckt werden können. Dabei beschränkt sich deren Wirkung nicht nur auf die Abwehr von Bakterien, sondern umfasst unter anderem auch antifungizide, antivirale, antiprotistische oder insektizide Wirkungen. Eine eigens angelegte Datenbank führt über 14.420 Einträge allein zu AMPs [24]. Fasst man alle Datenbanken und bekannten Sequenzen zusammen, so kommt man auf eine Zahl von über 28.334 Einträgen für bioaktive Peptide [2].

3.1.2 Bioaktive Peptide aus natürlichen Proteinquellen in der Industrie

Zur industriellen Hydrolyse von Proteinen werden unterschiedliche Methoden angewandt. Bei chemischen Verfahren, wie zum Beispiel der sauren Hydrolyse, werden Salzsäuren zum Ansäuern und Natriumhydroxid zur anschließenden Neutralisation verwendet. Da große Mengen an Chemikalien und hohe Temperaturen verwendet werden, gelten diese Verfahren als sehr aggressive Methoden. Sie haben zum Nachteil, dass manche der zu hydrolysierenden Proteinbestandteile in sehr saurem Milieu stabiler sind [25] oder dass einzelne Aminosäuren freigesetzt bzw. zersetzt werden können. Zur Erzeugung von BAPs sind sie daher weniger verbreitet. Als mildes Verfahren wird hingegen die enzymatische Hydrolyse oder auch Proteolyse bezeichnet (siehe Abbildung 2). Exo- oder Endoproteasen spalten die Proteine durch Hydrolyse der Peptidbindung. Dies erfolgt abhängig von der verwendeten Protease an spezifischen oder unspezifischen Aminosäuresequenzen. Da die meisten Enzyme aus lebenden Organismen stammen, liegt ihr Aktivitätsoptimum vorwiegend bei einer Temperatur von 37°C (siehe Abschnitt 3.2.1). Dadurch sind sie für den Einsatz in industriellen Anwendungen besonders im Bereich der Lebensmittel interessant.

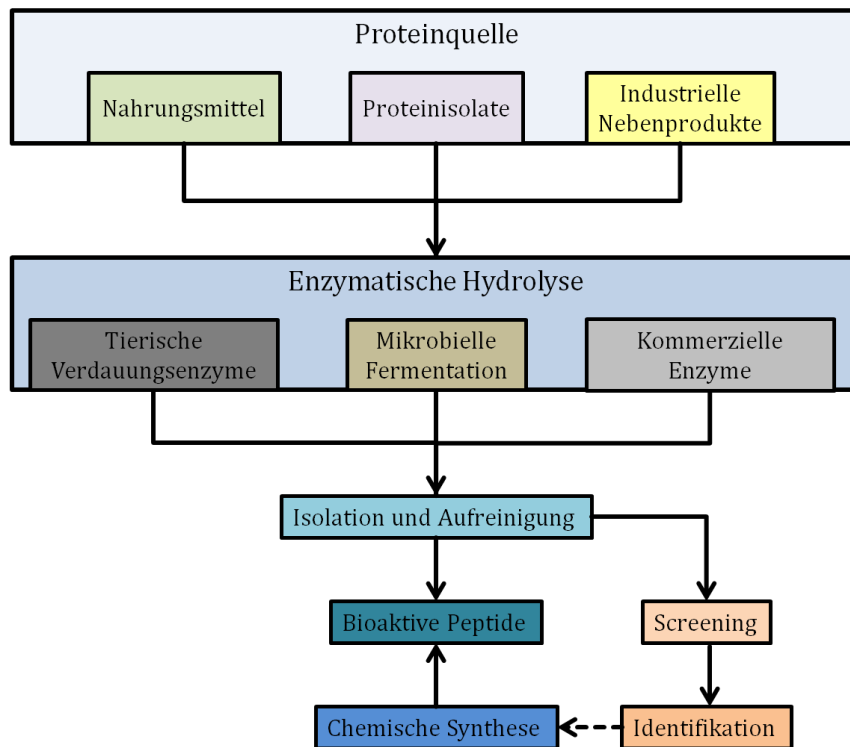


Abbildung 2: Enzymatische Herstellung und Screening von bioaktiven Peptiden
(Modifiziert nach [1])

Die verwendeten Enzyme können unterschiedlichen Ursprungs sein. So werden in der Käseherstellung überwiegend tierische Enzyme, in Form von Kälberlab, verwendet. Mit gezieltem Einsatz von gastrointestinalen Enzymen wie Pepsin oder Trypsin, werden Proteinhydrolysate hergestellt, welche vom Körper besser resorbiert werden können. Diese Methode eignet sich daher speziell für die Herstellung von Säuglingsnahrung und wird weltweit eingesetzt, um die hohe Nachfrage an Proteinhydrolysaten aus Milcheiweiß zu bedienen.

Eine weitere Möglichkeit stellt die mikrobielle Fermentation der organischen Stoffe dar [27]. In diversen typischen Fermentationsprodukten wie Käse [28] oder Joghurt [29] konnten bioaktive Peptide nachgewiesen werden. Man fand heraus, dass das proteolytische System der Milchsäurebakterien wie bei *Lactobacillus helveticus* in der Lage ist antihypertensive Peptide zu bilden. Die zusätzliche Generierung von bioaktiven Eigenschaften im Produkt erzeugt einen Mehrwert. Dieser Effekt spielt besonders bei der Entwicklung von Starter-Kulturen eine Rolle [30], [31]. Auch bei Produkten aus anderen Proteinquellen wie bspw. Soja wurden BAPs entdeckt. So wurden in Tofu Peptide mit antihypertensiven und antioxidativen Eigenschaften nachgewiesen [32].

Ein neuerer Ansatz zur Herstellung von BAPs ist die Verwendung von industriellen Neben- bzw. Abfallprodukten als Proteinquelle. Dabei wird untersucht, inwiefern sich

vermehrt anfallende Reiskleien [33], Krebstierschalen [34], Vogelfedern [35] oder tierische Schlachtabfälle [36] für die Proteolyse zur Gewinnung von BAPs oder für die Futterergänzung bei Tieren eignen. In allen Proteinquellen konnten nach der Prozessierung bioaktive Peptide nachgewiesen werden. In diesem Zusammenhang stehen dabei medizinische bzw. pharmazeutische Produkte im Fokus [1].

Grundsätzlich lässt sich sagen, dass BAPs bei allen Proteinhydrolysen, unabhängig vom enzymatischen Ursprung oder der Proteinquelle, entstehen können. Die gezielte Herstellung spezifischer BAP-Isolate aus natürlichen Proteinquellen ist allerdings noch nicht im industriellen Maßstab zu finden.

3.1.3 Bioaktive Peptide in funktionellen Lebensmitteln

Die modernen Lebensmittelwissenschaften beschäftigen sich mit einer Vielzahl an Produktoptimierungen. Neben Eigenschaften wie optimierten Reifeprozessen, verringerter Keimbelastung oder reduzierter Oxidierung, können auch gesundheitsfördernde biologische Effekte im Produkt zu finden sein. Diese sollen bei der Konsumierung einen Mehrwert für die menschliche Gesundheit darstellen. Man spricht dann von sogenannten funktionellen Lebensmitteln (engl. Functional Foods)[37]. Das Konzept zur Herstellung funktioneller Lebensmittel wurde ursprünglich in den 80er Jahren in Japan entwickelt. Dort wurden auch die FOSHU-Kriterien (Foods For Specified Health Uses) eingeführt [38]. Viele Länder haben den Begriff übernommen, wobei keine einheitlichen Definitionen gelten. Die funktionellen Lebensmittel können eingeteilt werden in natürliche Produkte (wie Obst und Gemüse), prozessierte Produkte (wie Brot), abgereicherte Produkte (wie Lactosefreie Milch), ergänzte Produkte (durch Zugabe von Vitaminen oder Mineralien), angereicherte Produkte (wie Margarine mit Phytosterolester-Zusatz) und verbesserte Produkte (wie Vitamin A optimierter Reis). Die Grenzen sind dabei häufig fließend [39].

Leicht auf dem Markt zu etablierende Produkte aus der Industrie fand man zunächst bei den Molkereierzeugnissen. Nachdem bioaktive Peptide in vielen Milcherzeugnissen nachgewiesen wurden, konnten diese direkt als Functional Food vermarktet werden. In Japan und Finnland fanden sich zunächst Produkte wie Calpis bzw. Evolus [40]. Dabei handelt es sich um mit *Lactobacillus helveticus* und *Saccharomyces cerevisiae* fermentierte Milcherzeugnisse, in denen sich bioaktive Peptide zur Blutdrucksenkung finden [41].

Viele weitere Produkte mit bioaktiven Eigenschaften folgten [40]. Heutzutage versucht man neue oder eher ungewöhnliche Proteinquellen zu erschließen. In der Lebensmittelindustrie sind besonders Schlachtabfälle und industrielle Nebenprodukte von großem Interesse [42], [43], [44]. So konnte die Produktpalette mit bioaktiven Bestandteilen von Getränken über Pulvern, Kapseln, Tabletten bis hin zu Cremes erweitert werden (siehe Tabelle 2).

Tabelle 2: Bioaktive Peptide in kommerziellen Produkten (Modifiziert nach [45])

Peptidsequenz	Bioaktivität	Produktname	Hersteller	Form	Ursprung
LKPNM	Antihypertensiv	Vasotensin®	Metagenics, USA	Tablette	Bonito
LKPNM	Antihypertensiv	Peptide ACE 3000	Nippon Supplement Inc, Japan	Kapsel	Bonito
VY	Antihypertensiv	Lapis Support	Tokiwa Yakuhin Co., Ltd., Japan	Getränk	Sardine
FY, VY und IY	Antihypertensiv	Wakame Jelly	Riken Vitamin, Japan	Gel	Seegras
IPP und VPP	Antihypertensiv	Ameal S 120®	Calpis Co, Ltd., Japan	Getränk	Milch
IPP und VPP	Antihypertensiv	Evolus®	Valio Ltd., Finnland	Getränk	Milch
VVYP	Appetitzügelnd	Seishou-sabou	Moringa & Co., Ltd., Japan	Getränk	Rinder- /Schweineblut
CSPHP	Cholesterolsenkend	Remake Cholesterol Block	Kyowa Hakko, Japan	Getränk	Soja
-	Stress-Abbau	Protizen®	Copalis Sea Solutions, Frankreich	Pulver	Fisch
-	Stress-Abbau	AntiStress 24	Forte Pharma Laboratories, Frankreich	Kapsel	Fisch
-	Knorpelaufbau	CH-Alpha®	Gelita Health Products GmbH, Deutschland	Getränk	Rinderkollagen
-	Immunomodulator	PeptiBal™	InnoVactiv Inc, Kanada	Kapsel	Hai
β-Alanyl-L- histidin (Carnosin)	Antioxidativ/Anti Aging	Nivea Q-10® Creme	Nivea, Frankreich	Creme	Rindermuskel- protein

3.1.4 Nachweis bioaktiver Peptide mit Bioaktivitätsassays

Neben den in Abbildung 1 aufgeführten bioaktiven Eigenschaften, stehen einige weitere Bioaktivitäten im Vordergrund der Forschung. Wie Tabelle 2 zeigt, sind für kommerzielle Produkte vor allem die Linderung von Volkskrankheiten wie Hypertonie oder Stress von Bedeutung. Die notwendigen Methoden zum Screening der bioaktiven Eigenschaften sind zum Teil gut etabliert und einige von ihnen zum Standard im Nachweis von BAPs geworden. Voraussetzung für die Analyse von bioaktiven Peptiden ist eine möglichst hohe Reinheit der verwendeten Proben. Die Assays basieren meist auf der Detektion des Anstiegs bzw. der Abnahme eines messbaren Agens, wie Fluorescein oder Hippuryl-

Histidyl-L-Leucin. In Assays mit lebenden Organismen überprüft man dagegen die Zytotoxizität bzw. die Inhibierung des Zellwachstums.

3.1.5 Messung der antioxidativen Kapazität

Die Bildung von freien Radikalen ist ein natürlicher Prozess, der während der Atmung in unserem Körper stattfindet. Selbst Makrophagen bilden zur Bekämpfung von bakteriellen Infekten hochreaktive Sauerstoffradikale [46]. Dabei spielen besonders das Hydroxylradikal OH^\bullet und das Hyperoxid-Anion $\text{O}_2^{\bullet-}$ eine entscheidende Rolle. Ist der Körper einer Doppelbelastung durch exogene Einflüsse wie Umweltgifte, Infektionen oder körperlichem bzw. psychischem Stress ausgesetzt, entstehen durch homolytische Spaltungen des Sauerstoffs vermehrt ungepaarte Elektronen. Die reaktiven Sauerstoffspezies (engl. reactive oxygen species, ROS) schädigen die für die Zelle wichtigen Moleküle wie DNA, RNA, Proteine und Lipide. Durch diese Eigenschaft sollen sie am Alterungsprozess der Zelle und an der Entstehung von Krebs beteiligt sein [47],[48]. Übermäßige ROS sind im Blut messbar. Dieser Sachverhalt wird als oxidativer Stress bezeichnet. In der Regel ist der Körper in der Lage mit Antioxidantien gegenzusteuern. Die Wirkung von ROS im menschlichen Körper ist bisher nicht eindeutig erforscht. Neuere Untersuchungen zeigen, dass H_2O_2 vom Körper als Botenstoff ausgeschüttet wird und ROS freigesetzt werden [49], [50], [51]. Bioaktive Peptide gelten neben den Polyphenolen [52] als natürliche Antioxidantien, die mit der Nahrung aufgenommen werden [53]. Durch ihre Fähigkeit zur Abgabe von Elektronen unterbinden sie den Elektronentzug der ROS und machen sie somit unschädlich.

Der ORAC- Test misst die Oxygen Radical Absorbance Capacity, also die Fähigkeit freie Sauerstoffradikale zu inaktivieren. Der Test basiert auf der Messung einer radikalinduzierten Abnahme einer Fluoreszenz [54]. Als fluoreszierender Farbstoff wird Fluorescein verwendet, welcher durch Sauerstoffradikale einer künstlichen Radikalquelle wie AAPH oxidiert wird und dadurch über die Zeit an Fluoreszenz verliert. Zur Kontrolle dient der antioxidative Standard Trolox, ein wasserlösliches Vitamin E-Derivat. Als Radikalfänger bzw. Elektronendonor verringert er die Oxidation der Fluoresceinmoleküle, bis seine antioxidative Wirkung nachlässt. Bei positiver Probe nimmt also die messbare Fluoreszenz bedeutend langsamer ab (siehe Abbildung 3). Die

radikalabsorbierende Eigenschaft der verschiedenen Peptidproben wird anhand der Fläche unterhalb der Kurven des oxidierenden Fluoresceins ermittelt.

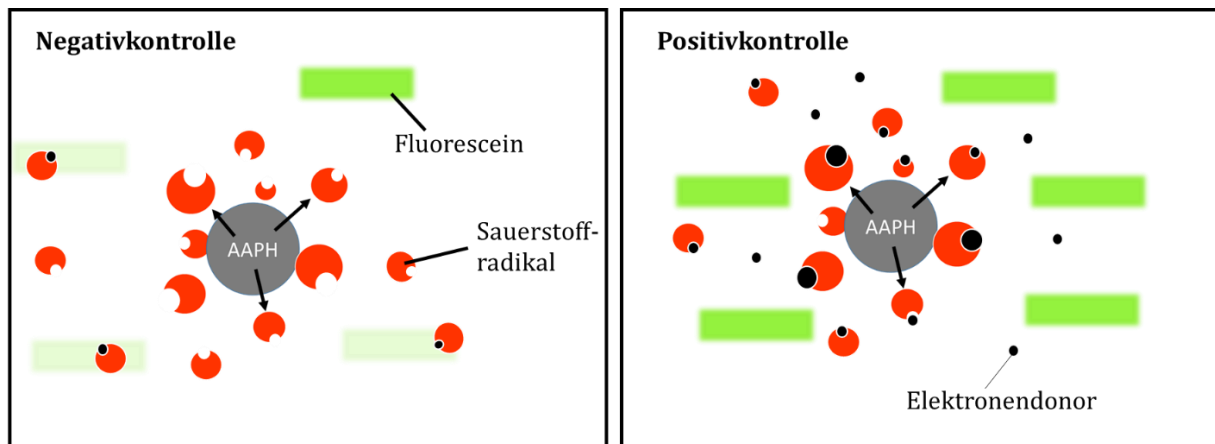


Abbildung 3: Prinzip der ORAC Messung. Freie Elektronendonoren hindern die Sauerstoffradikale an der Oxidation des Fluoresceins.

3.1.6 Nachweis der antihypertensiven Eigenschaften

Die Feststellung der antihypertensiven Eigenschaften basiert auf der Inhibition des blutdruckregulierenden Enzyms Angiotensin-konvertierendes Enzym (engl. Angiotensin Converting Enzyme (ACE)). Im Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) wird bei Hypotonie (niedrigem Blutdruck) neben der Erhöhung des Blutvolumens im Körper, auch die Vasokonstriktion (Widerstandsgefäße) reguliert [55].

Dies geschieht durch Aktivierung der blutdruck-steigernden Signalkaskade im Sympathikus. Hierbei wird in der Leber zunächst Angiotensinogen ausgeschüttet. Das Prohormon wird durch in der Niere freigesetztes Renin zum kürzeren Angiotensin I gespalten, welches vom ACE zum aktiven Hormon Angiotensin II gespalten wird. Durch Aktivierung der AT1 Rezeptoren werden nun die Vasokonstriktion und das Blutvolumen reguliert (siehe Abbildung 4). Bei Hypertonie (hohem Blutdruck)

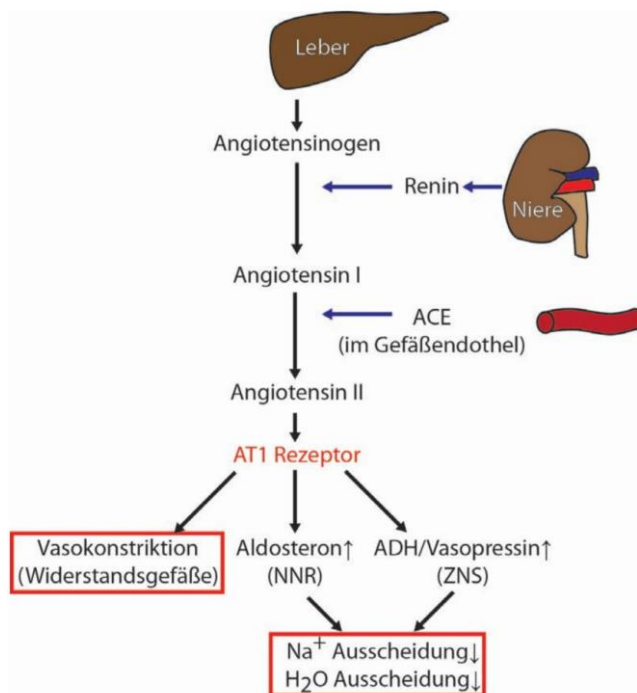


Abbildung 4: Blutdruckregulierung über das RAAS [56]

wird ein künstlicher Regulations-mechanismus des RAAS verwendet, die Inhibierung des ACE durch pharmazeutische ACE-Inhibitoren. Für den Nachweis von antihypertensiven Substanzen verwendet man zum Beispiel ein ACE-Substrat, wie Hippuryl-Histidyl-L-Leucin [57]. Das vom ACE katalysierte Spaltprodukt Hippursäure kann durch chromatografische Verfahren quantifiziert werden. Als Standard wird der peptidähnliche Wirkstoff Captopril (siehe 3.1.1) verwendet. Je niedriger der Hippursäure-Wert, desto höher ist die ACE-Inhibition und folglich die Aktivität der antihypertensiven Substanz.

3.1.7 Nachweis antimikrobieller Peptide

Für den Nachweis von antimikrobiellen Peptiden ist es zunächst notwendig zu betonen, dass Bakterien unterschiedliche Membranstrukturen aufweisen können. Aus diesem Grund besitzen antimikrobielle Peptide unterschiedliche Wirkweisen, ähnlich der gegen Bakterien verwendeten Antibiotika. Bakterien werden hierbei in Gram-positive und in Gram-negative Bakterien unterschieden. Gram-positive Bakterien besitzen über ihrer Zytoplasmamembran eine dicke Peptidoglykanschicht, die aus den quervernetzten Zuckerderivatmolekülen N-Acetylglucosamin und N-Acetylmuraminsäure besteht [58]. Sie kann eine Schichtdicke von bis zu 30 – 100 nm aufweisen [59]. Gram-negative Bakterien dagegen besitzen nur eine sehr dünne Peptidoglykanschicht (bis zu 10 nm). Stattdessen weisen sie lediglich eine äußere Membranschicht auf (siehe Abbildung 5).

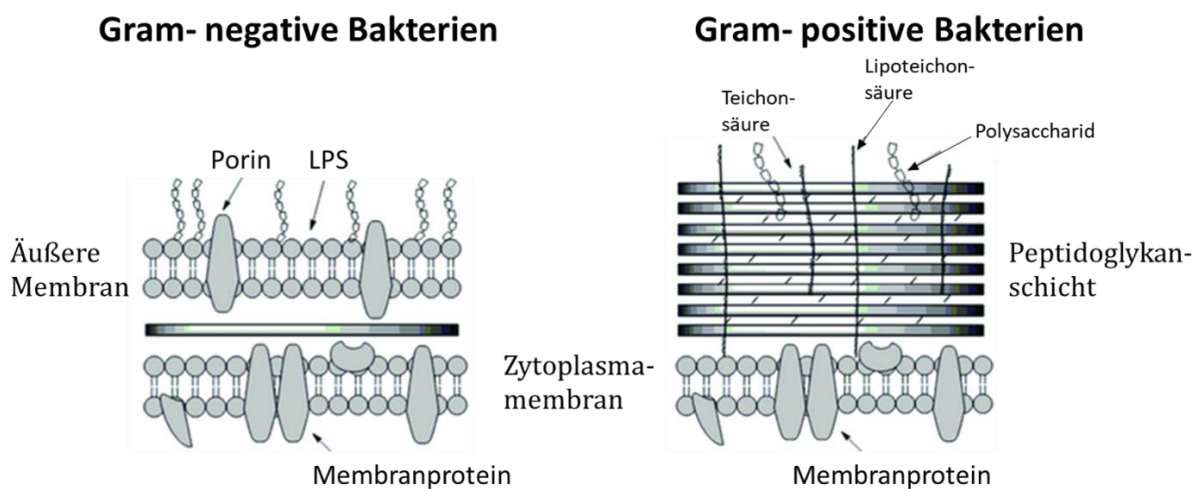


Abbildung 5: Aufbau von Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien (Modifiziert nach [60])

Antimikrobielle Peptide besitzen häufig eine kationische Oberfläche und einen hydrophoben Kern. Durch elektrostatische Wechselwirkung mit der äußeren Membran von Gram-negativen Bakterien, kann diese durchdrungen werden und die AMPs an die Zytoplasmamembran binden [61]. Die Peptidoglykanschicht von Gram-positiven Bakterien hingegen, kann durch Nanoporen in der Quervernetzung leicht durchdrungen werden. Nach der Adsorption der AMPs an der Zytoplasmamembran erfolgt die Disruption der Zellwand. Dazu existieren unterschiedliche Modelle, das Barrel-Stack-Pore-, das Toroidal Pore -und das Carpet-Modell (siehe Abbildung 6). Bei allen drei Pore-Modellen kommt es zur Aggregation mehrerer Peptide. Durch ihre hydrophoben Bereiche wechselwirken sie mit der Zellmembran, dringen senkrecht in diese ein und schaffen mit ihrer kationischen Wechselwirkung eine Pore. Das Toroidal Pore Modell unterscheidet sich nur geringfügig, durch Wechselwirkung im gesamten Bereich der Pore mit den Phospholipid-Kopfgruppen der Membran [62]. Die entstehenden Poren von wenigen Nanometern führen zu einem Austritt von Wasser und somit zu einem Abfall des Zellinnendrucks.

Das Carpet-Modell geht von einer Disruption der Lipiddoppelschicht aus, welches durch Anlagerung der AMPs auf der Membranoberfläche und der damit einhergehenden steigenden Oberflächenspannung hervorgerufen wird [63]. Dieser Mechanismus ist allerdings wenig verstanden, da sich die Lyse der Zellmembran in biophysikalischen Experimenten nicht ausschließlich auf die Anwesenheit der AMPs zurückführen lässt.

Für den Nachweis in Laborversuchen sollten AMPs eine Reduktion des bakteriellen Wachstums, sowohl in Gram- positiven als auch in Gram-negativen Bakterien verursachen.

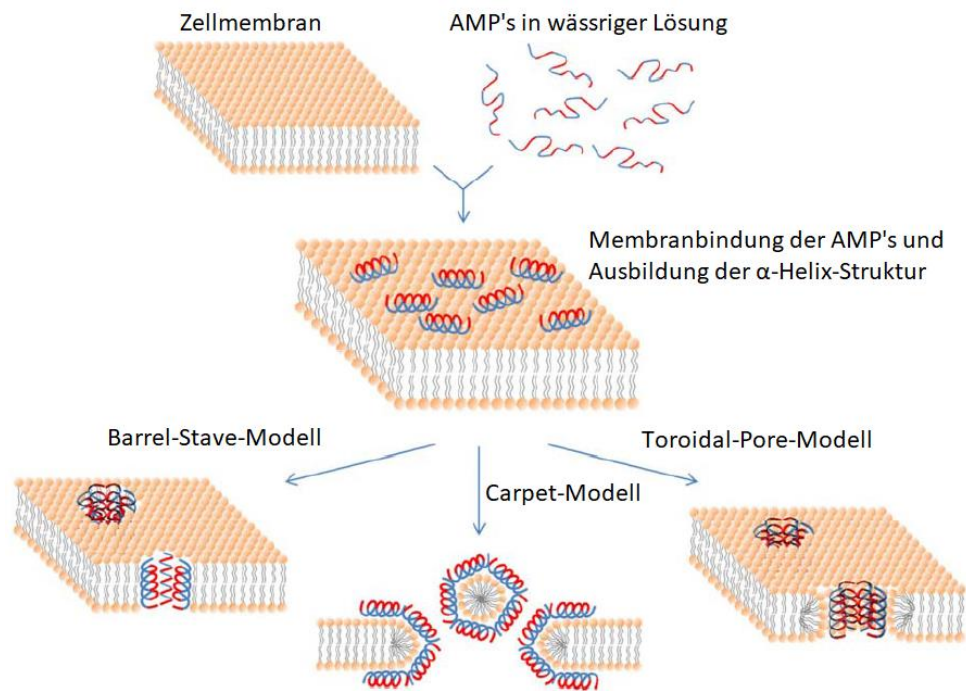


Abbildung 6: Unterschiedliche Zellmembraninteraktionen von antimikrobiellen Peptiden (Modifiziert nach [64])

Da Antibiotika, neben den Zielen in der Bakterienmembran, zusätzliche molekulare Ziele besitzen, konnten für die AMPs weitere Wirkmechanismen identifiziert werden [65]. Beispiele für diese Wirkmechanismen sind unter anderem die Störung des DNA- und RNA Metabolismus [66]. Obwohl die anti-bakteriellen AMPs die am häufigsten untersuchten sind, konnten darüber hinaus AMPs gegen weitere Organismen wie Pilze oder Protozoen entdeckt werden [67]. Ebenfalls sind antivirale AMPs bekannt die sich gegen HIV und Herpesviren richten [68], [69].

Ähnlich wie bei heutigen Antibiotikaresistenzen konnten auch bei den AMPs bestehende Resistenzmechanismen entdeckt werden. Sogar bei menschlichen Darmbakterien konnten Veränderungen der Oberflächenladung, die Produktion cytoplasmatischer Proteasen und Bindungsproteine oder die Ausbildung aktiver Efflux Pumpen beobachtet werden [70], [71].

3.1.8 Nachweis antikanzerogener Peptide

Mit der Entdeckung der ersten Peptidhormone wurde schnell die Frage nach ihrer Eignung als mögliches Krebstherapeutikum gestellt [72]. Erste bekannte Peptide mit antikanzerogener Wirkung stammen aus dem afrikanischen Klauenfrosch (*Xenopus*

laevis). So konnten seinen über die Haut sekretierten AMPs auch zytotoxische Effekte bei Krebszellen nachgewiesen werden [73].

Ähnlich der AMPs besitzen ACPs in ihrer Struktur ebenfalls α -Helix- oder β -Faltblatt-Konformationen. Unterschiede bestehen jedoch im Zelltargeting. Daher können ACPs in zwei Gruppen unterteilt werden; solche, die sich ausschließlich gegen bakterielle Zellen und Krebszellen richten und solche, die sich auch gegen gesunde Säugerzellen richten. Die zugrunde liegenden Mechanismen lassen sich in membranolytische und nicht-membranolytische untergliedern. Weitere Mechanismen richten sich spezifisch nach untersuchtem Tumor und dessen Charakteristika. So konnten Peptide mit einer Selektivität für negativ geladene Krebszelloberflächen gefunden werden, die sich überwiegend in Prostata- und Brustkarzinomen finden [74]. Im Allgemeinen lässt sich bei dem bisherigen Stand der Wissenschaft keine eindeutige Tumorspezifität zu den ACPs zuordnen, jedoch zeigen sie sich als durchaus wirksam [75].

3.2 Proteinquellen

3.2.1 Proteinisolate in der Industrie

Hochwertige Proteinisolate mit hohem Proteinanteil werden in der Industrie hauptsächlich für die drei Gruppen Babynahrung, Sportlernahrung und Nahrungsergänzungsmittel hergestellt. Dabei machen Milchhydrolysate für Babynahrung mehr als 2/3 des Marktanteils aus. Doch in den letzten 10 Jahren sind besonders die Anteile der Sportlernahrung und hochwertigen Nahrungsergänzungsmittel in den asiatischen Ländern stark angewachsen [76]. Auch die Umstellung der Ernährungsweise in den westlichen Ländern führt zu neuen Proteinprodukten auf dem Markt. Neben den ursprünglichen Milchhydrolysaten werden daher neue Proteinquellen erschlossen und neue Aufreinigungsverfahren für den Einsatz in der Industrie entwickelt [77]. So finden sich neben den Milchproteinpulvern wie Molkeprotein und Casein auch viele pflanzliche Proteinpulver. Hierbei sind vor allem Mandel-, Sonnenblumen-, Kürbis- und Reisprotein zu nennen. Auch Nahrungsergänzungsmittel von pulverisierter Maca und Gerstengras sind zu finden [78]. Am hochwertigsten sind jedoch Proteinisolate mit hohem Proteinanteil von Leguminosen wie Soja, Erbse und Lupine.

Der industrielle Prozess zur Herstellung von Proteinisolaten aus Hülsenfrüchten ist seit den 70er Jahren etabliert [79]. Er beginnt mit dem Entfernen der Schale und dem Walzen

der Samen. Die entstandenen Flocken werden anschließend durch Lösemittel, wie überkritisches Kohlendioxid oder Hexan, entfettet. Zur Herstellung eines Proteinkonzentrates, werden die entfetteten Flocken mit Wasser gewaschen, zentrifugiert und das Pellet getrocknet. Durch die wässrige Extraktion bleiben Pflanzenfasern und unlösliche Bestandteile erhalten, wodurch der Proteingehalt bei 60-75% liegt. Für die Herstellung von Proteinisolaten mit einem Proteinanteil von über 90% werden zur Extraktion zwei verschiedene Verfahren angewandt [80], [81], [82]. So werden die Proteine zunächst durch alkalische Extraktion in Lösung gebracht und zentrifugiert. Nach dem Zentrifugieren wird das proteinarme Pellet verworfen und die Proteine im Überstand anschließend über isoelektrische Präzipitation gefällt [83], [84]. Nach der folgenden Zentrifugation wird der Wasseranteil im Überstand über Sprühtrocknungsverfahren verringert und das Proteinisolat gewonnen. Ein alternatives Verfahren setzt auf das Aussalzen der Proteine, wodurch ebenfalls hohe Proteinausbeuten möglich sind [85]. Hierbei ist zu beachten, dass sich die Proteinzusammensetzung und die strukturellen sowie funktionellen Eigenschaften der Proteine je nach angewandtem Verfahren verändern [86]. Des Weiteren muss bei den auf dem Markt erhältlichen Proteinisolaten lediglich von einer technischen Reinheit ausgegangen werden. Wie im Prozess erläutert, lassen sich unerwünschte Nebenprodukte nicht vermeiden und sind nur durch hohen Aufwand zu entfernen. So ist bekannt, dass unter anderem in Pflanzen befindliche Flavonoide Proteinbindungen eingehen [87]. Darüber hinaus lässt sich nicht ausschließen, dass die Hersteller der Proteinisolate ihren kommerziellen Produkten möglich Stabilisatoren und Konservierungsmittel beimischen, um die Produktqualität länger aufrecht zu erhalten. Bei analytischen Untersuchungen könnten daher Interferenzen auftreten.

3.2.2 Proteine der Süßlupine

Die Lupine gehört zur Familie der Hülsenfrüchtler (*Fabaceae*) und zur Unterfamilie der Schmetterlingsblütler (*Faboideae*). Sie ist folglich nah verwandt mit anderen Körnerleguminosen wie der Erbse (*Pisum sativum*) oder der Sojabohne (*Glycine max*). Zu den Lupinen gehören mehrere hundert Arten, welche ursprünglich in Südeuropa, Nordafrika und Vorderasien zu finden sind. Von den bekannten Arten sind allerdings nur wenige für die Gewinnung von Nahrungsprotein geeignet. Durch selektive Züchtung in

den 1930er Jahren konnten alkaloidarme Kulturpflanzen entwickelt werden, bei denen der giftige Bitterstoff Lupanin stark reduziert wurde. Diese auch als Süßlupinen bekannten Pflanzen, bezeichnen hauptsächlich die in Europa, Australien und Südamerika kultivierte weißblühende *Lupinus albus*, die blaublühende *L. angustifolius* (siehe Abbildung 7) und die gelbblühende *L. luteus*. Durch die Verringerung des Lupanins konnten sich Pilzkrankheiten wie Anthraknose in den 90er Jahren stark verbreiten, was zur Folge hatte, dass im deutschen Lupinenanbau mit 96% die resistenterere blaublühende Süßlupine angebaut wird [89]. Über 75% des weltweiten Lupinenanbaus findet in Ozeanien statt und dort hauptsächlich in Australien [90]. Der überwiegende Anteil wird dabei als Sojaalternative für Tierfutter verwendet. Soja gilt als wärmeliebende Pflanze und ist in den deutschen Breitengraden nur bedingt anbaubar, wohingegen die Lupine in ganz Europa heimisch ist. Durch die klimatischen Veränderungen im europäischen Raum stehen die trockenheitstoleranten Lupinen wieder vermehrt im Fokus der Forschung und bieten somit eine Antwort auf die Frage der zukünftigen Proteinversorgung [90], [91].

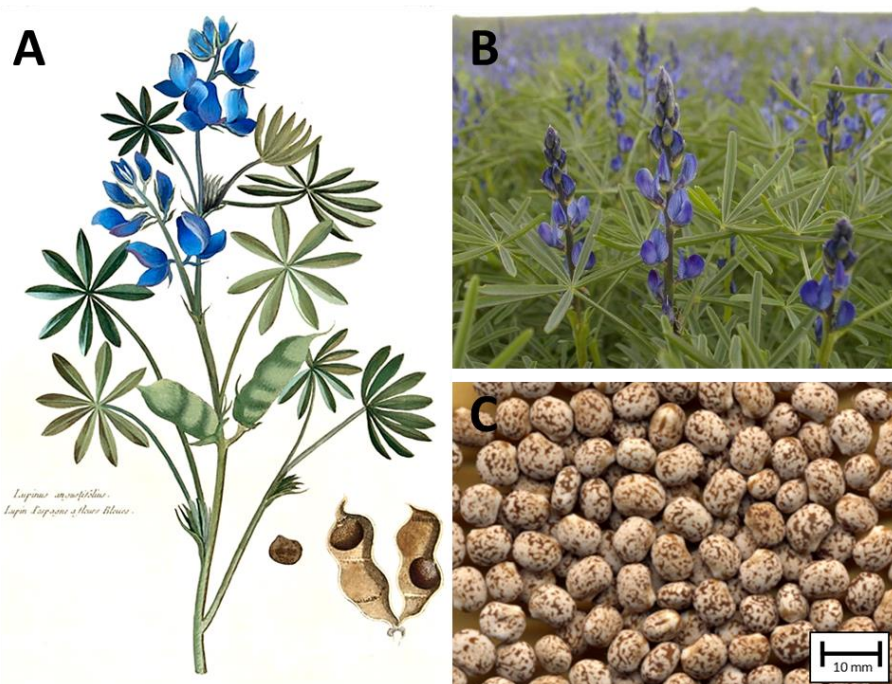


Abbildung 7: *Lupinus angustifolius*

A: Illustration, **B:** Im landwirtschaftlichen Anbau **C:** Samenkörner [92][93] [94]

Mit der Änderung des Gesundheitsbewusstseins in der Diskussion um Nachhaltigkeit nimmt auch der Anteil an Lebensmitteln die Lupinenprodukte wie Mehl, Protein oder Faserstoff enthalten, stetig zu [94], [96]. Eine Besonderheit der Lupine ist ihr sehr hoher Proteingehalt von 33-40% (je nach Extraktionsmethode) [97], [98]. Dabei unterscheiden sich die verschiedenen Süßlupinensorten hinsichtlich ihrer der Proteinzusammensetzung

nur gering voneinander. Der Großteil des pflanzlichen Proteins wird in den Samen gespeichert. Nach Osborne (1924) werden die Proteinbestandteile in Albumine, Globuline, Prolamine und Gluteline unterteilt. Albumine und Globuline machen den Hauptbestandteil des Gesamtproteins aus und liegen in einem Verhältnis von 1:9 vor [100]. Albumine sind dabei leicht wasserlöslich, wohingegen Globuline eine höhere Salinität zur Lösung benötigen. Prolamine und Gluteline lösen sich nur in basischen oder alkoholischen Lösungen [101]. Die in Lupinensamen zu findenden Globuline werden als Conglutin bezeichnet und werden in α -, β -, γ - und δ -Conglutine (siehe Tabelle 3) unterschieden [102].

Tabelle 3: Hauptbestandteile des Conglutins in *L. angustifolius* L [103], [100]

Conglutine					Conglutin Untereinheiten		
	Sedimentations- koeffizient	Globulinanteil [%]	Masse [kDa]	pI	Quartär- struktur	Charakteristika	Monomer- größe [kDa]
α	11S (Legumin)	51	216	5,6-5,9	Hexamer	Sauer	42-62
	7S (Legumin)				Trimer	Basisch	21-24
β	7S (Vicilin)	42	150-170	5,9-6,2	Trimer		20-80
γ	7S	5	100	7,9	Tetramer		32
δ	2S	2	14	4,3	Dimer	Groß	9,5
						Klein	4,5

Die bioaktiven Eigenschaften bei Lupinen sind vor allem auf ihre Polyphenole zurückzuführen, die zu einer antioxidativen Wirkung führen. Hier lässt sich als Beispiel das in den Samen enthaltene Flavonoid Apigenin nennen [104],[105]. Über weitere bioaktive Komponenten oder Peptide ist wenig bekannt. Erst in den letzten Jahren ist das wissenschaftliche Interesse an Lupinen gestiegen. So konnten Boschin et al. (2014) ACE-inhibitorische Eigenschaften in enzymatisch hydrolysierten Lupinensamen nachweisen.

3.3 Enzyme

3.3.1 Proteasen

Proteasen gehören zu den proteolytischen Enzymen, sie werden auch Peptidbindungs-hydrolasen oder kurz Peptidasen genannt. Klassifiziert werden diese Peptidasen in die Kategorie 3 der EC-Klassifikation, welche die Hydrolasen bilden. Sie sind in der Lage Proteine bzw. deren Peptide

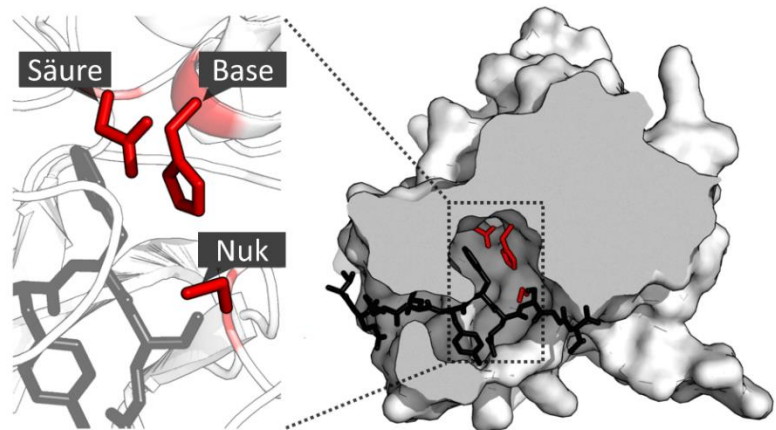


Abbildung 8: Katalytische Triade einer Protease (Modifiziert nach [107])

unter Verbrauch von Wasser durch Hydrolyse voneinander zu trennen, wodurch sie in der Untergruppe 3.4 eingeordnet werden. Bei Serin- und Cysteinproteasen wird dies durch ein aktives Zentrum im inneren des Enzyms, welches aus drei bzw. zwei Aminosäuren besteht, ermöglicht (siehe Abbildung 8). Bei einer katalytischen Triade sind die Aminosäurereste über Wasserstoffbrücken miteinander verbunden. Bei starker Polarisierung der basischen Aminosäure, durch die benachbarte saure Aminosäure, wird die Nukleophilie der Base durch die Nähe zur nukleophilen Aminosäure weiter erhöht. Bei Anwesenheit eines Substrates wird nun durch einen nukleophilen Angriff auf den Carbonyl-Kohlenstoff, die Spaltung der Peptidbindung, unter Zunahme des umgebenden Wassers, initiiert [108]. Eine weitere Klassifizierung findet sich daher in der zur Hydrolyse verwendeten Aminosäure. Serinproteasen verwenden eine katalytische Triade aus Asparagin, Serin und Histidin und gehören zur Untergruppe 3.4.21.

Tabelle 4: In dieser Arbeit verwendete Proteasen

Enzym	E.C. Nummer	Spez. Aktivität (U/mg)	Optimum	
			pH	Temperatur
α -Chymotrypsin B	3.4.21.1	40	7-8	37
Trypsin	3.4.21.4	40	7-9	37
Alcalase® 2.5 FG	3.4.21.62	1.375*	7-10	30-65
Subtilisin A	3.4.21.62	7-15	8-10	50

*Konversion von AU nach U/mg [109]

Anders als Exopeptidasen können Serinproteasen ihr Substrat innerhalb der Peptidkette spalten, sodass sie den Endopeptidasen zugeordnet werden können [110]. Häufig spalten sie dabei an spezifischen Aminosäuresequenzen oder präferieren eine bestimmte Aminogruppe. Hier sind vor allem die aus dem Magen stammenden Verdauungsproteasen α -Chymotrypsin B und Trypsin zu nennen. Jedoch gibt es auch sehr unspezifische Proteasen, wie das aus Heubakterien (*B. licheniformis*) stammende Subtilisin A mit der katalytischen Triade bestehend aus Asp 32, His 64 und Ser 221 (die Nummerierung richtet sich nach dem Vorkommen in der Aminosäuresequenz). Besonders der Umstand sehr Temperatur- und pH-beständig zu sein, verhalf der Protease zum industriellen Einsatz als Reinigungsenzym in Waschmitteln. Durch Optimierung der Aktivität und pH-Stabilität, wurde das auf Subtilisin A basierende Enzym Alcalase von der Firma Novozymes entwickelt. Aufgrund seiner Eigenschaften wird es häufig zur Herstellung von Proteinhydrolysaten bei der Erforschung von bioaktiven Peptiden verwendet [111], [112] [113]. Daher eignet es sich besonders für die Verwendung in kontinuierlich betriebenen Proteolysereaktoren zur Generierung kurzkettiger Peptiden.

3.4 Durchflussbiokatalyse zur Herstellung bioaktiver Peptide

3.4.1 Prinzip der Immobilisierung

Enzyme dienen als Katalysatoren von chemischen Reaktionen. Der Umstand, dass sie spezifisch wirken und zur Reaktion nur sehr geringe Energien benötigen, macht sie für den Einsatz in der Industrie interessant. Für die Verwendung in großvolumigen Reaktortanks sind sie allerdings nicht immer geeignet, da sie durch das Substrat inhibiert werden können, instabil werden oder anschließend aufwändig aus dem Prozess entfernt werden müssen. Durch Fixierung (Immobilisierung) der Enzyme können sowohl die Enzymeigenschaften verbessert, als auch die Wiederverwertbarkeit erhöht werden. Zur Immobilisierung kommen unterschiedliche Verfahren mit jeweiligen Vor- und Nachteilen zum Einsatz. Es ist möglich die Enzyme untereinander zu vernetzen (Quervernetzung), sie in einer Matrix einzubetten (Einschluss-Immobilisierung), sie in semipermeablen Reaktionsräumen einzuschließen (Verkapselung) oder sie an einer Trägersubstanz zu binden [114]. Letzteres Verfahren wird am häufigsten angewandt, da die Trägerstruktur bzw. Trägermatrix dem Prozess angepasst werden kann. In industriellen Anwendungen sind zum Beispiel poröse Strukturen, Membranen, Glaskügelchen, Metalle oder Silika als

Trägermatrix zu finden [114]. Die Art der enzymatischen Immobilisierung kann dabei in zwei Varianten unterschieden werden. So können die Enzyme über Wechselwirkung adsorptiv oder kovalent an den Träger gebunden werden. Die kovalente Bindung über Elektronenpaarbindung wird häufig mit der Verwendung von Linkern kombiniert. Auf den Linkern werden freie Bindungsgruppen für das Enzym angeboten. Um sterische Hinderungen des Enzyms zu vermeiden, können die Linker dem Enzym angepasst werden, um die Stabilität und Aktivität des Enzyms zu erhöhen. Das Enzym kann hierbei auch an mehreren Linkern binden (multikovalent). Die Immobilisierung erfolgt dabei in mehreren Schritten (siehe Abbildung 9).

Prinzip der kovalenten Enzymimmobilisierung auf Zirkoniumdioxid mittels APTES

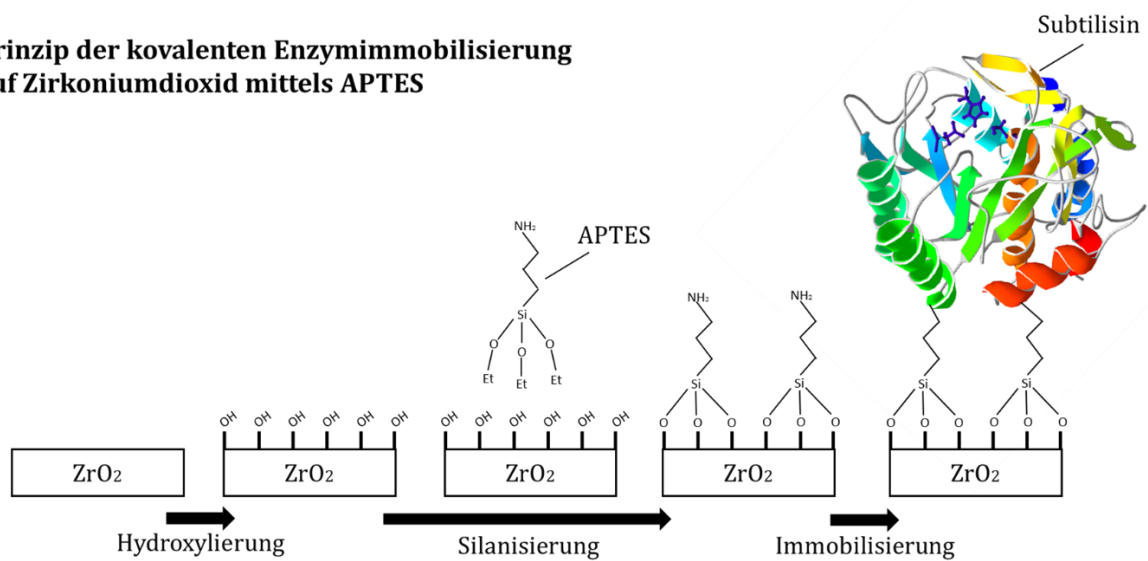


Abbildung 9: Enzymimmobilisierung des Kapillarreaktorsystems

Zunächst wird die Oberfläche der Trägersubstanz durch Aufbringen von Hydroxylgruppen (u.a. durch Säuren) aktiviert. An den freien Hydroxylgruppen können dann zum Beispiel silanbasierte Amino-Linker gebunden werden (Silanisierung). Im letzten Schritt erfolgt die Funktionalisierung durch die kovalente Bindung (Immobilisierung) der Enzyme an die freie Aminogruppe des Amino-Linkers. Unter Einsatz geeigneter Linker können durch die Immobilisierung der Enzyme die Enzymeigenschaften wie pH- und Temperaturstabilität verbessert werden, ohne die Aktivität der Enzyme zu verringern. Dies macht sie besonders für den Einsatz in kontinuierlichen Systemen interessant.

3.4.2 Das Modul des Keramikmembranreaktors

Das in dieser Arbeit konzipierte Reaktormodul wird in einem durchfluss-biokatalytischen Prozess betrieben, welches zur Vereinfachung durch das Modell eines idealisierten Rohrreaktors beschrieben wird (engl. *plug flow reactor*, kurz: PFR).

Das Modul besitzt ein Fließgleichgewicht, welches eine Gesamtmassenbilanz von

$$0 = \sum_i \dot{m}_{i,ein} - \sum_i \dot{m}_{i,aus} \quad (1)$$

aufweist. Dabei muss die Differenz der Summe des in das Volumenelement eintretenden Massenstroms ($\dot{m}_{i,ein}$) und der Summe des in das Volumenelement austretenden Massenstrom ($\dot{m}_{i,aus}$) gleich null sein.

Der Volumenstrom (Q_F) muss sowohl am Reaktoreingang (Q_{ein}) als auch am Reaktorausgang (Q_{aus}) gleich sein. Daher wird

$$\dot{Q}_F = \sum_i \dot{Q}_{ein,j} = \sum_i \dot{Q}_{aus,j} \quad (2)$$

angenommen. Die mittlere Verweilzeit (τ) wird durch den Quotienten der austretenden Konzentration einer Stoffmenge ($c_{j,aus}$) abzüglich der eingehenden Konzentration einer Stoffmenge ($c_{j,ein}$) und der Konzentration der Stoffmenge des Rohrvolumens ($R_{j,c_j,aus}$) bestimmt. Daher kann der Reaktor mit

$$\tau = \frac{(c_{j,aus} - c_{j,ein})}{R_{j,c_j,aus}} \quad (3)$$

beschrieben werden. [115].

Der Proteinfeed durchströmt die poröse und permeable Keramikkapillare, während die enthaltenen Proteine durch die immobilisierten Proteasen hydrolysiert werden. Durch Verklebung des Kapillarendes wird der Fluss des Proteinfeeds radial durch die funktionalisierte Kapillarwand gezwungen und gleicht somit dem Flussprinzip einer Dead End Filtration (siehe Abbildung 10). Geht man idealerweise von einer gleichmäßigen Durchströmung der Kapillarwand aus, besitzen alle Substanzen die gleiche Verweilzeit im Reaktormodul. Die Substratkonzentration nimmt in Richtung der Flussrichtung ab, während die Produktkonzentration zunimmt. Die Konzentration steigt also über die Länge des Fließweges. Als Ausnahme für das Modell des PFR gilt, dass sich innerhalb der Kapillare der Druck erhöht, während es nach dem Durchströmen der Kapillarwand zu

einem Druckabfall kommt; in einem PFR ist der Druck hingegen als konstant anzunehmen.

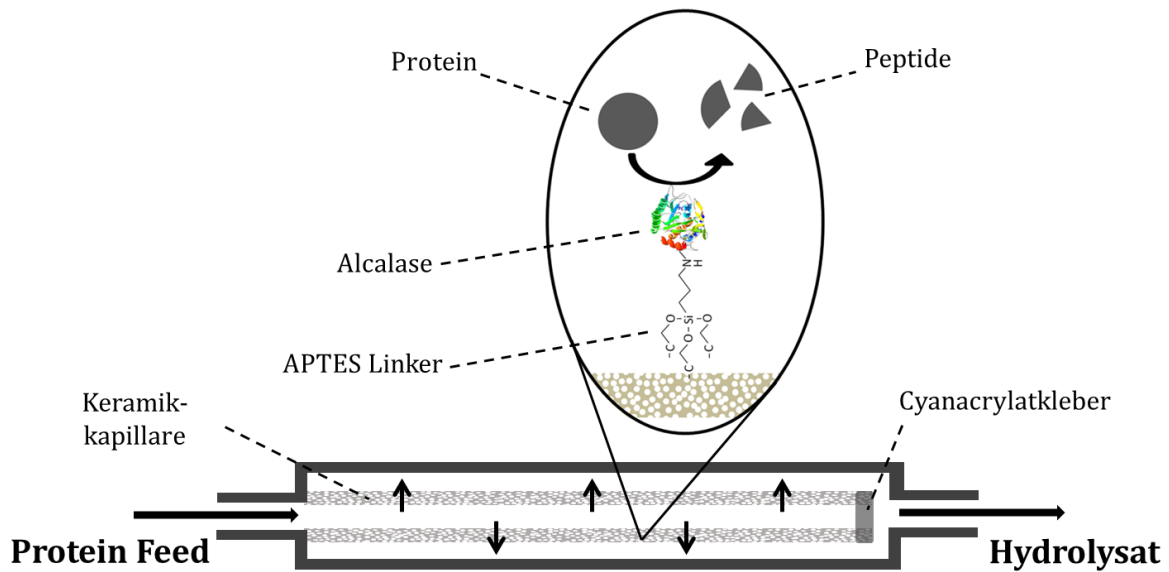


Abbildung 10: Modell der Durchflussbiokatalyse[116]

Keramische Materialien als Trägermaterial für biokatalytische Prozesse zeichnen sich dadurch aus, dass sie Temperatur- und pH-beständig und quellungsarm sind. Ziel für die biokatalytische Anwendung ist es einen technischen Kompromiss zu finden. Zum einen wird eine möglichst große Porengröße zur Minimierung der Diffusionslimitierung des Proteinfeeds und zur Verhinderung eines Verblockens der Kapillare benötigt. Zum anderen ist eine möglichst große spezifische Oberfläche zur Maximierung der immobilisierten Enzymmenge gewünscht. Substrat- bzw. Produktinhibierungen können einen Nachteil für die Durchflussbiokatalyse darstellen. Die inhibierenden Eigenschaften des Lupinenproteinfeeds können jedoch als gering eingestuft werden, da die Proteaseinhibitoren im Proteinisolat unterhalb von 0,1 mg/g liegen [117], [118].

3.4.3 Aufreinigung des Proteinhydrolysats

Nach dem biokatalytischen Prozess der Proteinhydrolyse liegen die Peptide in einem Gemisch aus unterschiedlich langen Peptiden vor. Zur Untersuchung der bioaktiven Eigenschaften sind weitere Aufreinigungsschritte des Hydrolysats notwendig. Chromatographische Auftrennungsverfahren nutzen zur Separation der Peptide deren spezifische chemische Eigenschaften aus. So erfolgt die Trennung anhand der hydrophoben Wechselwirkung und der Größe der Peptide. In der Chromatographiesäule befördert die mobile Phase die Peptide über eine stationäre Phase mit gegensätzlicher Polarität, wobei die Interaktion mit den Peptiden über die Flussrate, die Temperatur und die Laufstrecke beeinflusst wird. Dadurch kommt es zu unterschiedlichen Retentionszeiten der jeweiligen Peptide, welche im Anschluss detektiert werden können. Um möglichst reine Peptidisolat zu erhalten ist es notwendig die Anzahl an überlagernden Peaks gering zu halten. Das Ziel ist es, die Parameter so zu wählen, dass die Anzahl an Peptidpeaks möglichst hoch und voneinander differenzierbar ist.

Der Prozess kann leicht aufskaliert werden und wird daher an einer analytischen Säule mit der RP-HPLC entwickelt und auf den präparativen Maßstab der RP-FPLC übertragen. Dort erfolgt die Fraktionierung der Peptide, welche im Anschluss einen hohen Wasser- und Lösemittelanteil aufweisen. Um diesen schonend zu verdampfen, werden die Proben mit der Sublimationstrocknung (Lyophilisation) behandelt und anschließend in der gewünschten Konzentration resuspendiert.

3.4.4 Sequenzierung von BAPs

Für die Peptidsequenzierung in der modernen Analytik sind die leistungsfähigen Massenspektrometer kaum mehr wegzudenken. Besonders die Sequenzierung von Proben, bei denen nicht auf Datenbanken zurückgegriffen werden kann, werden erheblich erleichtert. Man spricht dann von *De Novo* Sequenzierung (lat. Von neuem) [119]. Zunächst müssen die Proteine über Enzyme verdaut werden. Das Hydrolysat wird im folgenden Schritt aufgereinigt bzw. die Peptidfraktionen separiert. Über Flüssigchromatographie erfolgt eine weitere Auftrennung der Peptide mit einer anschließenden Messung in einem Massenspektrometer (LC-MS). Die Zuordnung der Massen geschieht über den Abgleich mit Datenbanken bzw. den Vergleich bekannter Molekülmassen (siehe Abbildung 11).

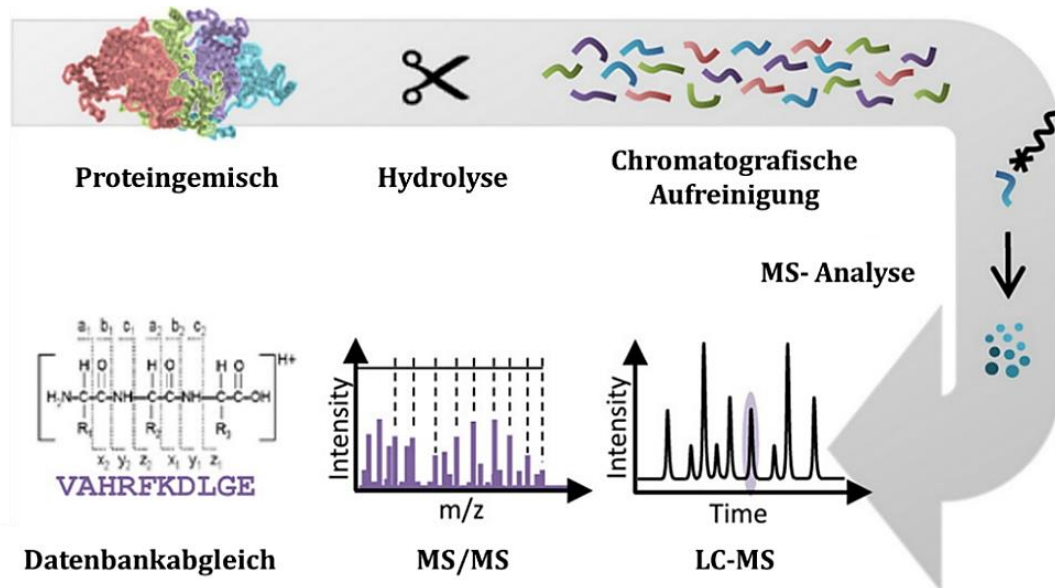


Abbildung 11: MS-Peptid-Sequenzierung (modifiziert nach [120])

4 Experimentelle Grundlagen

4.1 Die kontinuierliche Biokatalyse

4.1.1 Entwicklung eines proteolytischen Kapillarmoduls

Für die experimentelle Arbeit soll es möglich sein verschiedene Parameter des Systems zu testen und Aussagen über die Machbarkeit zu treffen. Daher wurden für die Entwicklung eines Prototyps bestimmte Kriterien festgelegt:

1) Robustheit: Das Modul sollte dazu geeignet sein, Parametern wie unterschiedlichen pH-Werten, Temperaturen, Puffermolaritäten und Drücken standzuhalten und sich in seinen Materialeigenschaften auch bei häufigem Gebrauch nicht zu verändern.

2) Zuverlässigkeit/Reproduzierbarkeit: Der Aufbau sollte möglichst unempfindlich gegen die oben genannten Parameter sein und dabei reproduzierbare Ergebnisse liefern. Besonders die Arbeit in einem geschlossenen, undurchsichtigen Gehäuse erschwert die Möglichkeit Undichtigkeiten der Kapillare bzw. Abweichungen beim Fluss des Proteinfeeds zu entdecken.

3) Einfach Handhabung: Um mögliche Fehler in der Bedienung und beim Zusammenbau des Moduls auszuschließen, sollte es aus wenigen Teilen bestehen. Das Einfassen der Kapillare sollte möglichst ohne Potting (die Verwendung von Gussmasse) bzw. Fixierung durch Verkleben auskommen. Somit ließ sich der Versuchsaufbau leicht ändern und das Wechseln der Kapillare leicht bewerkstelligen.

4) Skalierbarkeit: Die in den ersten drei Punkten angewandten Prinzipien und gesammelten Erfahrungen sollten möglichst für den Transfer auf einen größeren Maßstab (Upscale) geeignet sein. Somit soll die Herstellung der bioaktiven Peptide auch im größeren Maßstab mit höheren Ausbeuten gewährleistet sein.

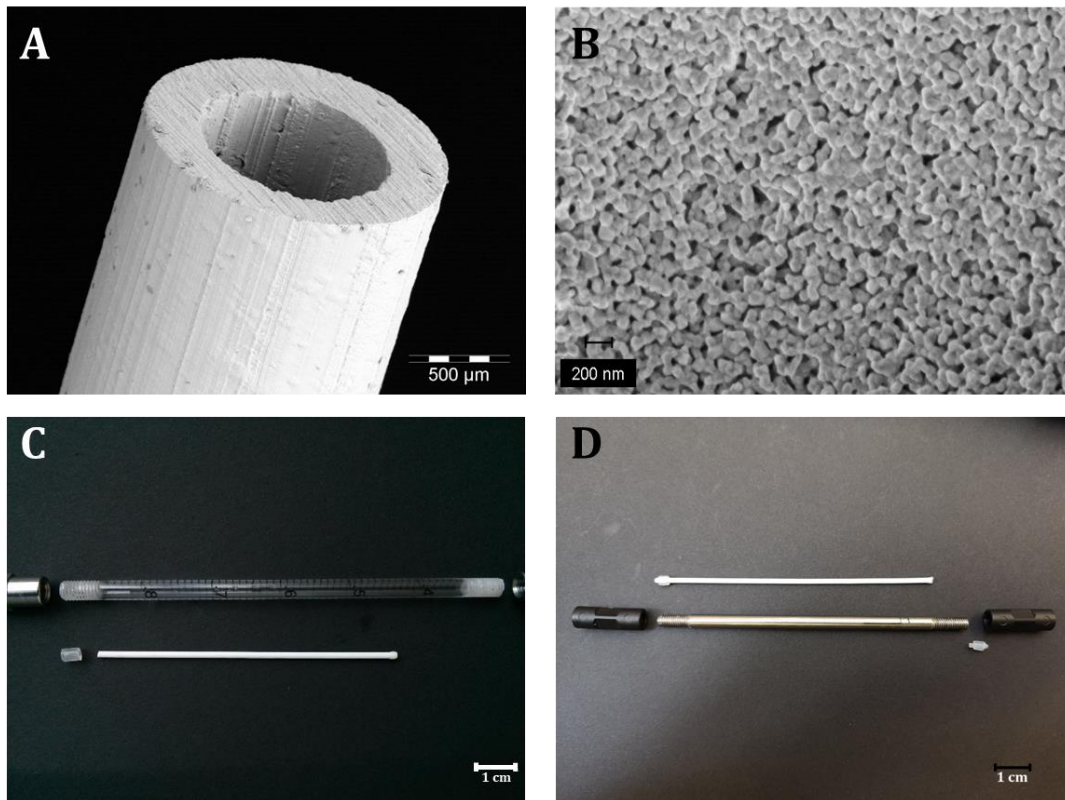


Abbildung 12: Aufbau des Einzelkapillarmoduls

A: Aufnahme einer extrudierten Kapillare, **B:** Nahaufnahme der Keramikoberfläche mit erkennbaren Poren, **C:** Einzelteile des Einzelkapillarmoduls mit Plastikgehäuse, **D:** Einzelteile des Einzelkapillarmoduls mit Edelstahlgehäuse

Die Kapillare bestand aus Yttrium-stabilisiertem Zirkoniumdioxid, wie es für technische Hochleistungskeramiken Verwendung findet. Die eingesetzten Kapillaren besaßen eine Länge von 10 cm, einen Außendurchmesser von 1726 µm mit einem Innendurchmesser von 1000 µm und einer Wanddicke von 363 µm. Die durchschnittliche Porengröße betrug 1,5 µm und die spezifische Oberfläche 0,422 m²/g, bei einem durchschnittlichen Gewicht von 550 mg/Kapillare. Ein Kapillarende wurde mit Cyanacrylatkleber versiegelt. Der Kapillare wurde am oberen Ende eine Silikondichtung (Außendurchmesser 2,5 mm, Innendurchmesser 1,5 mm, Länge 3mm) übergestülpt und anschließend in ein Edelstahlgehäuse (bzw. Plastikgehäuse) (Länge 11 cm, Innendurchmesser 2mm, beidseitiges 1 cm N 10-32 UNF Gewinde) geführt. Das andere Ende des Gehäuses wurde mit einer Silikondichtung und einem Platzhalter aus PTFE-Schlauch (0,8 mm) versehen. Durch Verwendung konischer HPLC 10-32 Union Fittings (PEEK) aus Plastik konnten diese nun aufgeschraubt werden. Durch den konischen Zulauf wurden die Silikondichtungen während des Einschraubens nach dem Prinzip einer Quetschverschraubung verdichtet, was zum zuverlässigen Verschluss des Systems führte. Die Verwendung von APTES-Linkern war gegenüber dem Einsatz von APDIPES-Linkern

vorzuziehen, da eine größere Beladungskapazität für die verwendete Alcalase erreicht werden konnte [121]. Die Kapillare und die Einzelteile des Moduls waren somit in der Handhabung sicher gegen Brüche und beständig hinsichtlich der oben genannten Anforderungen.

Für die Immobilisierungsstrategie der Proteasen wurden verschiedene gängige Protokolle getestet, mit dem Ziel eine möglichst hohe enzymatische Beladungskapazität der Kapillaren zu erreichen. Alle verwendeten Methoden basieren auf der Verwendung von Carbodiimid-Linkern (EDC) und N-Hydroxysuccinimid (NHS), welches häufig verwendete Chemikalien zur kovalenten Verbindung von Aminofunktionen sind. Als Testverfahren wurde die Proteindifferenzmessung angewandt, bei der nach erfolgter Immobilisierung der Proteingehalt der verbleibenden Immobilisierungslösung gemessen wurde.

Bei hohen NHS/EDC-Konzentrationen traten Interferenzen mit gebräuchlichen Proteinquantifizierungen wie Bicinchoninsäure basierten Assays auf [122]. Andere Methoden zur Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford (1976) oder Antharavally (2009) wiesen keine Unregelmäßigkeiten auf.

Die Silanisierung der Kapillare in Verbindung mit dem Coupling-Agens führte ebenfalls zu einer Interferenz. Fälschlicherweise konnte ein Proteingehalt gemessen werden (siehe Anhang Abbildung 51). Diese Fehlmessung musste bei der Berechnung der Beladungskapazität abgezogen werden und erfolgt daher nach:

$$\text{Beladungskapazität} = \frac{\text{Enzym c Coupling} - (\text{Enzym c Überstand} - \text{Enzym c Interferenz})}{\text{Gewicht Kapillare}} \quad (4)$$

Für die APTES silanisierten Kapillaren konnte eine Beladungskapazität von 0,3 µg Alcalase / mg Kapillare ermittelt werden, was einer Menge von 170 mg pro Kapillare entsprach. Die Immobilisierung der Enzyme erfolgte im Batch unter ständiger Bewegung bei 4°C über Nacht. Ansätze, die Kapillare kontinuierlich mit der Immobilisierungslösung durchströmen zu lassen, führten zu keiner nennenswerten Steigerung der Beladung mit Enzymen (siehe Abbildung 13). Dieser Ansatz war für die gleichzeitige Immobilisierung mehrerer Kapillaren technisch aufwändig.

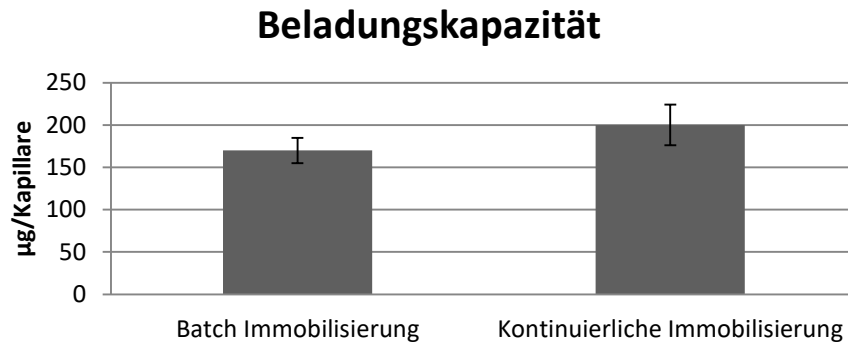


Abbildung 13: Vergleich des Immobilisierungsmodus. Durch die Immobilisierung im Batch-Verfahren konnten durchschnittlich 170 µg Enzym, im kontinuierlichen Verfahren durchschnittlich 200 µg Enzym auf der Kapillare immobilisiert werden.

Bei der Verwendung unterschiedlicher Keramikfunktionalisierungen konnte festgestellt werden, dass die Differenzen in der Beladungskapazität bei silanisierten und nicht-silanisierten Keramikkapillaren nur gering ausfielen. Demnach konnten ähnliche Mengen des Enzyms immobilisiert werden, obwohl unterschiedliche Bindungsmethoden (adsorptive und kovalente Bindung) zum Einsatz gekommen sind. Diese Ergebnisse wurden von Antink et al. (2019) bestätigt. In der Überprüfung der Stabilität konnte

hingegen gezeigt werden, dass unterschiedliche Immobilisierungsmethoden der Enzyme zu Änderungen in der Enzymaktivität bzw. Bindungsstabilität führten. Die schwache adsorptive Bindung, konnte durch Färbung der Kapillare mit Coomassie Blau nachgewiesen werden. Nach mehreren Waschkvorgängen zeigte sich eine Reduktion der Färbung (siehe Abbildung 14). Dies sprach für eine nur anfänglich zuverlässige Bindung der Alcalase an die Kapillaroberfläche. Diese Vermutung konnte mit weiteren Versuchen zur Enzymaktivität gestützt werden. Die Effektivität der Kapillare ein Substrat zu spalten, nahm nach einer größeren Durchlaufmenge ab. So wurde die Konversionsleistung bereits nach 20 mL bei adsorptiv



Abbildung 14: Coomassie gefärbte und gespülte Kapillaren mit adsorptiv (links) und kovalent (rechts) gebundenen Proteasen

immobilisierten Kapillaren um mehr als 50% reduziert, während kovalent gebundene Enzyme erhalten blieben. Dies sprach für einen starken Auswascheffekt des Enzyms bei adsorptiven Immobilisierungen (siehe Abbildung 15).

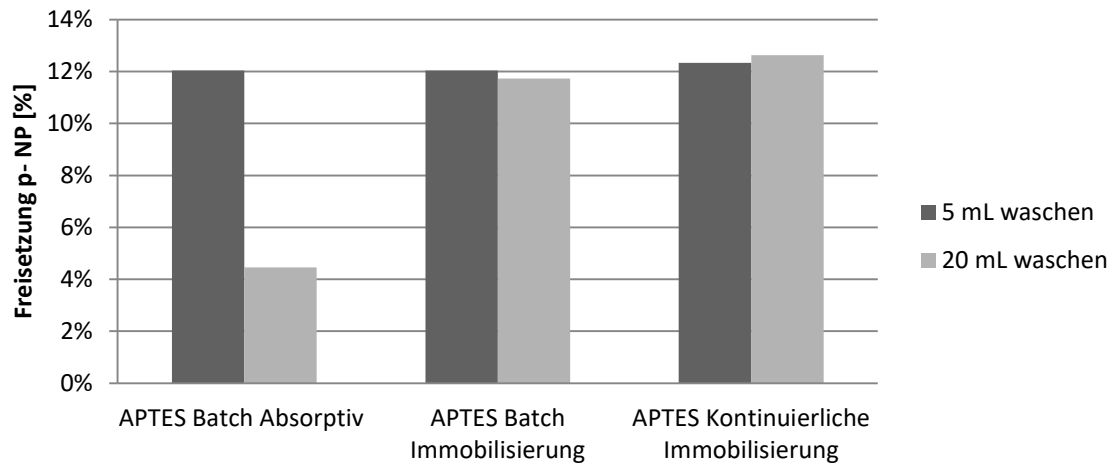


Abbildung 15: Auswascheffekte unterschiedlicher Immobilisierungsarten. Bei kovalent gebundenen Enzymen war kein Auswascheffekt des Enzyms feststellbar. Die Umsetzung des Substrates war nach einer Durchflussmenge von 20 mL bei absorptiv gebundenen Enzymen stark verringert.

Die Verwendung von BAN (Boc-L-alanine 4-nitrophenyl ester) als Substrat für die Alcalase stellte sich als sehr geeignet heraus. Die Menge an immobilisiertem Enzym auf der Kapillare führte allerdings zu einer sehr starken Konversion des BAN zu p-NP (p-Nitrophenol), welches im Detektor Messwerte außerhalb des messbaren Bereichs erzeugte. Die Kapillaren wurden daher von 10 cm auf 1 cm eingekürzt. Bei einer Flussrate von 400 $\mu\text{L}/\text{min}$ wurden dennoch durchschnittlich 15% des 4-NP freigesetzt. Die Funktionalisierung der Kapillaren mit der gewählten Immobilisierungsmethode war reproduzierbar, unterlag aber dennoch Schwankungen von knapp 10% (siehe Abbildung 16). Dies korreliert mit den Ergebnissen der Beladungskapazität (siehe Abbildung 13).

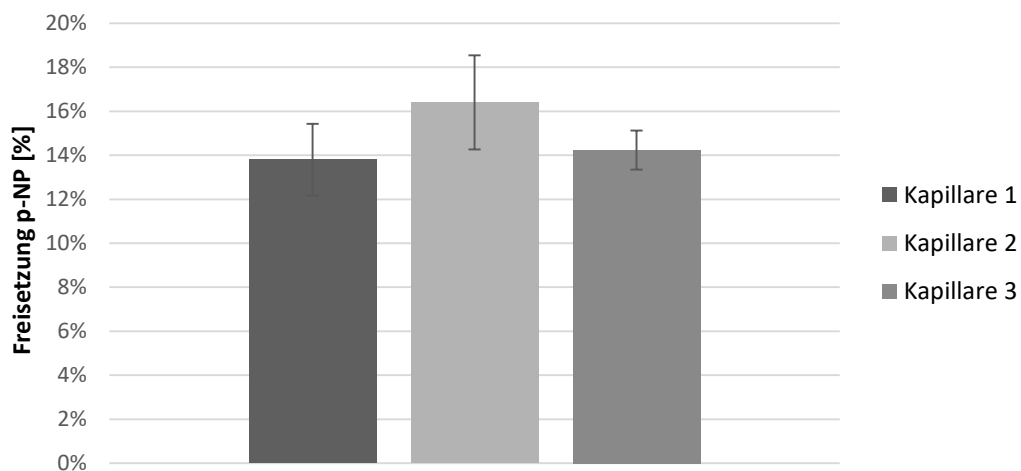


Abbildung 16: Reproduzierbarkeit der Kapillaraktivität. Unabhängige mit Enzym immobilisierte Kapillaren konnten wiederholt eine ähnliche Umsetzung des Substrates katalysieren.

Im Vergleich zu ungebundenen Enzymen in Lösung sind immobilisierte Enzyme durch die kovalente Bindung an ihrer Position fixiert. Wie in 3.4.1 erwähnt, führt dies häufig zu sterischen Hinderungen. Um Aussagen über die Qualität der Immobilisierung zu machen war es notwendig die Enzymaktivität zu ermitteln. Dadurch, dass sich die Strömungseigenschaften in der Nähe des Enzyms ändern, ist es schwierig einen Vergleich herzustellen. Die Substratkonzentration nahe des Enzyms wird verringert, wodurch die maximale Umsatzgeschwindigkeit von immobilisierten Enzymen sinkt. Um diesen Effekt zu minimieren, wurde pulverisiertes Zirkoniumdioxid zunächst silanisiert und dann funktionalisiert. Wie bereits erwähnt, wurde für die Kapillare eine Enzymmenge von 0,3 $\mu\text{g}/\text{mg}$ Kapillare ermittelt. Für das Pulver konnte eine Beladungskapazität von 1 $\mu\text{g}/\text{mg}$ Pulver bestimmt werden. Mit diesem Wissen konnte ein Aktivitätstest entwickelt werden, bei dem die Aufnahme einer Enzymkinetik möglich war. Die Umwandlung von Substrat zu Produkt fand in einem Becherglas statt. Unter Rühren wurde über ein im Durchfluss betriebenes Spektrophotometer die Absorption gemessen. Dadurch wurden die immobilisierten Enzyme künstlich „in Lösung“ gehalten. Mit der zuvor ermittelten Beladungskapazität konnten äquivalente Mengen freies Enzym und immobilisiertes Enzym verglichen werden (siehe Abbildung 17).

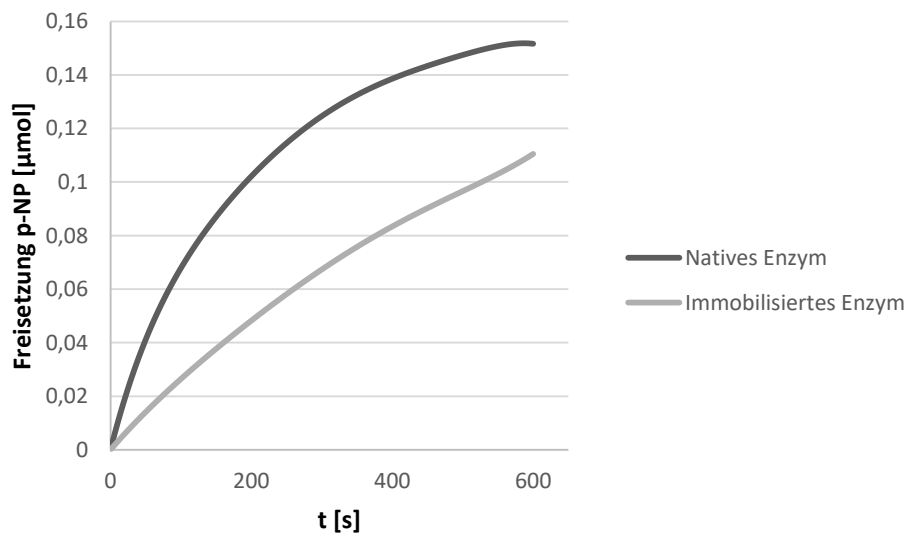


Abbildung 17: Vergleich des Substratumsatzes. Durch die Enzymimmobilisierung werden die katalytischen Eigenschaften des Enzyms im Vergleich zum nativen Enzym vermindert.

Zu beachten ist, dass das gesinterte ZrO_2 -Pulver eine hohe Hydrophobizität besaß und stattdessen nicht-gesintertes ZrO_2 -Pulver silanisiert und funktionalisiert wurde. Der Umsatz von BAN zu p-NP verlief zu Beginn der Messung linear und eignete sich daher für den Vergleich der beiden Messreihen. Daraus konnte eine Enzymaktivität von 33% für APTES silanisiertes ZrO_2 -Pulver abgeleitet werden.

Da es sich um ein durchflussbasiertes biokatalytisches System handelt, soll sich der Grad der Hydrolyse über den Volumenstrom bzw. die Verweilzeit variieren lassen. Das bedeutet, je langsamer der Volumenstrom, umso höher der Hydrolysegrad bzw. die Verweilzeit. Idealerweise verhält sich die Produktbildung antiproportional zum Volumenstrom. Dies konnte in Abbildung 18 belegt werden. Hier wird deutlich, dass bei einer Flussrate von $100 \mu\text{L}/\text{min}$ eine Freisetzung von $0,111 \mu\text{mol}$ p-NP vorliegt. Wird die Flussrate verdoppelt, so halbiert sich die Produktbildung. Damit halbiert sich auch die Verweilzeit und somit die Zeit, in der das Substrat von den immobilisierten Enzymen umgesetzt werden kann.

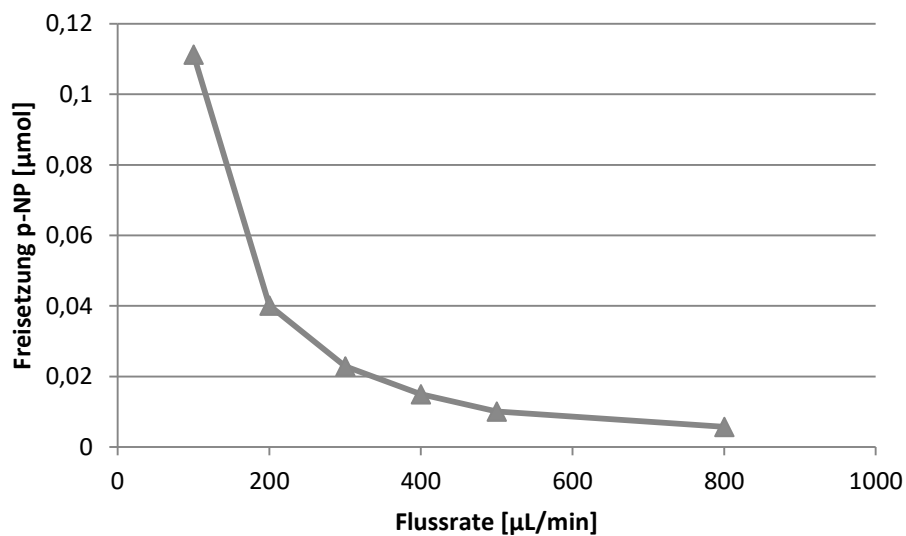


Abbildung 18: Flussraten-abhängige Produktbildung. Jeder Flussrate kann ein kontinuierlicher Umsatz des Substrates zugeordnet werden. Dieser Umsatz ist höher, je länger die Verweilzeit des Substrates innerhalb des Reaktormoduls.

Für die Herstellung von bioaktiven Peptiden sollen Proteinisolate für die kontinuierliche Biokatalyse Verwendung finden. Werden pflanzliche Speicherproteine wie Lupinenprotein für die Flussraten-abhängige Hydrolyse eingesetzt, kann der für das p-NP beobachtete Effekt bestätigt werden. Hier zeigt sich, dass Flussraten bis 100 $\mu\text{L}/\text{min}$ lediglich zu einem Abbau von 20% des im Feed vorhandenen Proteins führen. Wird die Flussrate auf ein Minimum von 11 $\mu\text{L}/\text{min}$ gesenkt, werden 76% des nativen Proteins hydrolysiert und in kleinere Proteinfragmente umgesetzt (siehe Abbildung 19).

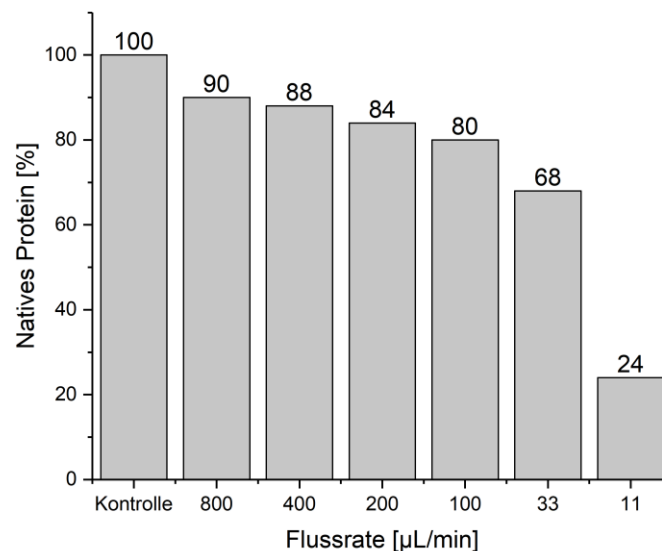


Abbildung 19: Flussraten-abhängige Hydrolyse des Lupinenproteins. Der Grad der Proteinhydrolyse ist bei maximaler Verweilzeit am höchsten

Die Verwendung eines Substrates wie BAN ist für die Ermittlung der Enzymaktivität hervorragend geeignet, da es eine höhere Spezifität für Proteasen wie Subtilisin (Alcalase) aufweist als sonst übliche Substrate wie N-CBZ-L-Valin-p-Nitrophenylester (siehe Anhang Abbildung 49). Es besitzt ein Molekulargewicht von 310,3 g/mol. Verglichen mit den Hauptbestandteilen der meisten pflanzlichen Speicherproteine, handelt es sich um ein sehr kleines Molekül mit leichter Zugänglichkeit zum katalytischen Zentrum des Enzyms. Bei einer Annahme von $1 \text{ Da} = 1 \text{ g/mol}$ besitzen Globuline mit über 200 kDa ein Molekulargewicht über 200.000 g/mol. Der Unterschied in der Masse und somit auch in der Größe der beiden Substrate wird klar deutlich. Vergleicht man nun die Flussraten-abhängige Konversion von BAN zu p-NP bzw. natives Lupinenisolat zu Proteinhydrolysat, so fällt auf, dass bei gleicher Flussrate die Hälfte bzw. ein Viertel des Proteinsubstrates umgesetzt wird. Erst bei höheren Verweilzeiten verringert sich dieser Unterschied (siehe Abbildung 20).

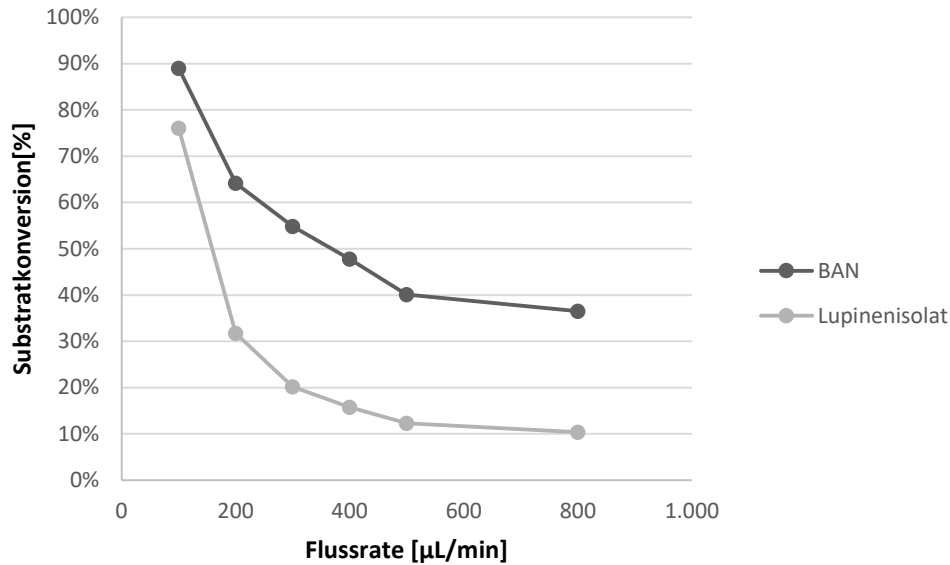


Abbildung 20: Vergleich der biokatalytischen Umsetzung verschiedener Substrate. Das BAN-Substrat konnte insgesamt besser vom immobilisierten Enzym umgesetzt werden. Bei geringen Flussraten lagen die Umsatzraten bei beiden Substraten bei über 75%.

Für den Einsatz von immobilisierten Enzymen in biokatalytischen Prozessen war allerdings nicht nur der kontrollierbare Verdau von nativen Proteinen entscheidend. Da möglichst bioaktive Peptide gebildet werden sollen, galt es Proteasen zu untersuchen, die natives Protein bei möglichst kurzen Reaktionszeiten hydrolysieren können. Diese eignen sich besonders für den Einsatz in kontinuierlichen Systemen, da trotz geringer Verweilzeiten hohe Hydrolysegrade möglich sind. Ein Großteil der bisher identifizierten bioaktiven Peptide weisen Peptidlängen unterhalb von 10 AS auf. Daher war es sinnvoll das System so auszurichten, dass überwiegend Peptide im Bereich von 2- 10 AS gebildet wurden. Die proteolytische Aktivität der verwendeten Protease sollte dabei nicht als limitierender Faktor fungieren, sondern die Regulierung des Hydrolysegrades überwiegend über die Flussrate erfolgen.

BAPs werden auf natürliche Weise, meist durch Verdauung von Proteinen im gastrointestinalen Trakt, freigesetzt. Aus diesem Grund ist es naheliegend die hydrolytische Aktivität von Proteasen zu untersuchen, die aus dem Magen stammen. Wie in Tabelle 4 gezeigt, sind hier vor allem Trypsin und α -Chymotrypsin zu nennen. Proteasen wie Subtilisin schneiden sehr unspezifisch, sind aber in der Lage, Proteine in kurzer Zeit in viele kurzkettige Peptide zu hydrolysieren. Für die Verwendung in einem kontinuierlich betriebenen System scheinen sie daher sehr geeignet.

Casein ist ein gut erforschtes Lebensmittelprotein, das sich als Standardnahrungsmittelprotein in der Wissenschaft etabliert hat. Es wird aus Kuhmilch

gewonnen und kann als reines Protein isoliert werden. Für den Vergleich der unterschiedlichen Proteasen wurden die spezifischen Peptidfingerprints der Proteasen ausgewertet. Dazu wurde eine Caseinlösung mit einer Konzentration von 10 g/L angesetzt und mit einer Enzymkonzentration von 10 mg/L bei 37°C für 30 min hydrolysiert. Der Verdau wurde durch die Zugabe eines Proteaseinhibitors (Pefabloc® SC, 0,12 g/L) inaktiviert und die Proben auf Eis gelagert. Die Analyse in der RP-HPLC erfolgte mit einer analytischen C18-RP Säule (Phenomenex Aeris Peptide 3,6 µm XB-C18) über zwei acetonitrilhaltige Eluenten und TFA unter Verwendung eines Gradienten (siehe Anhang). Die Probe wurde zuvor durch einen PES-Filter mit einem Porendurchmesser von 0,45 µm filtriert. Es wurde ein Probenvolumen von 10 µL in der RP-HPLC appliziert und bei einer konstanten Flussrate von 0,4 mL/min, sowie einer Säulentemperatur von 40°C und einer Laufzeit von 40 min aufgetrennt. Die Detektion erfolgte mit einem Dioden-Array-Detektor bei einer Wellenlänge von 214 nm. Der Peak des nativen Caseins war bei einer Retentionszeit von 34 min zu finden, zwecks Übersichtlichkeit und besserer Vergleichbarkeit im Bereich der Peptide, wurde ein Retentionszeitfenster von 12- 32 min gewählt.

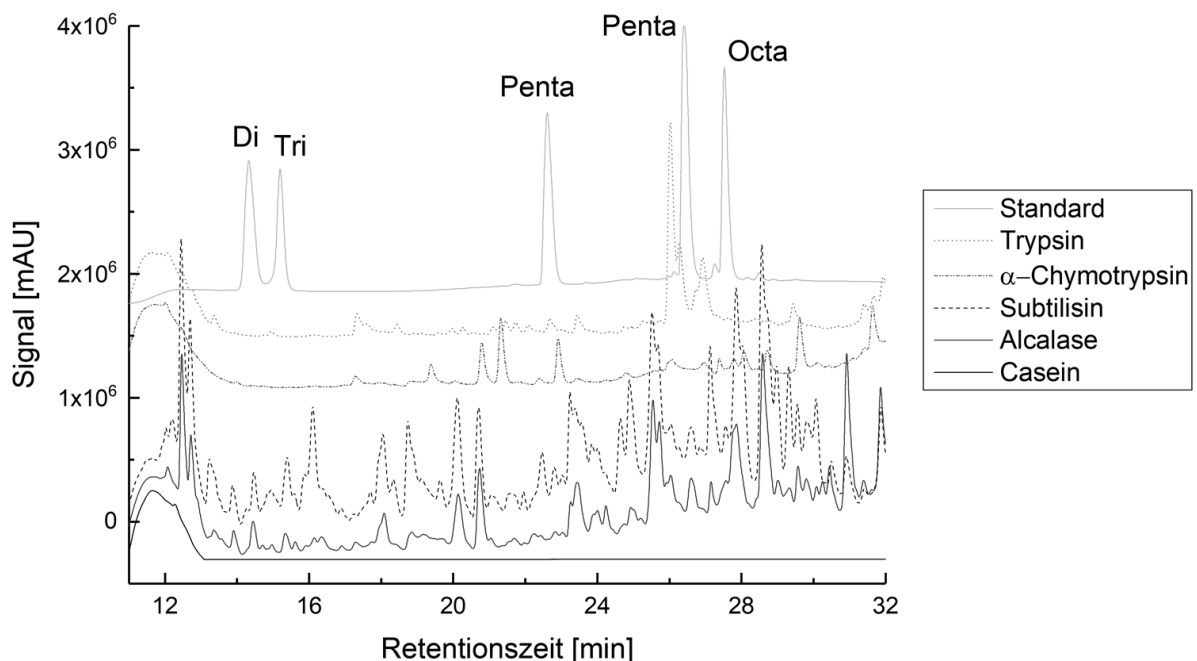


Abbildung 21: Batch-Verdau Vergleich der Proteasen (RP-HPLC). Die Anzahl an kurzkettigen Peptidpeaks ist bei Verwendung von Subtilisin und Alcalase weitaus höher.

In der RP-HPLC Analyse zeigte sich, dass keine Fragmente bei unverdaulichem Casein im Bereich der kurzkettigen Peptide zu finden waren. Für die Verdauungsenzyme Trypsin und α -Chymotrypsin war nur eine schwache Peptidbildung zu erkennen und auch die

Anzahl an gebildeten Peptidpeaks war gering. Die Enzyme Subtilisin und Alcalase wiesen dagegen eine intensive Peptidbildung und einen sehr ähnlichen Peptidfingerprint auf. Dies ist auf die enge Verwandtschaft der Alcalase mit Subtilisin zurückzuführen. Die Intensität der Peaks war besonders im Bereich der Penta- und Octapeptide höher. Auch sehr kurzkettige Peptide im Bereich der Di- und Tripeptide konnten bereits bei einer Hydrolysezeit von 30 min gebildet werden. Möglicherweise wurden bereits einzelne Aminosäuren freigesetzt, was bei klassischen Verdauungsenzymen erst nach mehreren Stunden erfolgt. Darauf deuten die intensiven Peaks bei einer Retentionszeit von 13 min hin (siehe Abbildung 21).

Die Ergebnisse konnten mit der Gelelektrophorese in einem nicht reduzierten SDS-Gel auf Proteinebene bestätigt werden. Das Casein besteht aus mehreren Untereinheiten, dem α -S1- (22 kDa), α -S2- (25 kDa), β - (24 kDa) und κ -Casein (19 kDa). Beim Verdau mit α -Chymotrypsin ist erkennbar, dass nach 30 min überwiegend das α -S2-Casein verdaut war; alle anderen Proteinbanden blieben nahezu unverändert bestehen. Subtilisin und Alcalase hydrolysierten dagegen sämtliche Caseinbestandteile größer als 15 kDa innerhalb von 30 min vollständig (siehe Abbildung 22).

Der Abbau der Proteine im Batch-Verdau wurde für verschiedene Hydrolysezeiten untersucht, um Aufschluss über die Abhängigkeit der Reaktionszeit vom Hydrolysegrad zu erhalten (siehe Anhang). Dazu wurden die Enzyme hydrolysiert und im Anschluss durch Zugabe von Proteaseinhibitor inaktiviert. Das Casein wurde parallel dazu unter Verwendung verschiedener Flussraten kontinuierlich im Kapillarmodul hydrolysiert. Durch die Fixierung der Enzyme an der Trägermatrix ist die Mobilität im Vergleich zu freien Enzymen stark eingeschränkt und der Zugang zu Angriffspunkten im Substrat verringert. Daher war davon auszugehen, dass sich die Peptidfingerprints im Chromatogramm an einigen Stellen geringfügig unterschieden, jedoch durch ihre Spezifität größtenteils Ähnlichkeiten erkennbar waren. Man kann daher annehmen, dass die Peptidzusammensetzung des Hydrolysats zu einem spezifischen Zeitpunkt im Batch-Verdau, der

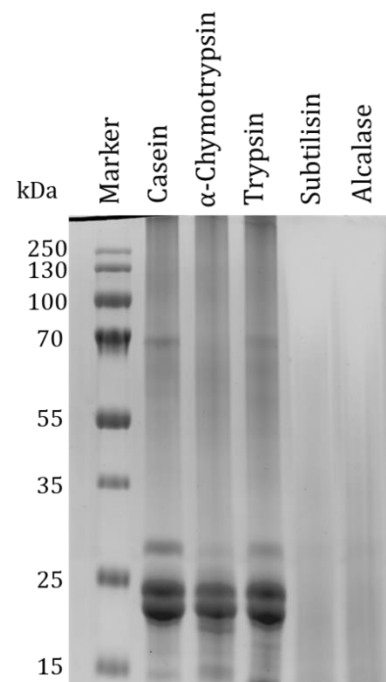


Abbildung 22: Batch-Verdau Vergleich der Proteasen (SDS-PAGE). Subtilisin und Alcalase hydrolysieren innerhalb kürzester Zeit sämtliche Proteine

Peptidzusammensetzung einer entsprechenden Flussrate im kontinuierlichen Verdau entspricht.

Übereinstimmende Peptidpeaks fanden sich in der RP-HPLC-Messung der Caseinhydrolysate bei dem Vergleich von Batch- und kontinuierlichem Verdau. Hier zeigte sich, bei Gegenüberstellung der Chromatogramme des Batch-Verdau von 30 min und dem kontinuierlich erzeugten Hydrolysat bei einer Flussrate von 33 $\mu\text{L}/\text{min}$, dass eine hohe Übereinstimmung der Peaks im Bereich der Penta- und Octapeptide auftrat. Hier waren allerdings auch mehrere Übereinstimmungen im Bereich der Tripeptide zu finden (siehe Abbildung 23).

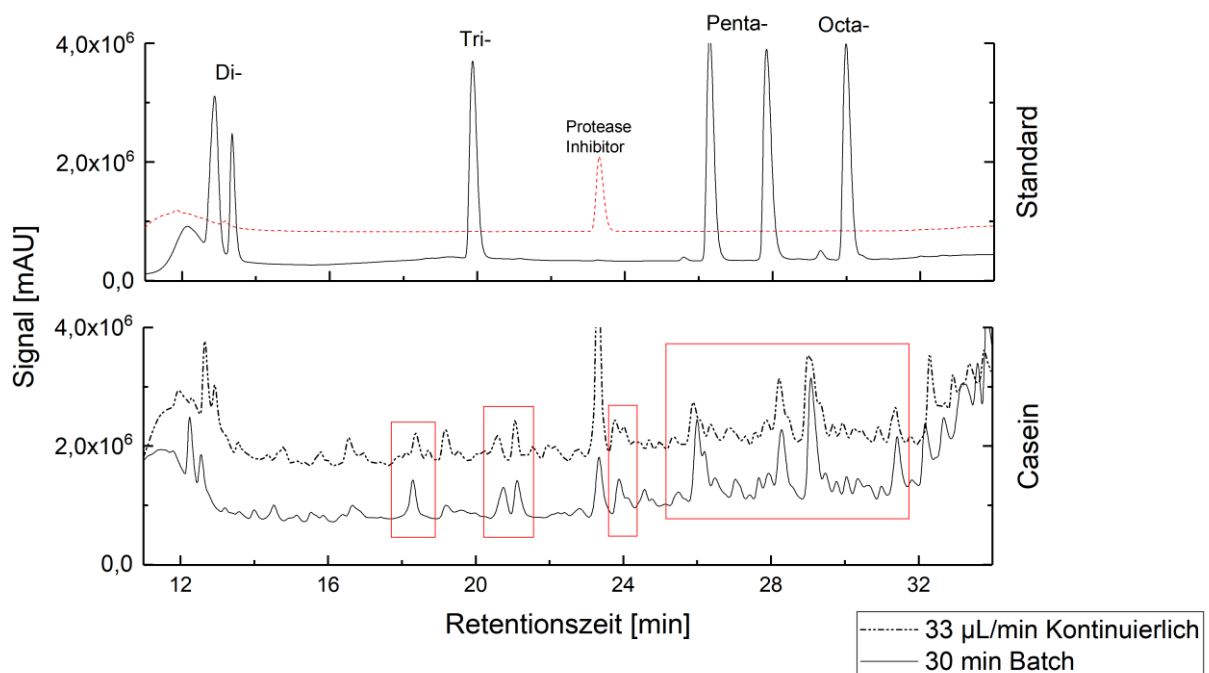


Abbildung 23: Vergleich des Peptidfingerprints aus Batch- und Kontinuierlicher Hydrolyse (RP-HPLC). Es waren Ähnlichkeiten in den Peptidfingerprints feststellbar, da einige Peptidpeaks übereinstimmende Retentionszeiten aufwiesen.

Im Vergleich zu Batch-Hydrolysaten ließ sich mit der kontinuierlichen Betriebsweise des biokatalytischen Kapillarmoduls ein Proteinhydrolysat mit beständigem und flussratenabhängigem Peptidfingerprint erzeugen. Für den Prozess zur Herstellung von Proteinhydrolysaten bedeutet dies stabile und kontrollierbare Hydrolysebedingungen.

4.1.2 Proteinfeeds für die kontinuierliche Hydrolyse

Casein wird häufig als Standardprotein verwendet, allerdings weist es verschiedene Nachteile für die Verwendung in durchflussbasierten hydrolytischen Systemen auf. In Lösung liegt das Casein in mizellaren Strukturen vor, welche durch Hydrolyse zu starker Aggregation neigen. Bei Verwendung der Kapillaren mit 1,5 µm Poren kam es daher leicht zu Verblockungen innerhalb der Kapillare. Mit dem Kapillarmodul sollte eine möglichst hohe Variabilität und Leistung in unterschiedlichen Anwendungen erzielt werden. Aus diesem Grund war es vorteilhaft, verschiedene Proteinlösungen auf ihre Eignung zu testen. Als Proteinquellen kamen vor allem in Wasser gut lösliche Proteine in Betracht. Die Proteinfeeds sollten in der Vorbereitung möglichst einfach zu handhaben und nur wenige Arbeitsschritte zur Herstellung der Proteinlösung notwendig sein. Es sollte eine Proteinlösung mit einer Proteinkonzentration von 5 g/L verwendet werden. Vom Proteinpulver zur Proteinlösung ergaben sich durch die Prozessierung unterschiedlich hohe Verluste. Bei gleicher Ausgangskonzentration der Proteinpulver, waren unterschiedliche Endkonzentrationen in den Proteinlösungen festzustellen (siehe Tabelle 5). Die pH-Shift Methode entfaltet Proteine zunächst und bringt sie in Lösung. Unlösliche Proteine und Bestandteile wie Lipide können durch Zentrifugation separiert werden. Danach erfolgt die Renaturierung durch langsames Senken des pH-Wertes. Ein kleiner Teil der Proteine verliert seine hydrophilen Eigenschaften und kann abzentrifugiert werden. Besonders Reis und Maca wiesen einen geringen Restproteinanteil in der Lösung auf.

Alle Proteinquellen wurden auf die gleiche Weise behandelt. Dazu wurden je 5 g/L Proteinpulver in 0,05 M TRIS-Puffer mit pH 12 resuspendiert und für 2-3 h bei 8°C geschwenkt. Die Suspension wurde im Anschluss bei 10.000g für eine Stunde zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Pellet verworfen. Der Überstand wurde auf einen pH-Wert von pH 7,8 eingestellt, bevor die Lösung über Nacht bei 8°C geschwenkt wurde. Nach diesem Schritt wurde erneut bei 10.000g für 1,5 h zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Pellet verworfen. Die Suspension wurde mit einem Ultraschallhomogenisator (Hielscher UP100H) für 30 s auf Eis homogenisiert und im Anschluss durch einen 0,22 µm

Tabelle 5: Löslichkeit von Proteinpulver

Protein- quelle	Gelöstes Protein (%)
Hanf	10%
Soja	32%
Kürbis	11%
Reis	3%
Erbse	36%
Mandel	26%
Sonnenblume	22%
Lupine	24%
Maca	2%
Gerstengras	16%

PES-Filter filtriert. Dadurch konnten sowohl mögliche Aggregate für den späteren Einsatz im Kapillarmodul minimiert als auch kontaminierende Bakterien entfernt werden. Die Proteinlösung war auf diese Weise über 4 Wochen bei Kühlung um 8°C verwendbar und die darin enthaltenen Proteine stabil.

Die Proteinlösungen wurden in einer nativen SDS-PAGE miteinander verglichen und der Proteingehalt über den BCA-Assay bestimmt. Alle Proben wurden anhand der ermittelten Proteinkonzentrationen normalisiert und die 12% Bis-Tris Gele mit einer Proteinkonzentration von 1 g/L beladen. Bei einer Spannung von 150 V betrug die durchschnittliche Laufzeit 60 min. Anschließend erfolgte die Färbung der Proteine mit Coomassie Blau.

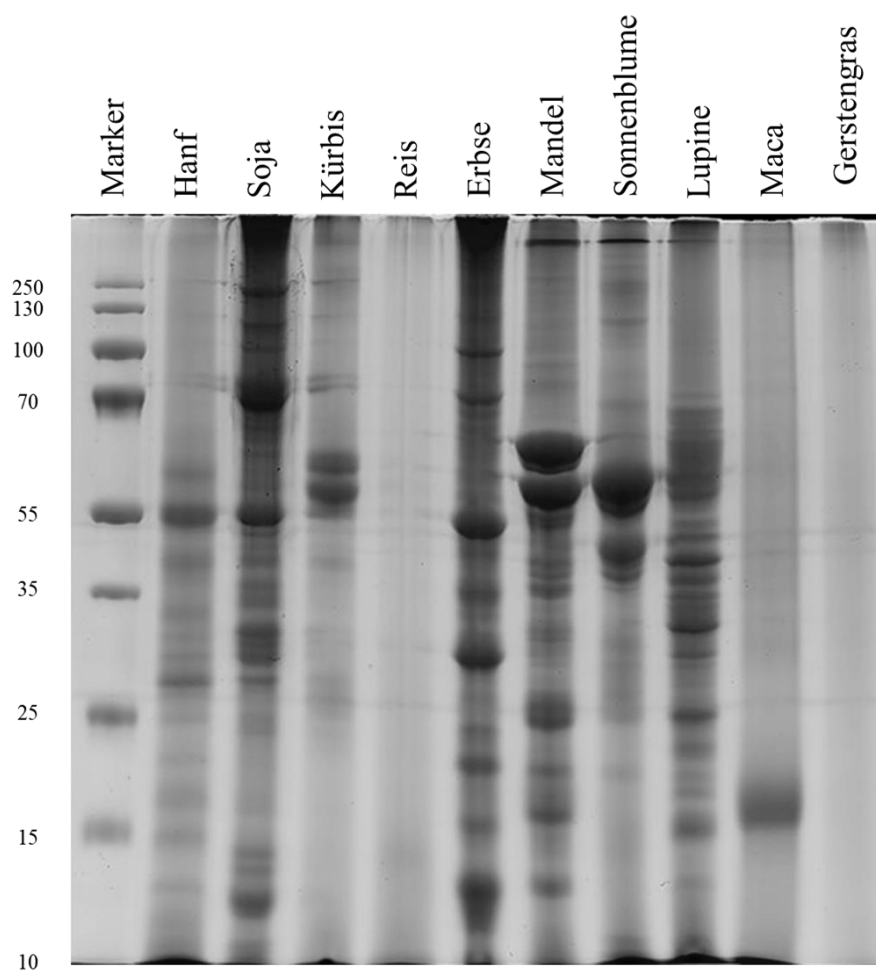


Abbildung 24: Löslichkeitstest der Proteinquellen (SDS-PAGE). Die Proteinpulver erzeugten spezifische Proteinbanden, was für eine hohe Löslichkeit sprach. Reis, Maca und Gerstengras wiesen eine sehr geringe Löslichkeit auf, charakteristische Proteinbanden waren kaum sichtbar.

Der BCA-Assay ist eine kolorimetrische Methode, daher führen intensive Pflanzenfarbstoffe in den Proteinpulvern zu Interferenzen. Die Proteinlösungen wurden zusätzlich mit der SDS-PAGE auf ihre Proteinbestandteile überprüft. Nach der Normalisierung der Proben zeigte sich, dass sowohl Reis, Maca als auch

Gerstengraspulver einen geringen Anteil an gelöstem Protein aufwies. Soja, Erbse, Mandel, Sonnenblume und Lupine zeigten intensive Proteinbanden. Kürbis und Hanf waren weniger stark ausgeprägt (siehe Abbildung 24). Die verwendeten Proteinpulver wiesen unterschiedliche Proteinkonzentrationen auf und waren unterschiedlich stark aufgeschlossen. Grundsätzlich ließ sich sagen, dass Protein, welches in Samen gespeichert wird (Speicherprotein), eine gute Löslichkeit in wässrigen Lösungen besitzt und daher im Kapillarmodul unter kontinuierlichen Bedingungen hydrolysiert werden konnte.

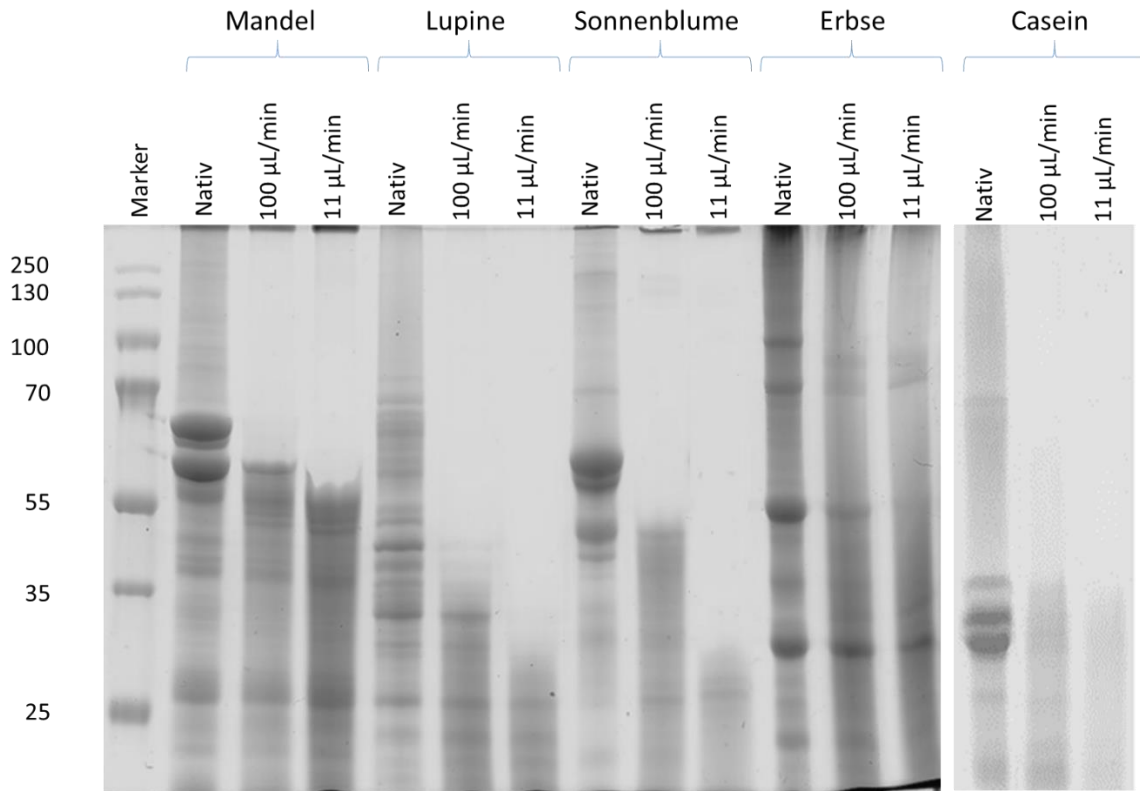


Abbildung 25: Kontinuierliche Hydrolyse verschiedener Proteinfeeds und Flussraten (SDS-PAGE). Alle Proteinfeeds eigneten sich für den kontinuierlichen biokatalytischen Einsatz. Je nach Flussrate wurden zunächst die Makroproteine hydrolysiert.

Um Abweichungen bei der Verwendung unterschiedlicher Proteinlösungen in der kontinuierlichen Hydrolyse auszuschließen, wurden die Proteinlösungen auf ihre enzymatische Spezifität überprüft. Daher wurden Proteinlösungen von Mandel-, Lupinen-, Sonnenblumen-, Erbsenprotein und Casein mit einer Konzentration von 5 g/L vorbereitet, um das hydrolytische Verhalten bei verschiedenen Flussraten zu untersuchen. Das Hydrolysat wurde nach dem Durchlauf auf Eis gelagert und mit Proteaseinhibitor (0,12 g/L) behandelt, um dem hydrolytischen Effekt möglicher ausgewaschener Enzyme entgegenzuwirken.

Dabei wurde bei allen verwendeten Proteinlösungen das Prinzip der Flussraten-abhängigen Hydrolyse erkennbar (siehe Abbildung 25). Für die Proteinlösungen aus Mandel- und Erbsenprotein waren bei einer Flussrate von 11 $\mu\text{L}/\text{min}$ Proteinfragmente bis 55 kDa sichtbar. Proteine größer als 55 kDa wurden überwiegend hydrolysiert, bei Erbsenprotein waren jedoch auch größere Proteinfragmente bei 70 kDa im Hydrolysat zu erkennen. Hier schien es, als besäßen die Speicherproteine von Mandeln und Erbsen eine höhere Stabilität gegenüber enzymatischer Verdau, da sie etwas weniger stark hydrolysiert werden konnten. Eine weitere Erklärung für die verminderte Hydrolyse stellen mögliche natürliche Proteaseinhibitoren in den Speicherproteinen dar. Am deutlichsten wurden die unterschiedlichen Verweilzeiten der Proteine im Kapillarmodul bei den Proteinlösungen von Lupine, Sonnenblume und Casein. Nahezu alle Proteinfragmente mit einer Größe <30 kDa konnten hydrolysiert werden. Somit fand eine Veränderung der Hydrolysatzusammensetzung von größeren zu kleineren Proteinfragmenten statt, welche über die Flussrate reguliert werden konnte.

Die Analyse der Hydrolysate in der SDS-PAGE eignete sich nur für Molekülgrößen in einem Spektrum von 10 bis 250 kDa. Kleinere Molekülgrößen bzw. Proteinbanden konnten nicht erkannt werden, da sie sich innerhalb der Lauffront befanden. Eine Differenzierung von kurzkettigen Peptiden war daher durch die verhältnismäßig grobe Gelmatrix nicht möglich. Um weitere Unterschiede in den Hydrolysaten auf Peptidebene festzustellen, war eine zusätzliche Untersuchung mit der RP-HPLC notwendig. Mit Hilfe der RP-HPLC ließ sich der Peptidfingerprint genauer untersuchen und feststellen, ob sich Zwischenstufen des hydrolytischen Proteinabbaus finden lassen oder ob sich einige Peptidpeaks nur bei spezifischen Flussraten bildeten.

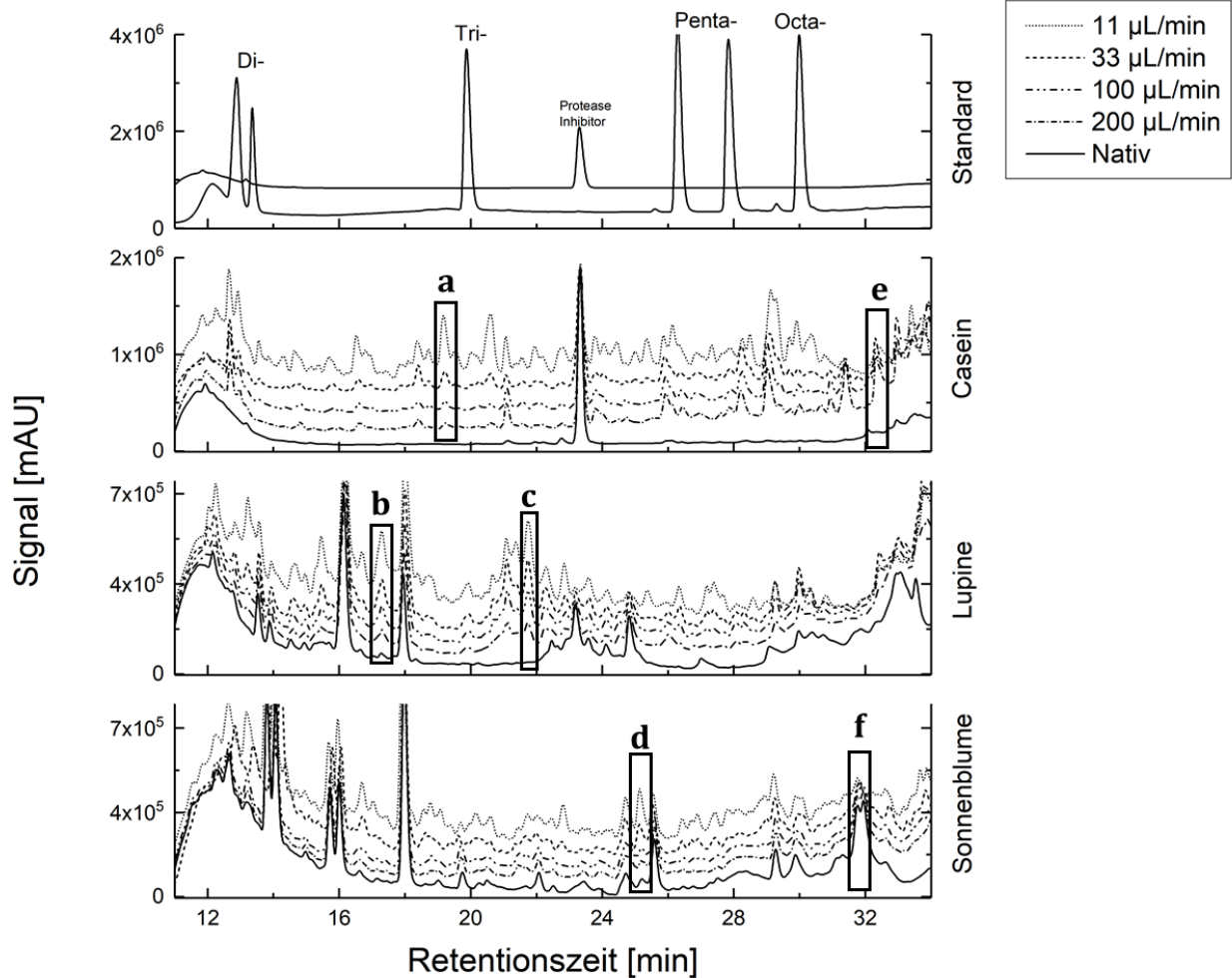


Abbildung 26: Flussraten-abhängige Peptidbildung verschiedener Proteinlösungen (RP-HPLC). Einige Peaks bildeten sich bei spezifischen Flussraten bzw. wiesen unterschiedliche Intensitäten auf.

Bei dem Vergleich der Chromatogramme aus den nativen Proteinlösungen fällt auf, dass lediglich Casein frei von kurzkettingen Peptidpeaks war. Der Hauptproteinpeak erschien bei einer Retentionszeit von ungefähr 34 min. Bei allen drei Proteinlösungen ließ sich eine Zunahme der Peptidpeaks, bei gleichzeitiger Abnahme der Flussrate feststellen. Besonders auffällig war dies bei den Peptidpeaks a bei Casein, b und c bei der Lupine und d bei der Sonnenblume zu beobachten. Peptidpeak e bei Casein zeigte ein anderes Verhalten, so war er bei einer Flussrate von 200 µL/min stark ausgeprägt, bei langsameren Flussraten verringerte er sich dagegen. Andere Peaks wie f waren dagegen schon in der nativen Proteinlösung vorhanden, er war jedoch bei geringeren Flussraten schwach ausgeprägt. Bei Lupinenprotein konnte zudem eine Zunahme der Peptidpeaks im Bereich der Di- bis Pentapeptide festgestellt werden. Es wurden demnach

überwiegend sehr kurzkettige Peptide bei maximaler Verweilzeit gebildet (siehe Abbildung 26).

Um die Raum-Zeit-Ausbeute für das gebildete Hydrolysat zu erhöhen, war es sinnvoll das Reaktormodul von einem Einzelkapillarsystem zu einem Multikapillarsystem auszubauen. Zur Abdichtung des Systems sollte das Prinzip einer Quetschverschraubung beibehalten werden, da in der experimentellen Phase das Auswechseln einzelner Kapillare bzw. das Einfügen eventueller Platzhalter in den sehr materialintensiven Testläufen, weiterhin möglich sein sollte.

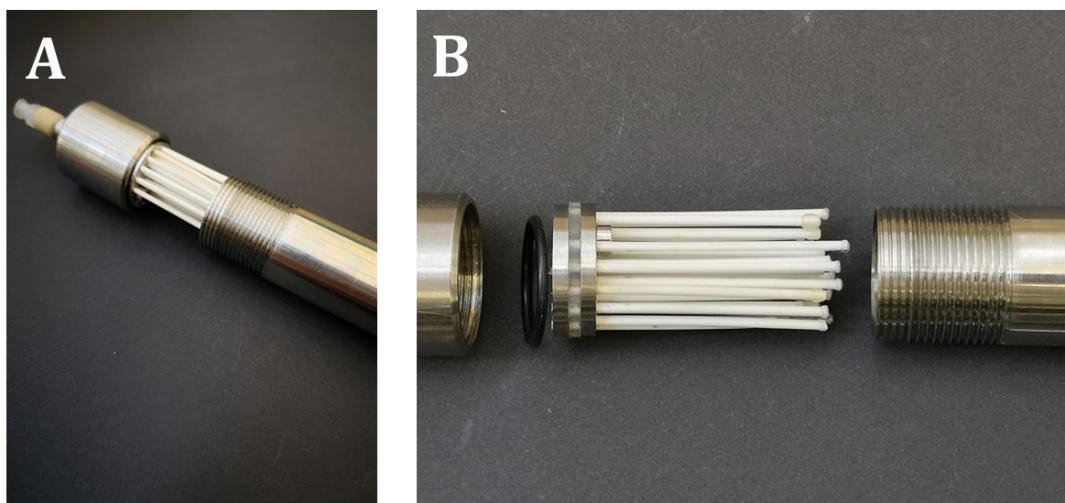


Abbildung 27: Prototyp eines Multikapillarmoduls
A: Multikapillarmodul offen, B: Multikapillarmodul Detailansicht

Ein erstes als Prototyp entwickeltes Modul konnte mit 24 Kapillaren bestückt werden. Die Kapillaren wurden in eine Silikonscheibe gesteckt, welche von zwei Edelstahlscheiben umgeben wurde. Durch Anziehen zweier Schrauben in den Edelstahlscheiben, konnte das Silikon verdichtet werden, wodurch die Kapillaren fest umschlossen und abgedichtet wurden. Der Aufbau konnte dann in ein Edelstahlgehäuse gegeben und fest verschraubt werden (siehe Abbildung 27). In der bisherigen Entwicklungsphase war es jedoch nicht möglich, die Gewinde in den Edelstahlscheiben ausreichend abzudichten, um einen Fluss des Proteinfeeds durch die Kapillaren zu gewährleisten.

4.1.3 Fazit

Die bisherigen Daten zeigten, dass das auf makroporösen Keramikkapillaren basierende biokatalytische System den Vorgaben weitestgehend entsprach und hinsichtlich der Eigenschaften des immobilisierten Enzyms erfolgreich charakterisiert werden konnte. Die Entwicklung eines einfach zu handhabenden Kapillarmoduls konnte durch einen simplen Aufbau bewerkstelligt werden. Durch die Verstärkung der Kapillarwandung waren die Kapillaren in der Handhabung, im Vergleich zu Vorgängermodellen, weniger stoßanfällig. Die Kombination des aus wenigen Teilen bestehenden Moduls mit der Möglichkeit, die Kapillaren im Batch zu funktionalisieren, macht es besonders für die zuverlässige experimentelle Einsatzweise verwendbar und erfordert einen geringen technischen Aufwand. Das angewandte Immobilisierungsverfahren über APTES-Linker und NHS/EDC-Coupling hat sich als robust herausgestellt, da die Enzyme durch die kovalente Bindung eine hohe Stabilität aufwiesen. Der Einsatz von Keramikkapillaren im experimentellen Maßstab war sinnvoll, da sie als Trägerstruktur viele vorteilhafte Eigenschaften mitbrachten. Sie waren leicht zu handhaben und durch den Sinterprozess individuell in ihren Spezifikationen an die jeweilige Anwendung anpassbar. Die in diesem Projekt verwendeten Porengrößen waren 0,2 μm , 0,4 μm und 1,5 μm , wobei alle weiterführenden Arbeiten mit 1,5 μm Porengröße erfolgten. Obwohl die Porengröße nahezu verachtfacht wurde, traten weiterhin Verblockungen der Kapillare nach einer Durchflussmenge von 10 mL auf. Dies war für weiterführende Versuche ausreichend, jedoch nicht für dauerhafte kontinuierliche Betriebsweisen des Reaktormoduls. Besonders die für kontinuierliche biokatalytische Systeme wichtige prozentuale Wiederverwertbarkeit der Enzyme konnte daher nicht ermittelt werden. Durch Änderung der Trägerstruktur bzw. Porengröße könnte ein ausreichend langanhaltender Dauerbetrieb ermöglicht werden. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass verschiedene Proteinquellen mit dem Modul verwendet werden können. Besonders die Speicherproteine der zur Familie der Leguminosen gehörenden Proteinquellen konnten erfolgreich über die pH-Shift-Methode für den Einsatz möglicher Proteinfeeds etabliert werden. Hier könnten über modifizierte Prozesse weitere Proteinquellen erschlossen werden. So wirkte sich zum Beispiel die Homogenisation der Suspension über Ultraschall positiv auf die Löslichkeit der Proteine aus. Modellproteine wie BSA waren für die Hydrolyse im kontinuierlichen System nicht zielführend, obwohl sie eine hohe Löslichkeit

besaßen, waren sie durch die Alcalase schlecht verdaubar. Das Konzept der flussratenabhängigen kontinuierlichen Biokatalyse konnte mit verschiedenen Proteinfeeds erfolgreich demonstriert werden. Hierbei wiesen die Hydrolysate bei der geringsten Flussrate von 11 µL/min die höchste Anzahl an Peptidpeaks auf. Einige der Peaks konnten darüber hinaus bei spezifischen Flussraten erzeugt werden. Dies ist für das Screening möglicher bioaktiver Peptide von Vorteil, da auf diese Weise Zwischenstufen der Proteinhydrolyse untersucht werden könnten.

4.2 Aufreinigung der Peptide

Auf Basis der bisherigen RP-HPLC-Methode sollte eine Anpassung an den FPLC Maßstab erfolgen. Neben den mechanischen Stellgrößen, sind die Parameter Temperatur, Flussrate und mobile Phase (Gradient) zu nennen, welche die Auftrennung beeinflussen. Die für dieses Projekt interessanten Peptidgrößen wiesen eine Retentionszeit von 14 - 34 min auf (siehe Abbildung 25), es war daher naheliegend die Auftrennung in diesem Bereich zu optimieren und das Chromatogramm zu strecken. Dafür gibt es mehrere dynamische Einflussgrößen, die in der van-Deemter-Gleichung zusammengefasst sind:

$$H = A + \frac{B}{u} + C \cdot u \quad (5)$$

Diese sagt aus, dass die Trennleistung eines Systems umso besser ist, je mehr sich die Bodenhöhe (H) gegen 0 bewegt. H hängt dabei von der Streudiffusion (A), der Longitudinal-Diffusion (B), dem Massenübergang (C) und der Strömungsgeschwindigkeit (u) ab.

Die Streudiffusion oder Eddy-Diffusion wird von der Packdichte und der Partikelgröße bestimmt, sie wird durch den Term $2\lambda dp$ berechnet. Wobei λ die statistische Unregelmäßigkeit in der Packdichte angibt und d_p für die Partikelgröße stehen. Die Partikelgröße war mit 3,6 µm bei der RP-HPLC und mit 5 µm bei der FPLC gegeben. Somit sollten die Peaks in der analytischen Säule eine geringere Peakbreite aufweisen. Die Longitudinaldiffusion kann bei beiden Säulen als ähnlich angenommen werden, da diese hauptsächlich von der Flussrate und der mobilen Phase (Gradient) bestimmt wird. Sie wird durch den Term $2\gamma D_m$ berechnet. Einflussgrößen sind der Labyrinthfaktor (γ) und der Diffusionskoeffizient der mobilen Phase (D_m) Der Massenübergang als Koeffizient C wird unter anderem vom Partikeldurchmesser bestimmt, wobei der Massenübergang aus

C_s+C_m gebildet wird. Sie stellen die Massentransporte der mobilen (C_m) und stationären (C_s) Phase dar. Bei beiden Säulen wurde ein identisches Packungsmaterial verwendet. Die Aufreinigung der Peptide wurde mit Hilfe einer FPLC durchgeführt. An dieser wurde eine präparative Säule (Phenomenex Aeris Peptide 5 μ m XB-C18 LC) zur Trennung der Peptide verwendet, die äquivalent zur RP-HPLC-Säule war. Sie unterschied sich allerdings in ihrem Volumen und der Partikelgröße, wodurch ein größeres Probenvolumen appliziert werden konnte. Die Gesamtlaufzeit wurde von 40 min auf 75 min erhöht und die Steigung des Gradienten in diesem Bereich halbiert. Die Isolation der Peptide erfolgte, nach dem Durchlauf durch die Chromatographiesäule, über die Fraktionierung mit einem Fraktionensammler. Dieser wurde über die Zeit gesteuert und erzeugte pro Minute eine Fraktion. Da sich viele Peptidpeaks im Chromatogramm überlagern und einzelne Peaks mit einem einzigen FPLC-Durchlauf nicht isolieren ließen, war es vorteilhaft zunächst den Gradienten und somit die Auftrennung zu optimieren. Die Entwicklung begann in der RP-HPLC und sollte im späteren Verlauf auf die FPLC übertragen werden. Ziel war es, die Vielzahl an Peptiden innerhalb einer gesammelten Fraktion minimal zu halten.

4.2.1 Entwicklung der Peptidseparation des Lupinenhydrolysats an der RP-HPLC

Zur Vergleichbarkeit der Chromatogramme wurde der Durchbruchpunkt bei allen Messungen auf 12 min gesetzt. Die Auswirkungen unterschiedlicher Temperaturen wurde in Abbildung 28 untersucht. Es war eine deutliche Verbesserung der Trennung bei 50°C gegenüber 30 °C erkennbar. Der Unterschied zwischen 40°C und 50°C war wesentlich geringer, allerdings war die Anzahl der Peaks bei einer Retentionszeit zwischen 15 - 25 min leicht erhöht und die Peakbreite etwas verringert.

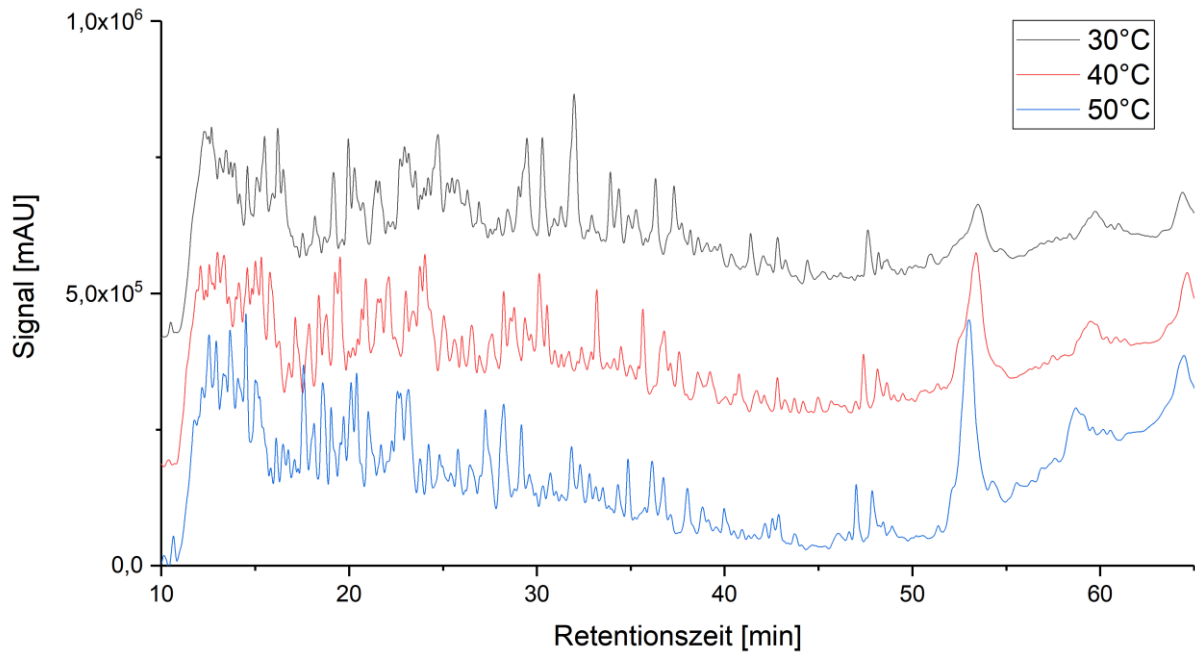


Abbildung 28: Optimierung der Temperatur (RP-HPLC). Diese Stellgröße beeinflusste den Massentransport durch Änderung der Viskosität. Die Peaks erschienen bei höheren Temperaturen stärker differenziert.

Beachtlich war dabei, dass sich die Longitudinaldiffusion zwar verstärkt (negativer, Peakverbreiternder Effekt), der beschleunigte Massentransport die Trennung bei hohen Geschwindigkeiten aber günstig beeinflusste (positiver Effekt). Zusätzlich ließ eine erhöhte Temperatur den C-Term flacher werden. Mit größerer Lineargeschwindigkeit stieg die zusätzliche Bandenverbreiterung folglich weniger stark an. Es konnte in diesem Fall eine Verbesserung der Trennleistung bei 50 °C beobachtet werden. Wie bereits beschrieben, sollte daher nach der Temperaturoptimierung im Anschluss die Flussrate angepasst werden.

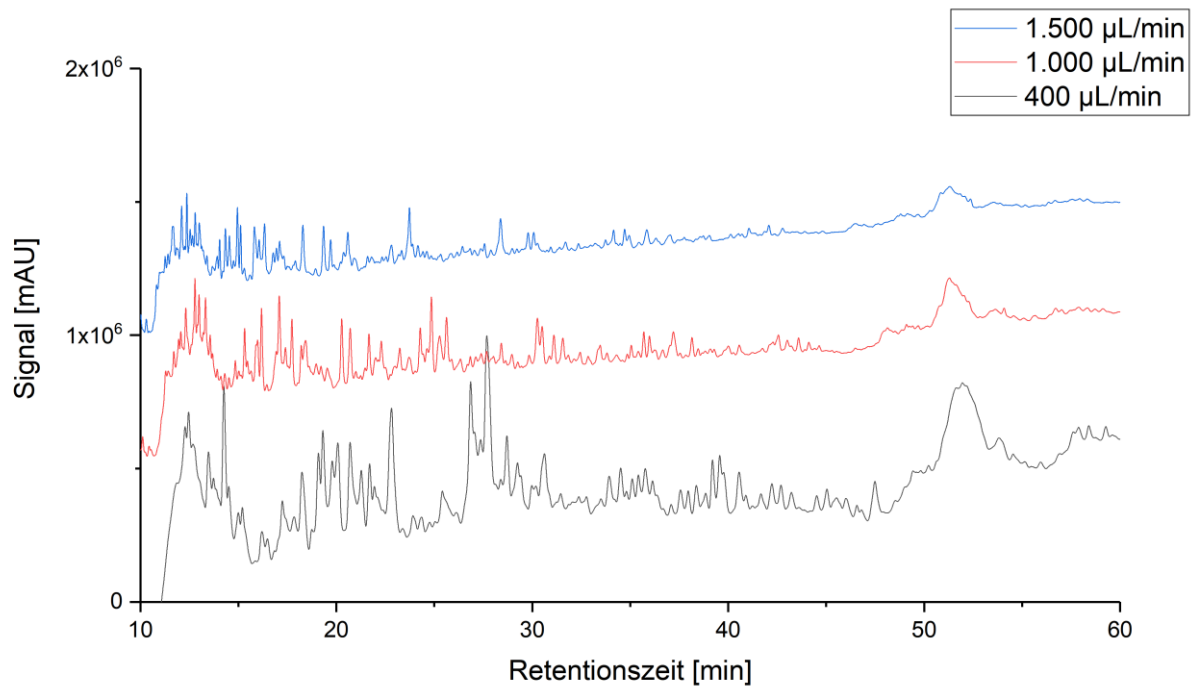


Abbildung 29: Optimierung der Flussrate (RP-HPLC). Durch Erhöhung des Volumenstroms wurden die Peaks schärfer, allerdings wurden die Intensitäten vermindert und die Auflösung herabgesetzt. Geringe Flussraten erhöhen die Interaktion des Analyten mit der stationären Phase.

Hier zeigte sich bei einer Änderung der Flussrate ein für das Upscaling negativer Effekt. Zwar verringerte sich die Peakbreite, was für eine verbesserte Selektivität sprach, da die Rückvermischung und Diffusion einen geringeren Einfluss nimmt, allerdings lag die Retentionszeit der einzelnen Peaks mit zunehmender Flussrate dichter beieinander, womit die Säuleneffizienz abnahm und eine spätere Peptidisolation über minutenweise Fraktionierung erschwert werden würde (siehe Abbildung 29). Daher sollte die Separation der Peptide bei geringeren Flussraten von 400 µL/min durchgeführt werden. Die Feinabstimmung der Flussrate und Temperatur erfolgte unter Zugabe von Peptidstandards („spiken“), um die Vergleichbarkeit der Chromatogramme gewährleisten zu können. Die gesammelten Ergebnisse wurden in der Methodik kombiniert. Aus diesem Grund wurden die Temperaturen 40°C und 50°C und die Flussraten 400 und 500 µl/min verwendet. Der Vergleich dieser Versuche ist in Abbildung 30 dargestellt. Auch bei diesem Versuch zeigte sich, dass sich durch eine Erhöhung der Flussrate auf 500 µl/min zwar eine geringfügige Verbesserung der Selektivität erreichen lässt, diese jedoch mit einer Verschlechterung der Effizienz für spätere Separationen einherging. Die Temperatur von 50°C generierte bereits in den vorherigen Versuchen gute Ergebnisse und zeigte, im Gegensatz zur Temperatur von 40°C, eine minimale Verbesserung der Auflösung des Chromatogramms. Da der erhaltene Vorteil in der

Auflösung durch das Separationsproblem begleitet wurde, entschied man sich als Kompromiss für eine Flussrate von 400 $\mu\text{L}/\text{min}$ und einer Temperatur von 50°C.

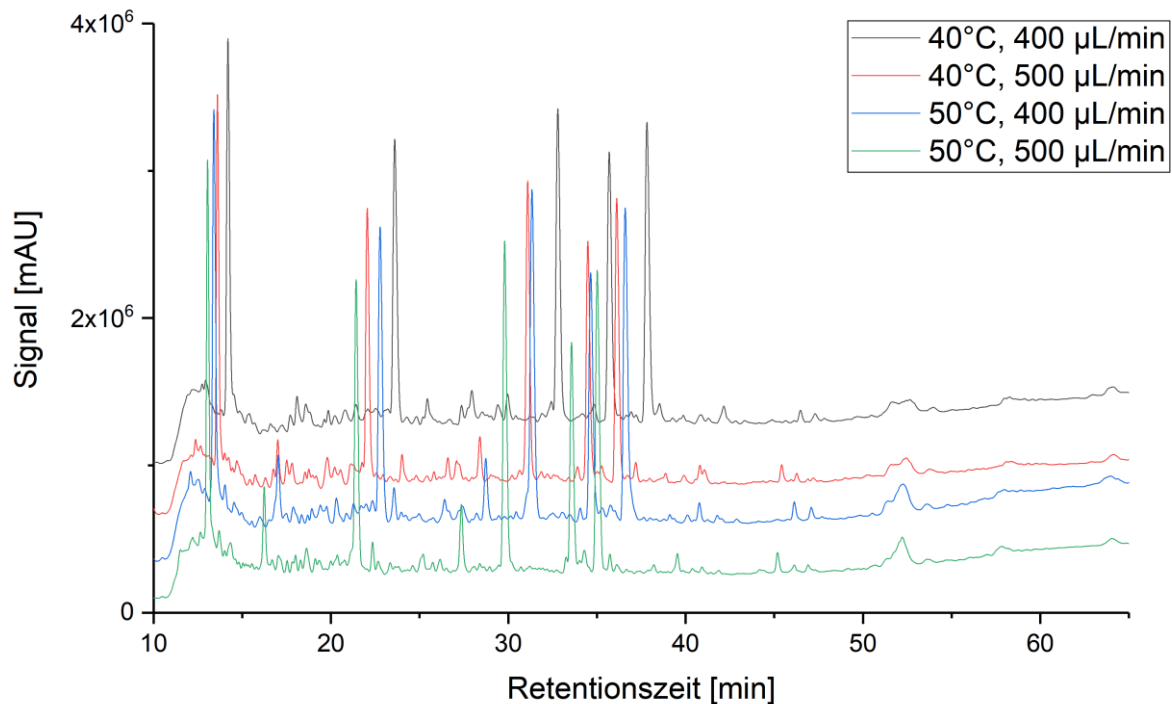


Abbildung 30: Optimierung der Flussrate bei verschiedenen Temperaturen für das Lupinenproteinhydrolysat (RP-HPLC). Die Auftrennung des Peptidgemisches war bei geringer Flussrate und hoher Temperatur ideal für die weiterführenden Prozessschritte.

4.2.2 Upscaling auf die präparative RP-FPLC

Die Entwicklung und Optimierung einer chromatographischen Methode an der analytischen RP-HPLC mit anschließender Übertragung auf die präparative FPLC ist ein gängiges Verfahren in pharmazeutischen Anwendungen. Die direkte Übertragung einer entwickelten RP-HPLC-Methode stellt kein triviales Unterfangen dar. Im Idealfall können die neuen Parameter für Probenmenge und Flussrate bei gleichen technischen Gegebenheiten und einer identischen Säule direkt berechnet werden. Allerdings wurde hier im analytischen Maßstab eine geringere Partikelgröße verwendet, was die Auflösung stark beeinflusst. Der Chromatographiesäulenhersteller Phenomenex® lieferte ein passendes Tool für die Übertragung der Chromatogramme. Die relevanten Werte sind in Tabelle 6 zu finden.

Tabelle 6: Kalkulierte und praktische Scale-Up Werte

Säule	Kalkuliert		Praktisch	
	Analytisch	Präparativ	Analytisch	Präparativ
Partikelgröße (μm)	5	5	3,6	5
Länge (mm)	250	250	250	250
Durchmesser (mm)	4,6	21,2	4,6	21,2
Säulenvolumen (mL)	4,2	88,2	4,2	88,2
Skalierungsfaktor	-	21,2	-	-
Flussrate (mL/min)	0,4	8,5	0,4	6
Injektionsvolumen (μL)	10	212	10	1.000

Der größte Unterschied ergab sich jedoch aus verschiedenen technischen Limitierungen des Folgeprozesses. Der äußere Rahmen des Upscalings wurde dabei von der verwendeten FPLC-Anlage und der späteren Lyophilisation vorgegeben. Bei der Entwicklung eines geeigneten Gradienten in der RP-HPLC versucht man möglichst kurze Laufzeiten mit hoher Auflösung zu erzielen. Dies kann mit hohen Partikeldichten und hohen Flussraten (über 1 mL/min) und somit hohen Drücken erreicht werden. Im Vergleich zur RP-HPLC wird bei der FPLC mit wesentlich geringeren Drücken gearbeitet. Das FPLC System ÄKTA Pure 25 (GE LifeSciences) war für einen Maximaldruck von 20 MPa ausgelegt. Durch die Verwendung der präparativen Säule und der Verschraubungen des Systems sollte eine Flussrate von 10 mL/min nicht überschritten und niedrige Drücke bevorzugt werden. Der Fraktionensammler konnte 90 Fraktionen mit einem Gesamtvolumen von je 15 mL erzeugen. Für den Gradienten bedeutete dies, dass die Laufzeit von 90 min nicht überstiegen werden durfte. Um ausreichend hohe Peptidkonzentrationen zu erhalten, sollten zwei Durchläufe gepoolt (zusammengeführt) werden. Dies begrenzte die maximale Flussrate auf 7,5 mL/min. Die Probenhalter in der Lyophille zur Verdampfung des Flüssigkeitsanteils boten eine Kapazität für 40 Proben mit einem jeweiligen Volumen von 50 mL. Um eine möglichst hohe Peptidkonzentration zu ermöglichen, wurden die Fraktionen von insgesamt 4 FPLC Durchläufen zeitgleich lyophilisiert. Wurden zwei Durchläufe der FPLC zusammengeführt, kann bei einer Flussrate von 7,5 mL/min, ein Bereich von maximal 3 min im Chromatogramm gepoolt werden. Um möglichst wenige Fraktionen zu erhalten und im Anschluss bei positivem Screening ins Detail gehen zu können, wurde sich dazu entschlossen eine Flussrate von 6 mL/min zu verwenden. Dadurch konnte eine gepoolte Fraktion maximal 4 min des Chromatogramms abbilden und besaß ein Volumen von 48 mL. Für das

Injektionsvolumen wurde anstelle der berechneten 212 μL eine Menge von 1.000 μL appliziert, um eine hohe Ausbeute zu gewährleisten.

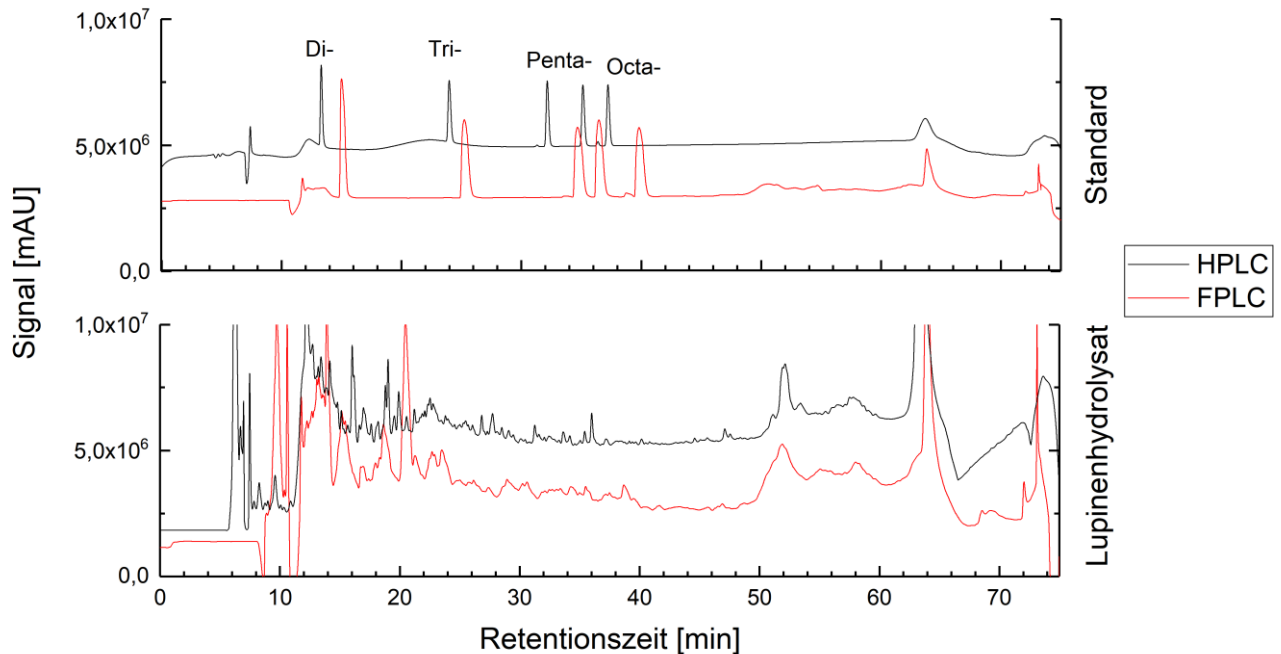


Abbildung 31: Vergleich der Chromatogramme nach dem Scale-Up. Durch technische Limitierungen wurden die Retentionszeiten in der FPLC leicht versetzt erreicht, die Auflösung wurde nahezu beibehalten, die Trennleistung der FPLC Säule ist verringert.

Wie bereits vermutet, war die Trennleistung der analytischen RP-HPLC-Säule im Vergleich zur präparativen FPLC-Säule höher. Die Peakbreite in der RP-HPLC war geringer, was durch die geringere Partikelgröße, die damit einhergehende Packdichte und die höhere Flussrate zu erklären war. Dennoch wurden in der FPLC Retentionszeiten des Standards erreicht, welche im Vergleich zur RP-HPLC nur um 2 min versetzt waren. Auch die Chromatogramme des Lupinenproteinhydrolysats wiesen Ähnlichkeiten auf (siehe Abbildung 31).

4.2.3 Entwicklung der Lyophilisation

Das Verfahren der Lyophilisation basiert auf dem Prinzip der Sublimation und hat zum Ziel, den Flüssigkeitsanteil der gewonnenen Fraktionen zu verringern. Die Proben werden dazu eingefroren und innerhalb eines Vakuumbehälters sublimiert. Durch Verringerung des Drucks wird der Siedepunkt des Wassers stark herabgesetzt, wodurch das Eis beim langsamen Auftauen direkt in die Gasphase übergeht. Die Peptide bleiben anschließend am Boden des Gefäßes zurück und können resuspendiert werden. Die Methode wird als sehr schonend angesehen, da die Peptide lediglich eingefroren werden und keinen denaturierenden Bedingungen oder destabilisierenden Chemikalien ausgesetzt sind.

Die Lyophilisation benötigte im Vergleich zur Peptidseparation nur geringen Entwicklungsaufwand, da der Prozess lediglich kontrolliert ablaufen sollte. Die Proben bestanden aus den Eluenten der Chromatographie, das heißt sie bestanden aus Wasser, Acetonitril und einem geringen Anteil TFA. Die Proben wurden dazu mindestens eine Stunde lang bei -80°C in Metallblöcken eingefroren. Anschließend wurden mit einer Lochstanze Löcher in die Deckel der Falcons gestochen, um das Entweichen der Dämpfe während der Gefriertrocknung zu ermöglichen. Die Lyophilie wurde in den Warm-Up Modus versetzt, bei dem sich die Stellflächen auf 30°C aufheizten. Anschließend wurden die Metallblöcke mit den gefrorenen Proben auf den Stellflächen platziert und der Trocknungsvorgang gestartet. Dafür wurde ein Programm entwickelt, welches sich nach der zu sublimierenden Probenmenge und dem Lösemittelanteil richtete (siehe Tabelle 7).

Tabelle 7: Lyophilisationsprogramm für Peptide

Abschnitt	Zeit (h:m)	Stellfläche ($^{\circ}\text{C}$)	Vakuum (mbar)
1	0:01	30	4,00
2	0:30	30	3,20
3	0:30	30	2,50
4	0:30	30	1,00
5	4:30	30	0,120
6	4:00	30	0,120
7	4:00	30	0,120
8	4:00	30	0,120
9	0:01	30	0,0010
10	30:00	30	0,0010

Um den Lösemittelanteil zunächst schonend zu verdampfen, wurde das Vakuum in den ersten Abschnitten langsam gesenkt. In diesem Fall besitzt das Acetonitril einen deutlich niedrigeren Siedepunkt als Wasser. Bei ca. 4 mbar setzte ein Verdampfen des Acetonitrils ein. Das Vakuum wurde ab diesem Punkt nur langsam verringert, da das Gerät beim Einstellen des Drucks leicht übersteuert. Die Nachrocknungsphase in Abschnitt 9 und 10 wurde so lange verlängert, bis der verbleibende wässrige Eisanteil vollständig verdampft war. Dieser Prozess hatte eine durchschnittliche Laufzeit von 55 h.

4.2.4 Fazit

Das vorrangige Ziel bei der Entwicklung des Aufreinigungsprozesses (Downstream Prozess) war, die Machbarkeit der Detektion von bioaktiven Peptiden aus kontinuierlich erzeugten Hydrolysaten zu demonstrieren. Der Maßstab des Downstream Prozesses im Projekt richtete sich daher nach der experimentellen Phase. Die chromatographische Auftrennung wurde speziell an die Gewinnung von Peptiden aus Lupinenproteinhydrolysat angepasst. Wie in 4.1.2 dargelegt, wäre auch eine Verwendung weiterer Proteinhydrolysate aus Soja, Erbse oder Mandel denkbar. Die bioaktiven Eigenschaften der Lupinenpeptide sind bisher jedoch wenig erforscht, daher wurden sie für das weitere Bioaktivitätsscreening bevorzugt. Der Herstellungsweg der Peptidisolate aus einem 5 g/L Proteinfeed, über die Immobilisation der Kapillare, gefolgt von der kontinuierlichen Hydrolyse der Proteine, über die Separation der Peptide, bis zum Abschluss der Lyophilisation, benötigte eine Gesamtzeit von 8 Tagen. Die mittlere Ausbeute betrug jeweils 130 µg Peptid bei 15 Fraktionen. Der Transfer der analytischen RP-HPLC-Methode in den präparativen FPLC-Maßstab war erfolgreich. Das Injektionsvolumen konnte um den Faktor 100 erhöht und somit die Ausbeute an isolierten Peptiden gesteigert werden. Die präparative Säule bot jedoch eine geringere Auflösung als die analytische Säule. Die Auftrennung der Peptide bzw. die Auflösung der Chromatographiesäule ist entscheidend für die spätere Identifikation des einzelnen bioaktiven Peptids. Der erste Aufreinigungsdurchlauf bestand aus 15 Fraktionen, die jeweils aus 4 Einzelfraktionen zusammengesetzt waren. Nach positivem Screening einer Fraktion sollten die jeweiligen Einzelfraktionen untersucht werden. Je weniger heterogene Peptide sich innerhalb dieser Einzelfraktionen befinden, umso leichter würde es, im späteren Screening den Peptiden bioaktive Eigenschaften zuzuweisen. Bei Proteinhydrolysaten kommt es zu Überlagerungen der Peptidpeaks, was bedeutet, dass

sich mehrere Peptide gleicher Länge bzw. ähnlicher Interaktion mit der festen Phase, innerhalb eines Peaks befinden. Abhilfe könnte hier eine weitere Fraktionierung mit einer Säule mit höherer Auflösung bzw. anderem Separationsprinzip schaffen.

Der Downstream Prozess von Proteinen bzw. APIs in der Industrie ist weiterhin ein entscheidender „Bottleneck“ bei Skalierungs-Prozessen. Wie sich in Kapitel 4.2.2 zeigte, sorgen vor allem technische Limitierungen im Prozess für schwer überwindbare Hürden oder wirken sich rückwirkend auf das gesamte Prozessdesign aus. Die verwendete Lyophilisation im Labormaßstab war mit 40 Proben ausgelastet. Im industriellen Maßstab lassen sich jedoch weitaus größere Volumina lyophilisieren. Um die Ausbeute zu erhöhen, könnte eine höhere Proteinkonzentration im Feed verwendet werden, allerdings würden die verwendeten Kapillaren schneller verblocken und somit die Ausbeute an Proteinhydrolysat sinken. Der entwickelte Prozess ließ sich somit erfolgreich für die Herstellung präparativer Probenmengen für den Einsatz von Bioscreeningverfahren etablieren.

4.3 Bioscreening der Lupinenproteinhydrolysatfraktionen

Der Hydrolysegrad des für das Bioscreening zu verwendenden Proteinhydrolysats, wurde vom aktuellen wissenschaftlichen Stand der BAP-Forschung abhängig gemacht. Bioaktive Eigenschaften werden überwiegend bei kurzkettigen Peptiden nachgewiesen (siehe Tabelle 1 und Tabelle 2). Demnach ist ein Großteil der bisher bekannten bioaktiven Peptide kürzer als 20 AS. Wie in Kapitel 4.1.2 verdeutlicht, wiesen die bei einer niedrigen Flussrate erzeugten Hydrolysate den höchsten Grad der Hydrolyse auf. Ein Großteil der Peptidpeaks im Lupinenproteinhydrolysat befand sich im Bereich der Tripeptide, daher wurde eine niedrige Flussrate zur Erzeugung des Hydrolysats bevorzugt. Da nicht vorherzusagen war, in welcher Fraktion BAPs auftreten, war es notwendig die Elutionsmethoden im Laufe des Screeningverfahrens anzupassen. Dadurch wurde zum einen der Fraktionsbereich mit der detektierten Bioaktivität weiter eingegrenzt und zum anderen die Selektivität bei der Isolation der Peptide weiter erhöht.

Die Proteinlösung wurde anhand der Methode in Kapitel 4.1.2 hergestellt und anschließend im Kühlschrank bei 8°C gelagert. Vor jeder Verwendung wurde sie erneut durch einen 0,22 µm PES-Filter filtriert, um möglicherweise mit der Zeit gebildete Proteinaggregate zu entfernen. Die kontinuierliche Hydrolyse wurde bei einer Flussrate

von 11 $\mu\text{L}/\text{min}$ und einer Temperatur von 37°C durchgeführt. Das Hydrolysat wurde auf Eis gesammelt und mit Proteaseinhibitor (0,12 g/L) versetzt. Die Peptidisolation an der FPLC erfolgte nach der in 4.2 entwickelten Methode, mit einem Injektionsvolumen von 1 mL. Das anschließende Pooling der Fraktionen aus dem Fraktionensammler wurde nach dem Schema in Tabelle 10 (siehe Anhang) durchgeführt und erstreckt sich über das gesamte Chromatogramm. Dabei wurde versucht die Peaks bei ihren Intensitätsminima voneinander zu trennen. Der Peak bei Minute 58 wurde nicht in das Bioscreening aufgenommen, da durch den sprunghaften Anstieg des Gradienten Ungleichgewichte in der mobilen Phase auftraten und es sich erfahrungsgemäß um eine Interferenz des Lösemittels handelt (siehe Abbildung 32).

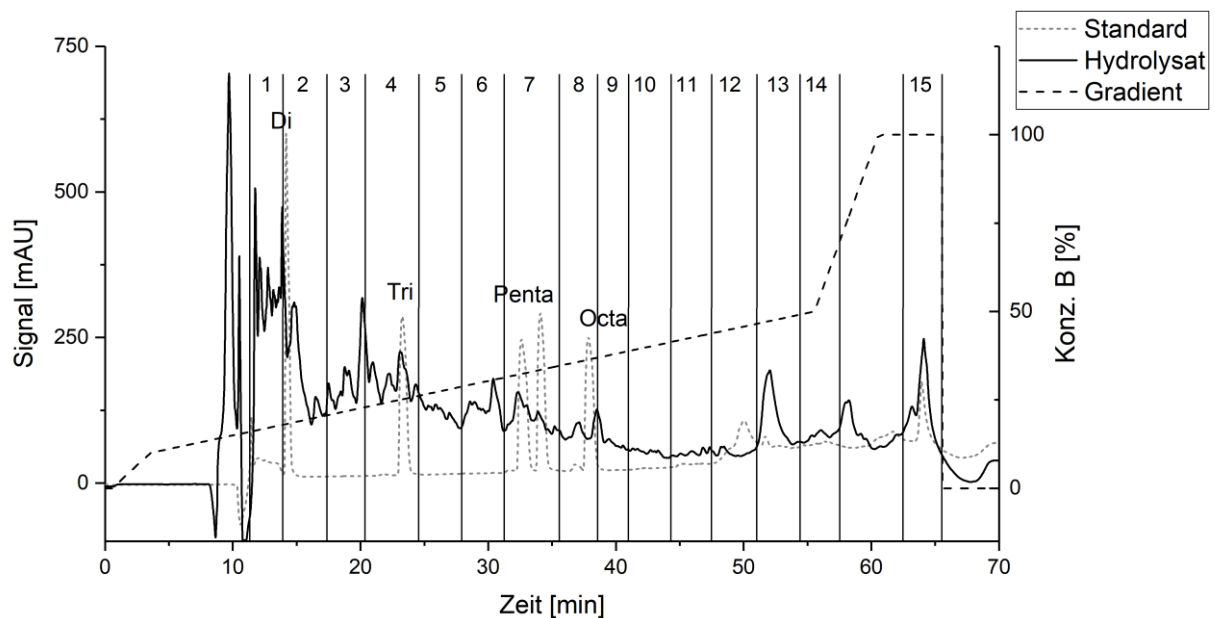


Abbildung 32: Fraktionierung 1 des Lupinenproteinhydrolysats (FPLC). Das Gesamthydrolysat konnte in 15 Fraktionen unterteilt werden.

Im Verlauf des Bioscreenings zeigten sich wie erwartet diverse Bioaktivitäten im Bereich der kurzkettigen Peptide. Der Gradient und die Methode wurden daraufhin angepasst. Der Gradient wurde in der Steigung halbiert und die Elutionsphase entsprechend verdoppelt. Dadurch kam es zur Erhöhung der Retentionszeiten einzelner Peptide und einer Verbesserung der Selektivität der Säule. Das Fraktionsmaximum von 90 Einzelfraktionen endete damit hinter dem Bereich der Octapeptide bei Minute 90. Die Anzahl der gepoolten Fraktionen im Bereich der Di- und Tripeptide konnte somit von 5 auf 15 Fraktionen gesteigert werden (siehe

Abbildung 33), wodurch sich Bioaktivitäten leichter einzelnen Peptiden zuordnen lassen sollten.

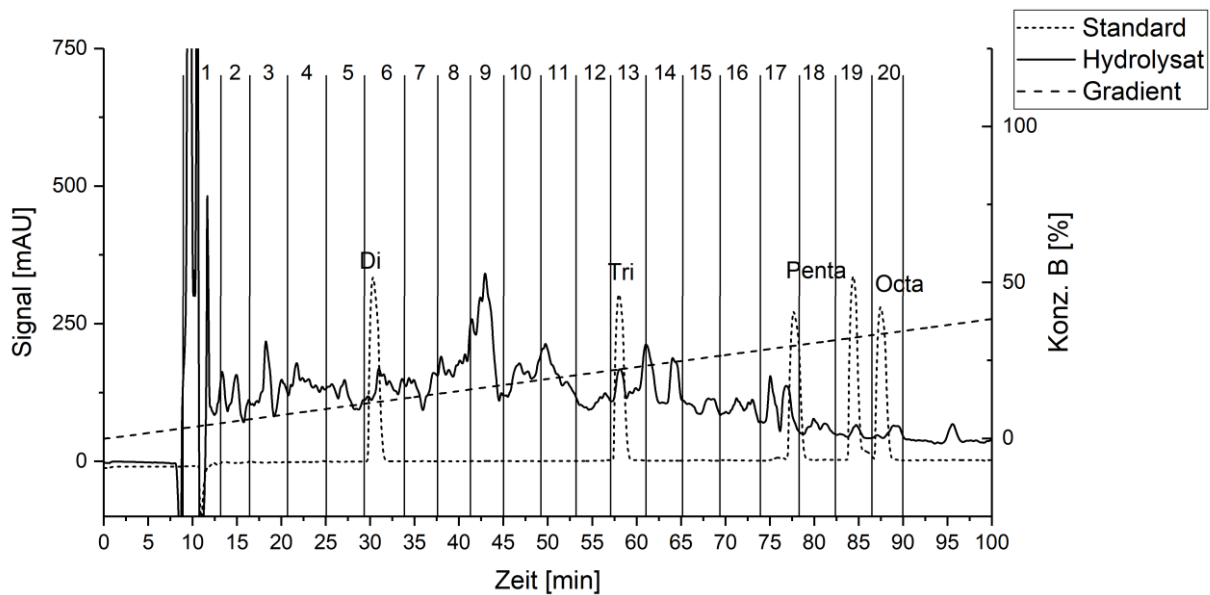


Abbildung 33: Fraktionierung 2 des Lupinenproteinhydrolysats (FPLC). Mit Fokus auf die kurzkettigen Peptide wurde die Auflösung der FPLC Säule erhöht und das Hydrolysat in 20 Fraktionen unterteilt.

Die Fraktionen wurden im Anschluss lyophilisiert und für die Bioaktivitätstests vorbereitet. Die Resuspension der Peptide erfolgte in 200 μL Puffer. Die Ausbeute an Peptiden wurde über den BCA-Assay bestimmt und die Peptidkonzentration auf 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ normiert.

4.3.1 Untersuchung der antioxidativen Kapazität

Der ORAC-Assay bestimmt, wie in Kapitel 3.1.5 beschrieben, die antioxidative Kapazität einer Substanz. Dazu wird die Sauerstoffradikal-induzierte Oxidation des fluoreszierenden Farbstoffs Fluorescein gemessen. Über den zeitlichen Verlauf nimmt die Fluoreszenz der Probe ab, welches sich grafisch mit einer invertierten sigmoidalen Kurve beschreiben lässt. Die Fläche unterhalb der Kurve liefert den Wert zur Bestimmung der antioxidativen Kapazität. Der Wert des Vitamin E Derivats Trolox bei 1 mM fungiert als Referenz zur Bestimmung einer unbekanntenen Probe. Daher werden die Messwerte in TE (Trolox Equivalents)/g Trockenmasse angegeben. Die zu analysierenden Proben wurden mit einem Referenzwert von 1 mM Trolox ins Verhältnis gesetzt.

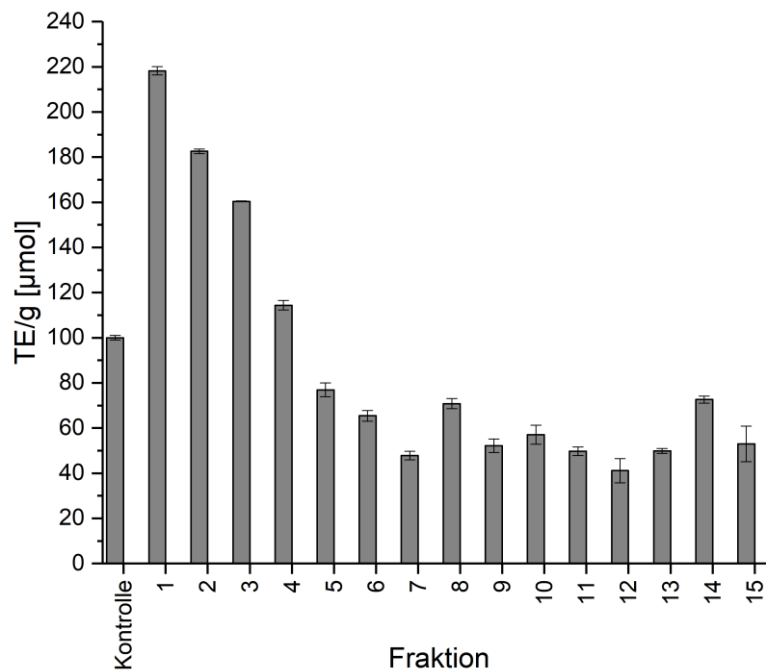


Abbildung 34: Antioxidative Kapazität des Lupinenproteinhydrolysats Fraktionierung 1. Antioxidatives Potential oberhalb der Standardwerte fand sich überwiegend bei den Dipeptiden.

Die ORAC-Messung der Lupinenhydrolysatfraktionen zeigte, dass vor allem die Fraktionen 1, 2 und 3 im Größenbereich der Dipeptide eine erhöhte antioxidative Kapazität aufwiesen. Diese überstieg den Wert der Trolox-Referenz um mehr als das Doppelte. Auffällig ist, dass ein Abfangen der Sauerstoffradikale in allen Fraktionen zu messen war. Demnach besaßen alle Peptide eine, wenn auch schwache, antioxidative Kapazität mit einem Wert von durchschnittlich 60 µmol TE/g. Bei Resuspension der Fraktionen war ausschließlich bei Fraktion 1 eine erhöhte Gelbfärbung der Peptidlösung zu beobachten, was darauf schließen ließ, dass farbgebende Substanzen neben den Peptiden in der Probe enthalten sein mussten. Die Fraktion lieferte den höchsten gemessenen ORAC-Wert von 220 µmol TE/g. Wie bereits in Kapitel 3.1.5 erwähnt, können Pflanzenfarbstoffe ebenfalls bioaktive Eigenschaften besitzen. Hier sind vor allem die zu den Polyphenolen zählenden Flavonoide zu nennen (siehe Abbildung 34). Die weitere Auftrennung der Peptide nach Fraktionierung 2 (siehe Abbildung 33) zeigte zwei auftretende ORAC-Maxima oberhalb des Trolox-Referenzwertes. Zum einen war hier die Fraktion 5 im Größenbereich der Dipeptide zu nennen, welche einen ORAC-Wert von 130 µmol TE/g aufwies. Zum anderen waren die Fraktionen 11 und 12 zu nennen, welche beide bei 120 µmol TE/g lagen und eher im Größenbereich der Tripeptide zu finden waren (siehe Abbildung 35). Insgesamt gab es

zwischen den gemessenen Fraktionen stärkere Schwankungen, was auf unterschiedliche bioaktive Peptide hindeutete.

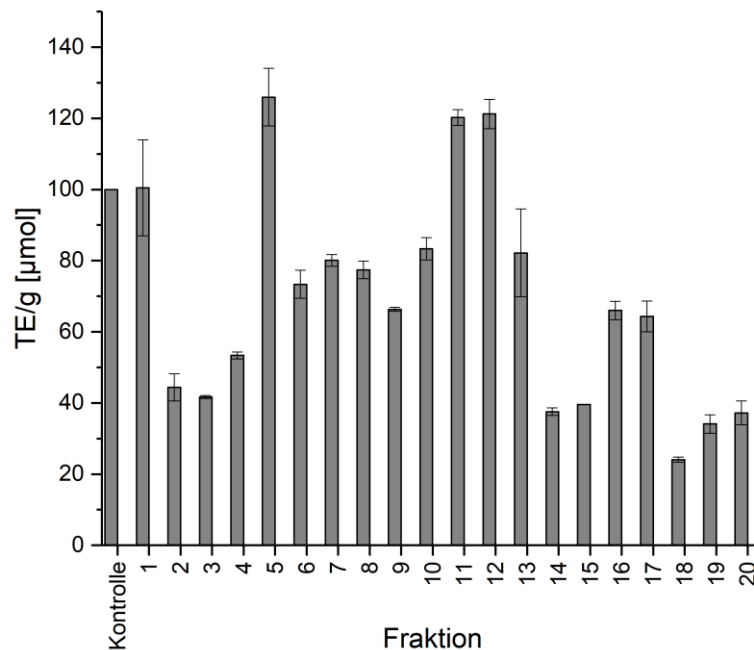


Abbildung 35: Antioxidative Kapazität des Lupinenproteinhydrolysats Fraktionierung 2. Durch Änderung der Auflösung, konnte die antioxidative Aktivität in Fraktionen der Di- und Tripeptide festgestellt werden.

Für die folgenden ORAC-Messungen wurden jeweils nur die Peptide aus den Einzelfraktionen untersucht, um die Vielfalt an unterschiedlichen Peptiden und dem untersuchenden Bereich weiter einzugrenzen. Es wurden die Einzelfraktionen aus den Fraktionen 5, 10, 11 und 12 verwendet. Um die Peptidausbeute zu erhöhen, wurden die Fraktionen von vier FPLC Durchläufen zusammengeführt. Die Fraktionen 5(1), 10(4) und 11(1) zeigten dabei eine erhöhte antioxidative Kapazität.

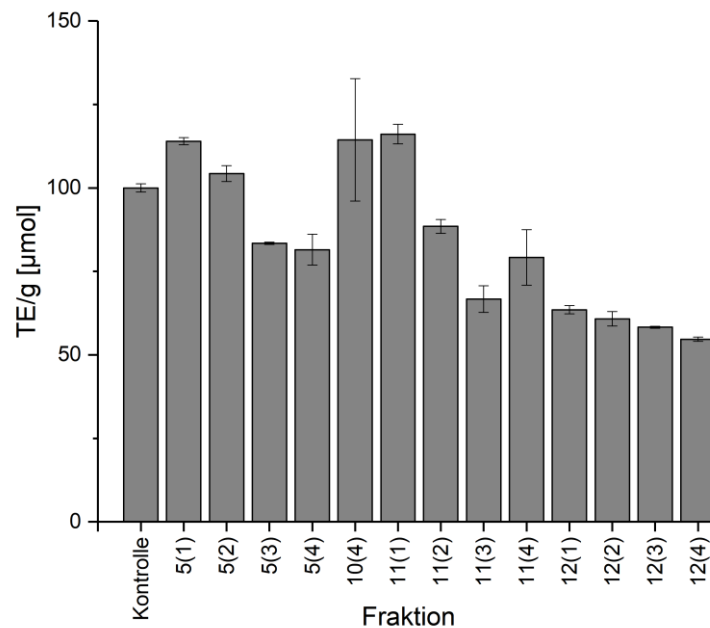


Abbildung 36: Antioxidative Kapazität des Lupinenproteinhydrolysats nach Feinfraktionierung. Die positiven Fraktionen wurden gezielt in Einzelfraktionen unterteilt und analysiert. Drei Fraktionen konnten für weitergehende Analysen identifiziert werden.

Diese unterschieden sich vom Trolox-Referenzwert jedoch nur geringfügig und lagen durchschnittlich bei 120 µmol TE/g. Sie stellten unter den gemessenen Fraktionen die höchsten Werte dar. In den Einzelfraktionen der Fraktion 12 konnte keine signifikante antioxidative Kapazität festgestellt werden. Hier lagen die ORAC-Werte bei durchschnittlich 60 µmol TE/g (siehe Abbildung 36).

4.3.2 Untersuchung der antihypertensiven Eigenschaften

Die antihypertensive Eigenschaft einer Substanz kann mit der Inhibition des ACE im ACE-Assay bestimmt werden (siehe 3.1.6). Als Substrat für das ACE wird N-Hippuryl-L-histidyl-L-leucin (HHL) verwendet, welches zu Hippursäure gespalten werden kann. Durch Kalibration mit dem blutdrucksenkenden Peptid Captopril kann den unbekanntes Proben eine antihypertensive Aktivität zugeordnet und die Hemmung quantifiziert werden.

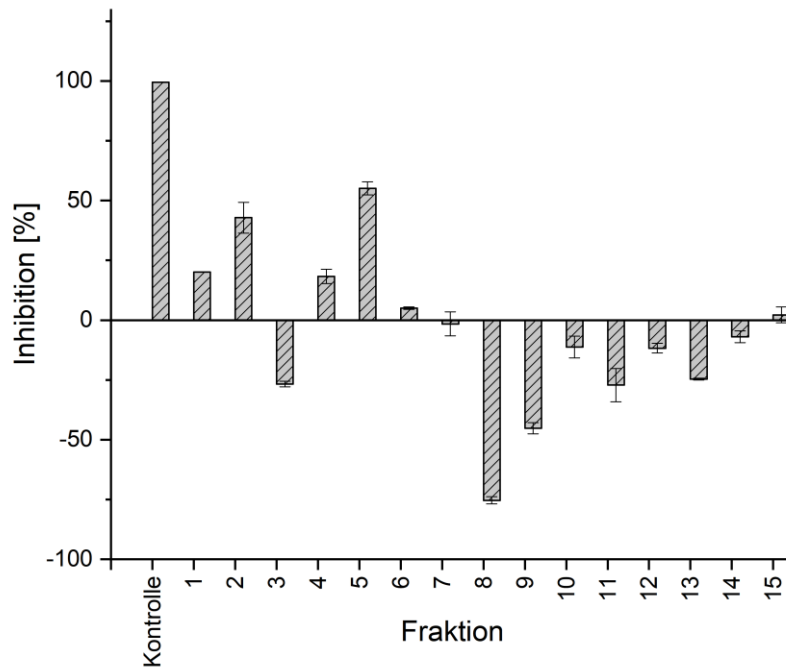


Abbildung 37: Antihypertensive Eigenschaften des Lupinenproteinhydrolysats Fraktionierung 1. Eine ACE-Inhibition konnte in 4 Fraktionen im Bereich der kurzkettigen Peptide festgestellt werden.

Ähnlich der antioxidativen Kapazität wurden antihypertensive Aktivitäten im Größenbereich der Di- und Tripeptide gemessen. Hier betrug die Inhibition des ACEs ungefähr 50 % und wurde in den Fraktionen 2 und 5 nachgewiesen. Die Fraktion 1 und 4 wiesen eine leichte Inhibition auf (siehe Abbildung 37). Allerdings könnte es sich um Peptide aus den Überlagerungen der Peaks handeln, welche eine leichte Aktivität verursachten. Für die verbliebenen Fraktionen wurde eine negative Aktivität gemessen, was auf unterschiedliche Weise zu erklären ist. Die Messwerte der unbekanntenen Proben wurden mit dem Messwert des ungehemmten ACE normalisiert. Daher besteht ein Erklärungsansatz darin, dass entweder die Enzymaktivität zur Spaltung des HHL-Komplexes beschleunigt oder die Spaltung selbst durch eine Substanz in der Fraktion induziert wird.

Zur weiteren Auftrennung des Lupinenproteinhydrolysats wurde die Fraktionierung 2 verwendet (siehe Abbildung 33). Die detektierten antihypertensiven Aktivitäten aus der ersten Fraktionierung wurden in den Fraktionen 10 und 16 mit einer Inhibition von 40% und 50% wiedergefunden. Die Fraktionen 12, 13, 18 und 20 wiesen ebenfalls eine erhöhte Inhibierung von durchschnittlich 25% auf (siehe Abbildung 38). Die Standardabweichungen waren allerdings insgesamt sehr hoch, wodurch die Messwerte

eine erhöhte Ungenauigkeit besaßen und nur Probe 12 zusätzlich in der Feinfraktionierung weiter untersucht wurde.

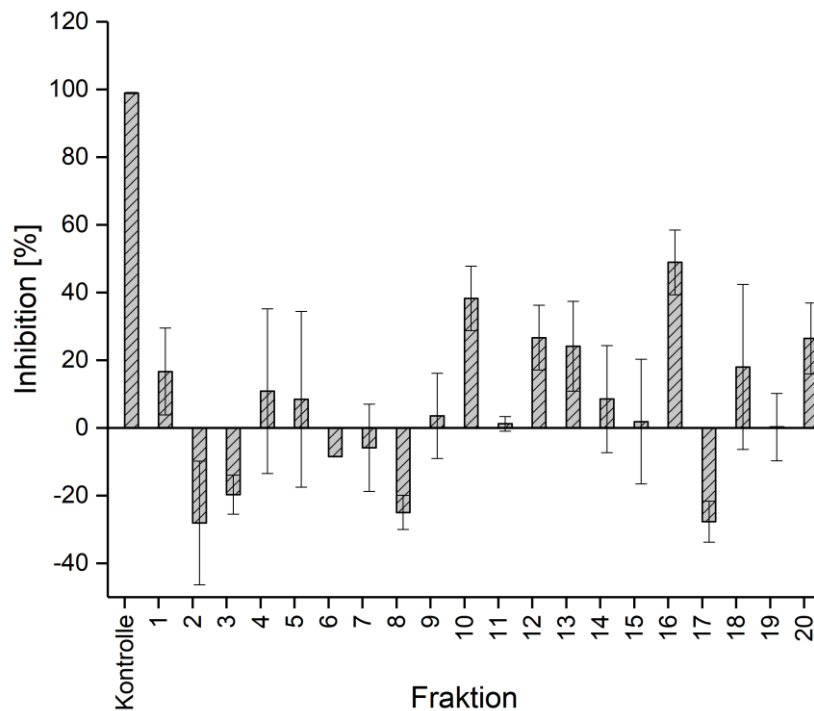


Abbildung 38: Antihypertensive Eigenschaften des Lupinenproteinhydrolysats Fraktionierung 2. Mehrere Fraktionen wiesen eine ACE-Inhibition auf, diese lag durchschnittlich zwischen 25% und 50%.

In der Feinfraktionierung konnten die gemessenen antihypertensiven Eigenschaften nur in Fraktion 10 wiedergefunden werden. Dabei hatte die Fraktion 10(1) die höchste Inhibierung des ACEs, diese lag bei 33%. Die Fraktionen 10(2) und 10(3) wiesen eine Inhibierung von 27% und 10% auf. Die restlichen Fraktionen zeigten einen negativen Wert. Die ursprüngliche ACE-Inhibition der Fraktion 16 aus der Fraktionierung 2 mit über 50% konnte nicht wiedergefunden werden (siehe Abbildung 39).

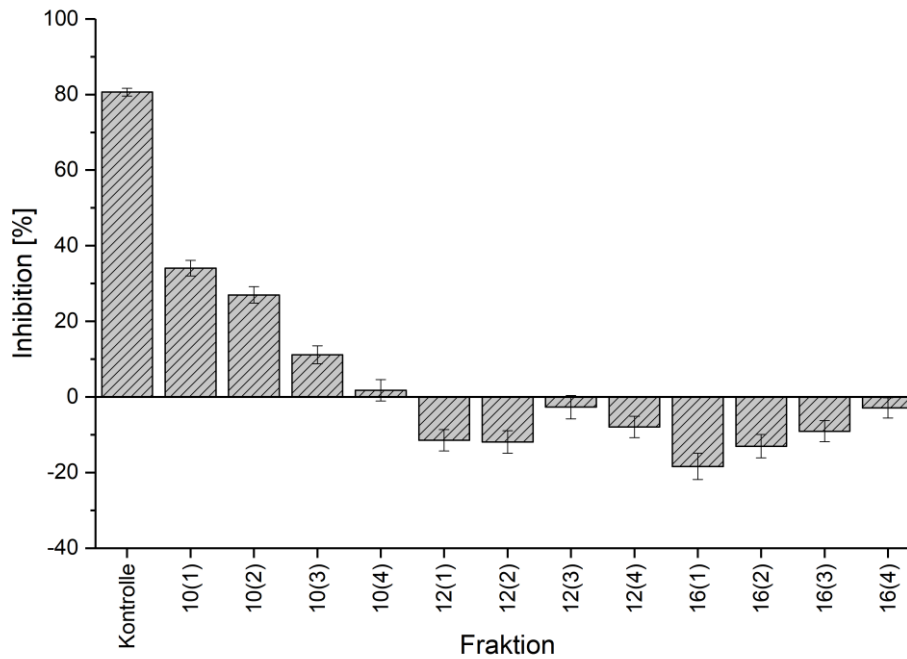


Abbildung 39: Antihypertensive Eigenschaften des Lupinenproteinhydrolysats Feinfraktionierung. Zwei Einzelfractionen der Fraktion 10 wiesen eine ACE-Inhibition von 30% auf.

4.3.3 Untersuchung der antimikrobiellen Eigenschaften

Antimikrobielle Peptide wirken wie in 3.1.7 beschrieben gegen Bakterien. Bei der Entwicklung geeigneter Nachweismethoden ist es daher sinnvoll das mikrobielle Wachstum zu beobachten. Da Gram-positive und Gram-negative Bakterien unterschiedlich auf AMPs reagieren, galt es beide Typen zu untersuchen. Als Gram-negatives Bakterium wurde *E. coli* und als Gram-positives Bakterium *B. subtilis* ausgewählt. Beide Bakterienstämme wurden zuvor durch Gramfärbung auf mögliche Kontaminationen getestet (siehe Anhang). Es haben sich verschiedene Ansätze zur Erforschung von AMPs in der Wissenschaft etabliert. Aus der Antibiotikaforschung ist unter anderem der Plattendiffusionstest bekannt, bei dem mit Mikroorganismen beimpfte Agarplatten inkubiert werden. Die zu untersuchende Substanz wird dabei an einer definierten Stelle aufgebracht. Hier werden zwei verschiedene Varianten diese Tests untersucht, zum einen die Verwendung von Stanzungen in den Agar-Platten und zum anderen die Verwendung von runden Filterpapieren. Beide werden mit der Probenlösung beträufelt. Nach der Inkubation sind, bei positiver Wachstumsinhibierung, Hemmhöfe auf der Platte zu erkennen. Daher wird dieses Verfahren auch als Hemmhöfetest bezeichnet.

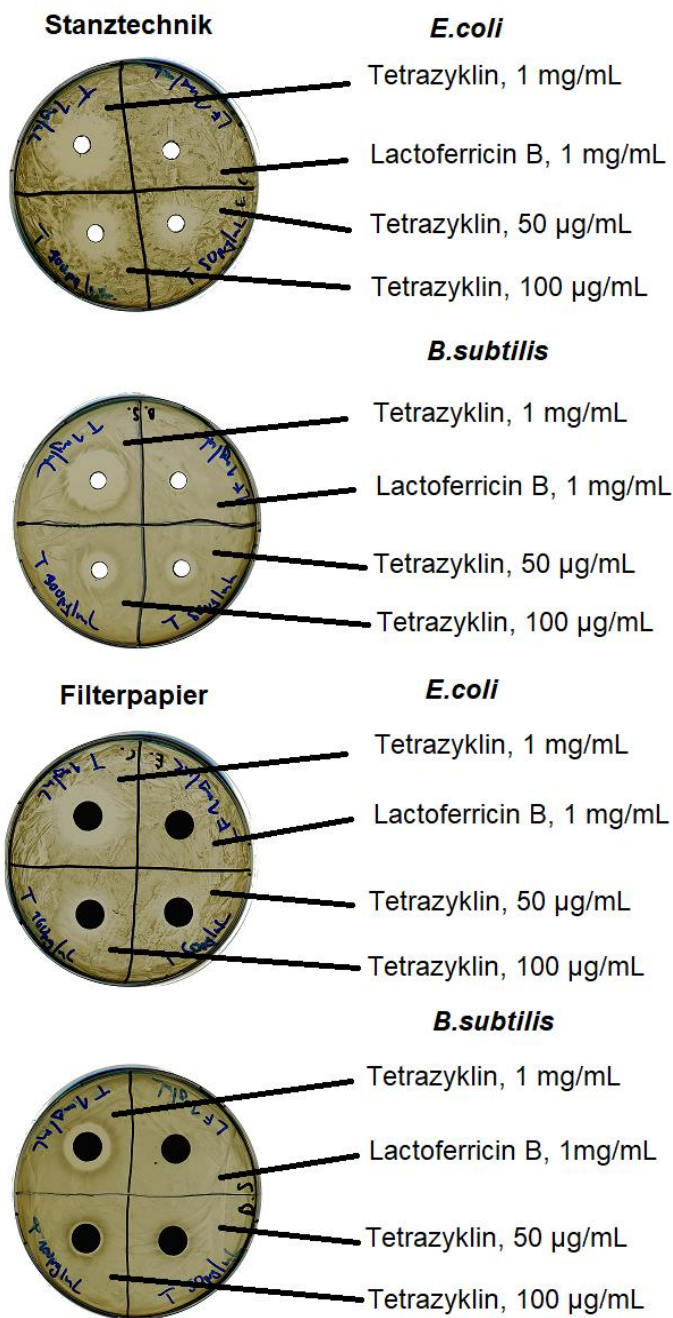


Abbildung 40: Hemmhofstest bei *E. coli* und *B. subtilis*. Zwei verschiedene Techniken wurden untersucht. Es wurde ein Antibiotikum und ein antimikrobielles Peptid als Referenz verwendet.

Die Auswertung der Hemmhöfe ergab, dass zwischen den beiden Varianten nur geringe Unterschiede in der Ausbildung der Hemmhöfe bestanden. Demnach waren sowohl das Stanz- als auch das Filterpapierverfahren für den Nachweis antimikrobieller Eigenschaften verwendbar. Die Hemmhöfe der 50 µg/mL Tetrazyklin-Probe waren bei der Stanztechnik jedoch eindeutiger zu erkennen (siehe Abbildung 40). Sie schien daher bei geringen Konzentrationen etwas sensitiver. Die Lactoferricin B Probe erzeugte keinen

Als geeignetes Referenzpeptid wurde Lactoferricin B verwendet. Es ist ein bekanntes AMP aus dem Spaltprodukt des Lactoferrins und stammt aus der Kuhmilch. Vorteilhaft ist, dass es eines der wenigen in größeren Mengen erhältlichen AMPs ist. Des Weiteren wurde ein Standardantibiotikum wie Tetrazyklin eingesetzt, da es eine hohe antimikrobielle Aktivität besitzt und sogar bei geringen Konzentrationen zuverlässig wirkt. Die Agarplatten wurden mit 3 mL aus der exponentiellen Phase einer Vorkultur benetzt und das überschüssige Inokulum entfernt. Beide oben genannten Verfahren wurden angewandt und als Probenlösung 50 µL aufgetragen. Für das Tetrazyklin wurden die Konzentrationen 50, 100 und 1.000 µg/mL verwendet. Für das Lactoferricin wurde eine Konzentration von 1.000 µg/mL verwendet. Die Agarplatten wurden 24 h bei 37°C inkubiert.

sichtbaren Hemmhof auf den Agarplatten, obwohl bekannt ist, dass Lactoferricin B sowohl Gram-positive als auch Gram-negative Bakterien im Wachstum hemmt [125]. Höhere Konzentrationen zu verwenden stellte bei Lactoferricin B kein Problem dar, allerdings waren die geringen Ausbeuten aus den Fraktionen des Lupinenproteinhydrolysats zu berücksichtigen. Hier waren Konzentrationen höher als 1 mg/mL und einer für die Tests ausreichenden Menge, nur unter hohem technischem Aufwand möglich. Für den Nachweis antimikrobieller Peptide aus dem Lupinenproteinhydrolysat war aus den oben genannten Gründen ein Nachweisverfahren mit höherer Sensitivität bei peptidbasierten Wirkstoffen nötig.

Als alternativer AMP-Test wurde eine Abwandlung des Microbroth-Verdünnungsassays auf seine Eignung untersucht. Bei der Methode werden Bakterien in Kleinstvolumen kultiviert und das Wachstum durch Messung der optischen Dichte überwacht. Bei positiven antimikrobiellen Eigenschaften, sollte eine Verringerung bzw. Verzögerung des mikrobiellen Wachstums festzustellen sein. Die Inkubation erfolgte in 96-well-Platten innerhalb eines Mikroplatten-Spektrophotometers. Dadurch konnte in regelmäßigen Abständen die OD überwacht werden. Für den Test waren Vorkulturen von *E. coli* und *B. subtilis* notwendig. Da beide Bakterien unterschiedliche Lag-Phasen aufwiesen, wurden sie bis zur exponentiellen Phase vorkultiviert. Das Wachstum innerhalb der Wells sollte möglichst gleichmäßig, ohne Verzögerung geschehen. Als Medium wurde ein Minimalmedium verwendet. Auf diese Weise konnten Peptidquellen, wie sie in anderen Medien enthalten sind, minimiert und als möglichen Einflussfaktor ausgeschlossen werden. Durch die Sauerstofflimitierung, den geringen Sauerstoffeintrag und der begrenzt sterilen Umgebung in den Wells, ist das Wachstum von Bakterienkulturen nur mit Einschränkungen möglich. Die Inkubationszeit sollte aus diesem Grund nur wenige Stunden betragen.

Für die Durchführung des Microbroth-Verdünnungsassays wurden *E. coli* und *B. subtilis* zunächst bis zur exponentiellen Phase in einer Vorkultur kultiviert. Der Ansatz in den Wells bestand aus 20 µL Probe und 100 µL M9-Minimalmedium. Angeimpft wurde mit 20 µL der Vorkultur. Zur Kontrolle wurden Lactoferricin B (200 µg/mL), Pepton (200 µg/mL) und Tris Puffer verwendet. Die Konzentration der Peptidproben betrug ebenfalls 200 µg/mL. Die relative Absorption der Bakterien wurde mit einem Mikroplatten-Spektrophotometer bei einer Wellenlänge von 600 nm und einem Intervall von 10 min gemessen. Die Platte wurde dabei fortlaufend geschüttelt und bei 37°C für 170 min inkubiert. Nach der Messung wurden die Startwerte normiert, um mögliche Abweichungen in der anfänglichen Zelldichte nach dem Beimpfen auszugleichen.

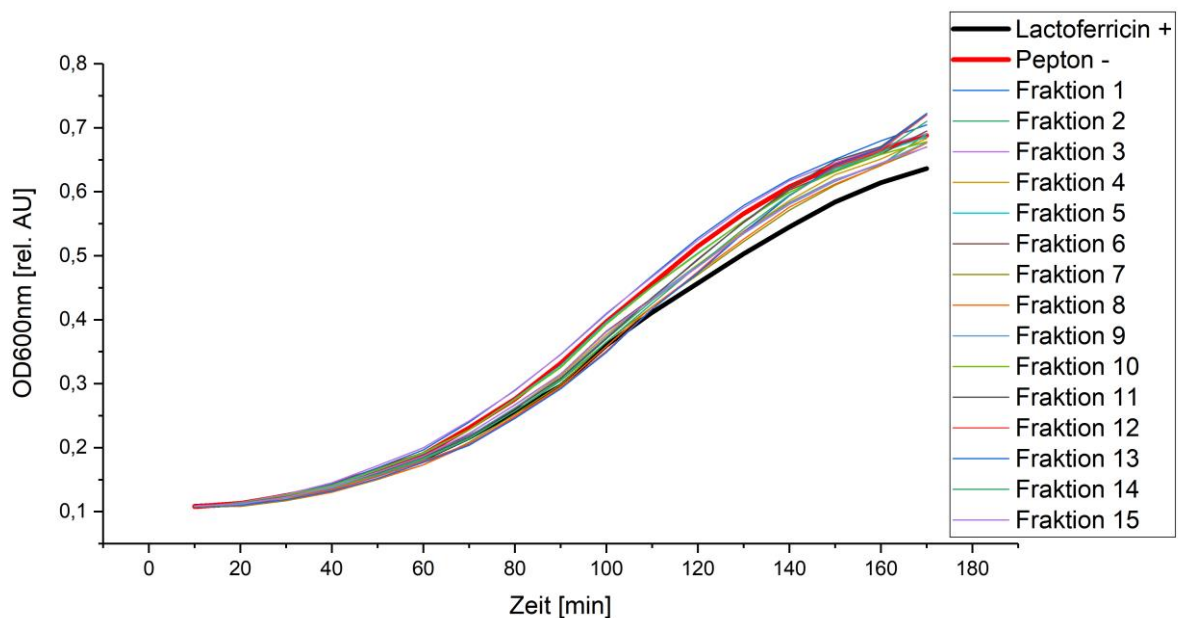


Abbildung 41: Wachstumskurven von *E. coli* in der Microbroth-Kultivierung. Die Wachstumskurve der AMP-Kontrolle wies ein geringeres Wachstum auf.

Bei dem Microbroth-Assay von *E. coli* konnte ein verringertes Wachstum durch die Positivkontrolle Lactoferricin B festgestellt werden. Die OD zeigte nach 170 min einen Wert von 0,62 rel. AU. Das Pepton als Negativkontrolle wies einen OD-Wert von 0,66 rel. AU auf und war im Vergleich zum Lactoferricin B erhöht. Die Peptide aus den Lupinenhydrolysatfraktionen führten zu einem ähnlichen Wachstum von *E. coli* wie die Negativkontrolle und lagen im Durchschnitt bei einer OD von 0,66 rel. AU. Dadurch lässt sich sagen, dass keine antimikrobiellen Peptide für den Einsatz bei Gram-negativen Bakterien in den Fraktionen gefunden wurden (siehe Abbildung 41).

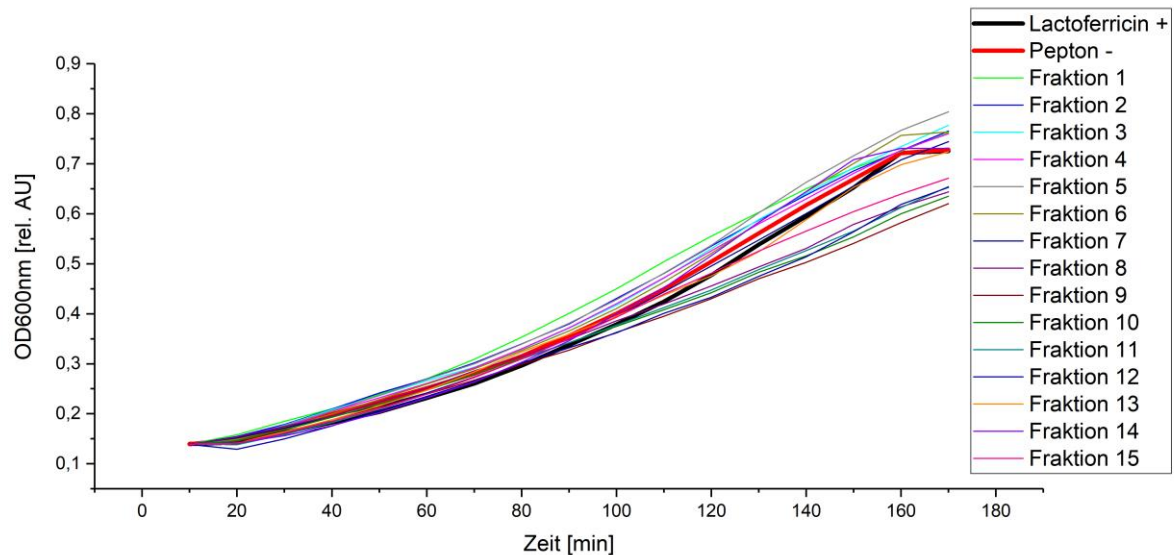


Abbildung 42:Wachstumskurven von *B. subtilis* in der Microbroth-Kultivierung. Bei dem gram-positiven Bakterium war keine Wachstumsinhibierung durch Peptide zu erkennen.

Bei *B. subtilis* konnte kein Unterschied im Wachstum bei der Lactoferricin- und der Peptonprobe festgestellt werden. Beide lagen nach 170 min bei einer OD von 0,7 rel. AU, wodurch die Aussagekraft des Versuchs für *B. subtilis* stark vermindert ist. Das Ergebnis widerspricht den allgemeinen Forschungsergebnissen, dass Lactoferricin B die Synthese wichtiger Zellproteine inhibiert [126] und somit das Wachstum hemmt. Obwohl für den Großteil der Peptidfraktionen kein Unterschied zur Negativkontrolle ausgemacht werden konnte, gab es dennoch eine Gruppe der Peptidfraktionen, die ein geringeres Wachstum zeigen. Es handelt sich dabei um die Fraktionen 7, 8, 9, 10, 11 und 14 (siehe Abbildung 42). Sie wiesen eine durchschnittliche OD von 0,65 rel. AU auf. Die Fraktionen 1, 2, 3, 4, 5, 6, 12, 13 und 15 dagegen, lagen bei einer durchschnittlichen OD von 0,71 rel. AU. Ob hierbei antimikrobielle Peptide gefunden wurden, ist daher nicht eindeutig zu sagen, da die Positivkontrolle negativ ausgefallen ist. Die Wirkung von Lactoferricin B auf *B. subtilis* müsste mit verschiedenen höheren Konzentrationen wiederholt werden.

Die Laufzeit von 3 h erschien ausreichend und sollte nicht verlängert werden, da bei einer höheren OD Messungenauigkeiten auftreten. Bei *E. coli* konnte eine Abnahme des Wachstums nach 120 min beobachtet werden. Bei *B. subtilis* trat dies ab 140 min ein. Bei dem bisherigen Stand lässt sich dennoch sagen, dass der abgewandelte Microbroth-Verdünnungsassay die Auswirkungen verschiedener Substanzen auf das mikrobielle Wachstum sichtbar macht. Besonders hervorzuheben ist die Verwendung geringer Probenmengen, wodurch er sich gut für das Screeningverfahren von antimikrobiellen Peptiden eignet.

4.3.4 Untersuchung der antikanzerogenen Eigenschaften

Der Wirkmechanismus von antikanzerogenen und antimikrobiellen Peptiden ist, wie in Kapitel 3.1.8 beschrieben, sehr ähnlich. Durch die im Vergleich zu Bakterien lange Generationszeit von Säugerzellen kann daher kein auf Messung der Zelldichte basierendes Verfahren angewandt werden. Eine andere Möglichkeit bietet jedoch die Untersuchung der Zellviabilität. Hierfür eignet sich der CTB-Test (CellTiterBlue). Er basiert auf der Reduktion des blauen Farbstoffes Resazurin zum pinken Resorufin, welches bei 590 nm eine Fluoreszenz emittiert. Durch die Verstoffwechslung des Sauerstoffs durch die lebenden Zellen wird die Reduktion des Resazurins induziert, wodurch im Vergleich zur Referenzprobe Rückschlüsse auf die Viabilität der Zellen gezogen werden können.

Als Zelllinie wurde die humane Adenokarzinom-Zelllinie A549 verwendet. Diese stammt aus einem malignen Karzinom der Lunge. Die Zellen wurden mit DMEM-Medium mit 10% FKS und Zugabe eines 1% Penicillin-Streptomycin-Gemisches bei 37°C und 10% CO₂ kultiviert. Für die Vergleichbarkeit der Proben mussten zunächst definierte Zellzahlen ausplattiert werden. Dazu wurden die adhärennten Zellen mit PBS-Puffer gewaschen, das PBS entfernt und die Zellen anschließend mit 4 mL Trypsin inkubiert. Nachdem sich die Zellen vom Boden der Kulturschale gelöst hatten, wurden sie zusammen mit 4 mL DMEM-Medium in ein Probenröhrchen überführt und 5 min bei 300 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Zellen in 3 mL Medium resuspendiert. Die Zellzählung erfolgte mit einer Neubauer-Zählkammer und dem Einfärben der Zellsuspension mit Trypan-Blau im Verhältnis 1:1. Im Anschluss wurden jeweils 8.000 Zellen pro Well in einer 96-Well-Platte ausplattiert. Die Peptidkonzentration der Fraktionen wurde auf 500 µg/mL normiert und steril filtriert. Der Ansatz im Well bestand aus 50 µL Probe und 100 µL Zellsuspension (mit 8.000 Zellen). Für die Positivkontrollen wurden zwei SDS-Lösungen (100 mM und 10 mM) und als Negativkontrollen Tris-Puffer verwendet. Als Referenz diente eine Probe mit DMEM. Die Messung der Zellviabilität über den CTB-Test erfolgte nach einer Inkubationszeit von 20 h (über Nacht) bei 37°C und 10% CO₂. Das Medium wurde dazu entfernt und 100 µL einer 10% CTB-Lösung hinzugegeben. Die Intensität des messbaren Resorufin nahm im Laufe der Zeit zu und war erst nach einer Inkubationszeit von 20 min messbar. Bis zur Messung der Fluoreszenz wurde eine Dauer von 45 min gewählt, um aussagekräftige Ergebnisse zu gewährleisten. Zur Messung des

Fluorophors Resorufin wurde eine Extinktion bei 579 nm und eine Emission bei 584 nm gewählt. Je mehr lebensfähige Zellen sich im Well befanden, umso höher die Intensität der emittierten Fluoreszenz.

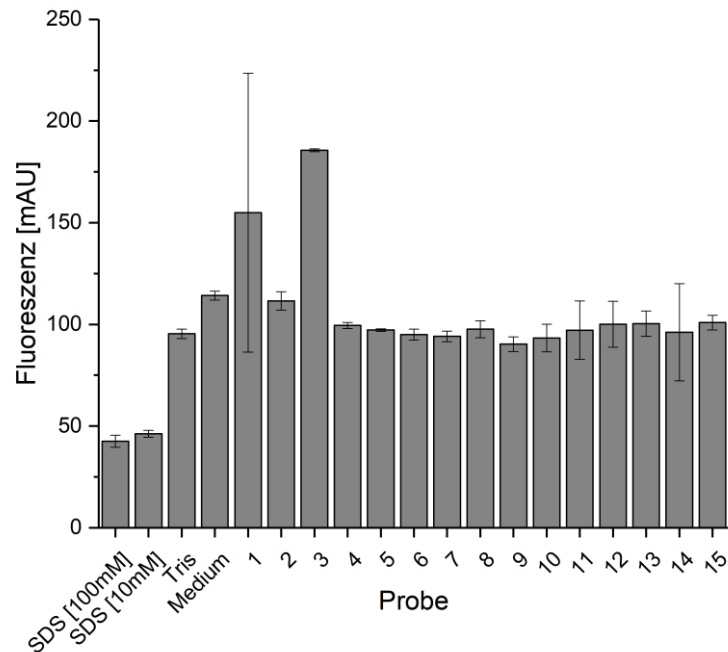


Abbildung 43: CTB-Test der antikanzerogenen Peptide. Die Peptidfraktionen führten zu keiner Wachstumsinhibierung der A549 Zellen

Die Positivkontrollen wiesen eine Intensität von 50 mAU auf. Damit lagen sie bei dem halben Wert der übrigen Proben. Man konnte daher von einem deutlichen Effekt des SDS auf die A549 Zellen sprechen. Bei Zugabe von Tris-Puffer bzw. Medium konnte eine Intensität von 98 bzw. 120 mAU gemessen werden. Durch Zugabe des Puffers kann von einer Verdünnung des Mediums ausgegangen werden, wodurch die Reduktion des Resazurins gegebenenfalls leicht gemindert wurde. Die Fraktionen wiesen überwiegend einen Wert von 100 mAU auf, was der Leerprobe des Puffers entsprach. Die Fraktionen 1 und 3 wiesen einen deutlich erhöhten Wert von 150 bzw. 175 mAU auf. Möglicherweise führten die angesprochenen Flavonoide zu einer Interferenz des Messsignals. Ein proliferierender Effekt bei Säugerzellen durch sehr kurzkettige Peptide war eher auszuschließen. Eine weitere Möglichkeit bestand in einer Abweichung beim Aussäen der Zellen. Die Ergebnisse wiesen darauf hin, dass keine antikanzerogenen Eigenschaften in den Peptidfraktionen festgestellt werden konnten (siehe Abbildung 43).

4.3.5 Fazit

Für die Aufreinigung der Peptidisolate wurden verschiedene Fraktionierungsgradienten gewählt. Dies war notwendig, um die Anzahl an unterschiedlichen Peptiden innerhalb einer Fraktion weiter zu reduzieren und mögliche Peaküberlagerungen zu minimieren. Diese Herangehensweise führte dazu, dass die Ausbeute der gewonnenen Peptide pro Fraktion verringert wurde. Zur Gewinnung eines reinen Peptidisolats wären weitere Fraktionierungen der jeweiligen Peptidfraktionen notwendig, wodurch die Ausbeute an reinen Peptidisolaten weiter vermindert werden würde. Für die verwendeten Screeningverfahren sind unterschiedlich große Peptidmengen pro Versuch notwendig. Das Reaktionsvolumen sollte daher möglichst minimal gewählt werden. Für die Mehrheit der verwendeten bioaktiven Screeningverfahren ist die Sensitivität ausschlaggebend, ob bioaktive Eigenschaften zuverlässig detektiert werden können. Inhibitorische Verfahren sind in der Regel wenig komplex, da wenige Komponenten an den zugrundeliegenden Mechanismen des Nachweisverfahrens beteiligt sind. Diese basieren häufig auf der Inhibition eines Enzyms oder Stoffes, dessen katalytisches Produkt quantifiziert werden kann. Zu diesen Versuchen gehörten die Nachweise der antioxidativen und antihypertensiven Peptide. Nachweisverfahren von Peptiden, die sich gegen lebende Organismen richten, wie die AMPs oder ACPs, sind dagegen sehr komplex und einige Mechanismen bis heute nicht eindeutig verstanden. Grundsätzlich lässt sich daher sagen, dass die eingesetzte Peptidmenge entscheidend für die Aussagekraft des Bioscreenings war. Assays mit lebenden Zellen und Medien benötigten im Vergleich zu Inhibitionsassays größere Peptidmengen, um einen aussagekräftigen Nachweis zu ermöglichen. Die Assays für das Screening der bioaktiven Peptide konnten erfolgreich angewandt und evaluiert werden. So konnten im Lupinenproteinhydrolysat zwei Peptidfraktionen mit stark erhöhten antioxidativen Eigenschaften, zwei Peptidfraktionen mit antihypertensiven Eigenschaften und sechs Peptidfraktionen mit einer möglichen antimikrobiellen Wirkung gegen *B. subtilis* gefunden werden. Antikanzergene Eigenschaften konnten in keiner Peptidfraktion nachgewiesen werden.

Für die angewandten Nachweismethoden konnten verschiedene Vor- und Nachteile für die Verwendung von experimentellen Peptidisolaten festgestellt werden. Die Nachweise für die ACE-Inhibition oder der ORAC-Wert der Peptide konnten erfolgreich implementiert werden, wobei besonders der ORAC Test als sehr sensitiv einzustufen war. So konnte belegt werden, dass schon geringe Peptidkonzentrationen Auswirkungen auf

die Quantifizierung der antioxidativen Kapazität hatten. Eine antioxidative Kapazität konnte in allen gemessenen Proben des Lupinenproteinhydrolysats ermittelt werden. Hier wiesen besonders die Fraktionen der kurzkettigen Peptide einen stark erhöhten ORAC-Wert auf. Zudem konnte durch die automatische Messung im Fluoreszenz-Mikrotiterplatten-Spektrophotometers die Überwachung des Versuchsverlaufs verringert werden, was die Handhabung der Methode erheblich erleichterte.

Der ACE-Test wies ebenfalls eine hohe Sensitivität für den Nachweis von bioaktiven Peptiden auf. Besonders die Kopplung an eine chromatographische Analytik erhöhte die Genauigkeit. Nachteile bestanden in der Verwendung des Enzyms ACE. Bei Dreifachbestimmungen und einer hohen Probenanzahl schien diese Methode weniger geeignet, da geringe Schwankungen in der pipettierten Enzymmenge direkte Auswirkungen auf den Umsatz des HHL hatten und somit das Ergebnis beeinflussten. Die Methode wurde auf eine minimale Enzymmenge angepasst. Allerdings wird der überwiegende Anteil des Probenvolumens für den Vorlauf der RP-HPLC aufgewendet. Somit war sie verhältnismäßig kostenintensiv, weniger für Hochdurchsatzverfahren geeignet und fehleranfällig in der Handhabung.

Die Anwendung des Microbroth-Verdünnungs-Assays basiert auf der Ermittlung der Suszeptibilität der Mikroorganismen gegenüber verschiedenen Antibiotikakonzentrationen. Das Wachstum wird dabei nicht quantifiziert, sondern lediglich nachgewiesen. Das hier verwendete Screening der AMPs überwacht stattdessen das Wachstum der Mikroorganismen, was als Indikator für mögliche AMPs herangezogen werden kann. Grundsätzlich lässt sich sagen, dass diese unübliche Methode der 96 Well-Kultivierung zufriedenstellend war, da die Inkubation nur über wenige Stunden erfolgte, um eine Aussage treffen zu können. Optimierungsbedarf bestand bei der Ermittlung der Mindestmenge der zu applizierenden antimikrobiellen Substanz. So sollte hier zuvor die Wirksamkeit verschiedener Lactoferricin B-Konzentrationen im Screening untersucht werden. Diese könnten Rückschlüsse auf die minimal einzusetzende Peptidmenge aus den Peptidfraktionen geben und somit die Aussagekraft erhöhen. Daher konnten die bisherigen Ergebnisse nur als Indiz einer möglichen antimikrobiellen Aktivität in den Peptidfraktionen herangezogen werden.

Für den Nachweis von ACPs spielte ebenfalls die Menge der eingesetzten Peptide eine entscheidende Rolle. Obwohl die Konzentration der verwendeten Proben hier bei über 500 µg/mL lag, konnte kein Einfluss auf das bakterielle Wachstum festgestellt werden.

Die Positivkontrolle sollte durch ein bekanntes antikanzerogenes Peptid ausgetauscht werden, um einen peptidbasierten Referenzwert zu liefern und somit die Aussagekraft des Assays zu erhöhen. Die Verwendung des CTB-Tests zur Überprüfung der Zellviabilität erschien ausreichend sensitiv und geeignet.

4.4 Massenspektrometrische Analyse der Peptidfraktionen

Um das nachgewiesene bioaktive Potential der Peptidfraktionen zu charakterisieren, war eine massenspektrometrische Analyse notwendig. Dazu wurden die Fraktionen mit Hilfe einer UHPLC-ESI-QTOF-MS analysiert. Hierbei wurden die detektierten Massen zur Berechnung der Aminosäuresequenzen verwendet und die Ergebnisse mit den Massen aus dem *in silico* Verdau der Proteinbestandteile des Lupinenproteins verglichen. Über Tandem-Massenspektrometrie konnten die bioaktiven Substanzen weiter charakterisiert und zugeordnet werden.

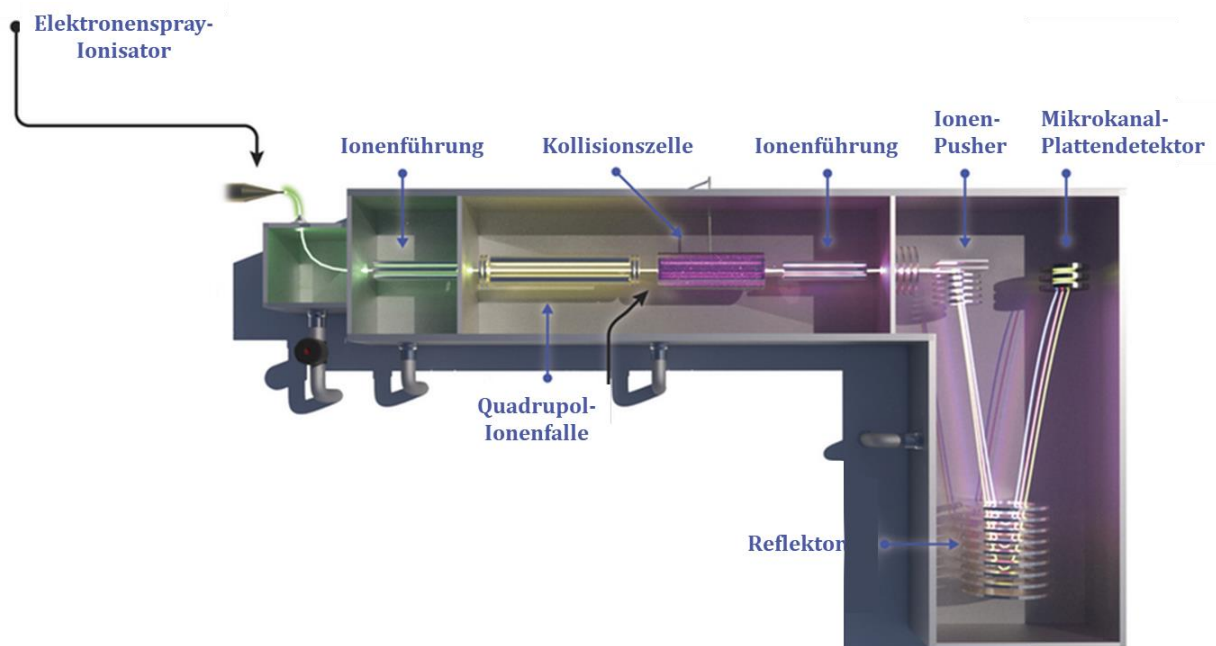


Abbildung 44: ESI-Q-TOF-MS Aufbau (modifiziert nach [127])

In einem Massenspektrometer werden die zu analysierenden Proben durch eine Ionenquelle ionisiert, über einen Massenanalysator in ihrem Masse/Ladungsverhältnis getrennt und über ein Stoßgas fragmentiert. Die Massen der Fragmente können über einen Detektor quantifiziert werden. Zur Ionisierung von Analyten finden verschiedene Verfahren Anwendung. Diese richten sich nach der Größe und Beschaffenheit des zu analysierenden Moleküls. Peptide und Proteine gehören zu den größeren Bioanalyten,

welche durch nicht-kovalente Wechselwirkungen innerhalb des Moleküls, als sehr fragil eingestuft werden können. Die Auftrennung der Probe geschieht als erstes über eine UHPLC-Säule. Sanfte Ionisierungsmethoden stellen neben der Matrix-Assistierten Laser-Desorption-Ionisierung (MALDI) zum Beispiel die Elektrospray-Ionisation (ESI) dar [128]. Dabei wird die Probe im weiteren Schritt über eine Metallkapillare in einem elektrischen Spannungsfeld vernebelt und die feinen Tröpfchen über ein Trägergas (wie Helium) weiter verdampft. Dadurch enthalten einige der kleiner als 2 nm großen Tröpfchen nur ein einziges Analytmolekül [129]. Über Quadrupolgeräte werden hochfrequente Quadrupolfelder quer zur Flugrichtung des Analyten erzeugt. Dies dient zur Isolation der Molekülmassen durch Beschleunigung einer spezifischen Masse (Ionenfalle). In einem weiteren Schritt können sie in einer Kollisionszelle fragmentiert werden. Die spezifischen Bruchstücke werden zuletzt über ein Flugzeitmassenspektrometer (engl. Time-of-flight mass spectrometer, TOF) durch Änderung der Flugbahnen, separiert und am Detektor detektiert. Das gesamte Verfahren wird daher als LC-ESI-Q-TOF-MS bezeichnet (siehe Abbildung 44).

4.4.1 Analyse der Peptidsequenzen über UHPLC-ESI-QTOF-MS

Zur Bestimmung der Peptidsequenzen wurden die Peptidfraktionen mit der höchsten Bioaktivität in der UHPLC-ESI-QTOF-MS massenspektrometrisch analysiert. Dafür wurden die Fraktionen aus den Versuchen zum Nachweis der antioxidativen Kapazität und der antihypertensiven Eigenschaften ausgewählt. Dies waren die Feinfraktionen 5(1) und 11(1) des ORAC- und die Feinfraktion 10(1) und 10(2) des ACE-Tests. Die Fraktionen wurden über die UHPLC aufgetrennt. Dabei wurde eine zu den Vorversuchen äquivalente Chromatographiesäule verwendet. Die Phenomenex Aeris XB-C18 1,7 μm wies eine Länge von 150 mm auf und besaß geringere Partikelgrößen von 1,7 μm . Dadurch musste sie unter höherem Druck verwendet werden und erzielte eine hohe Trennleistung. Das Gradientenprogramm wurde aus Kapitel 4.2.2 transferiert und mit einer Flussrate von 400 $\mu\text{L}/\text{min}$, einer Temperatur von 50°C und einer verkürzten Laufzeit von 8 min betrieben. In den Eluenten wurde TFA durch FA ersetzt, um die Ionensuppression durch TFA bei dem ESI Verfahren zu verringern. Dadurch konnte die Sensitivität erhöht und das Hintergrundrauschen vermindert werden. Die Peptidfraktionen wurden durch die UHPLC aufgetrennt und im Anschluss durch die positive Elektrospray-Ionisation (ESI) ionisiert. Über das elektrische Feld des Quadrupols konnten die Ionen selektiert werden. Die Massen wurden über die TOF des Ions berechnet. Durch die Kopplung der Massenspektrometrie an die Chromatographiesäule, konnte für die verschiedenen Peaks die zugehörige Masse ausgegeben werden. Da die Peptidfraktionen in einem Längenbereich von 2-3 Aminosäuren gesammelt wurden, konnten bedeutend längere Aminosäuresequenzen ausgeschlossen werden. Als Beispiel besitzt eine durchschnittliche Masse von m/z 650 eine Peptidlänge von fünf Aminosäuren. Je nach Zusammensetzung der Sequenz kann dieser Wert variieren. Der Fokus wurde daher auf Massen mit einer Größe $< m/z$ 650 gelegt.

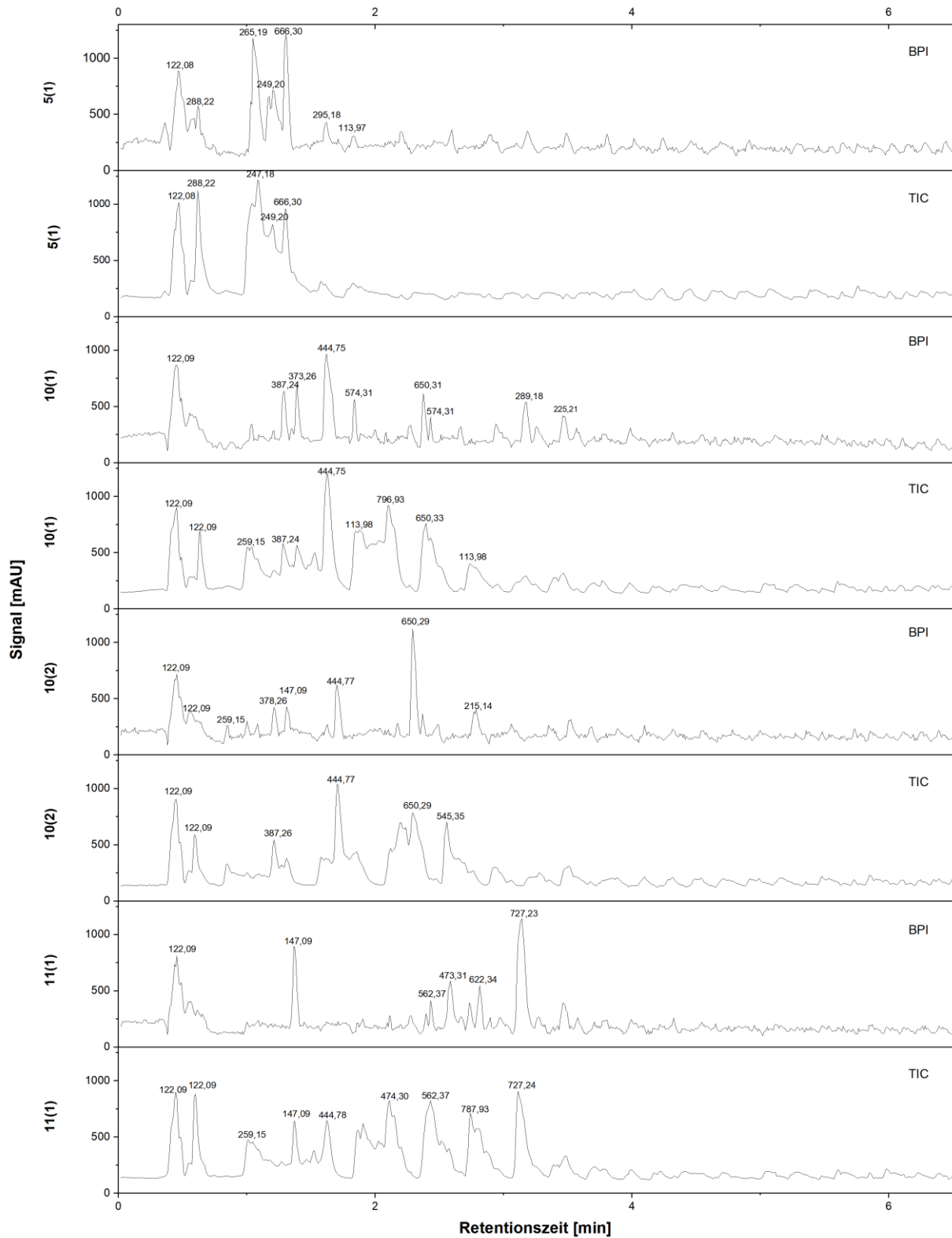


Abbildung 45: UHPLC-Q-TOF-MS der Lupinenhydrolysatfraktionen. Da die Fraktionen im Bereich der Di- und Tripeptide gesammelt wurden, konnten Massen oberhalb von m/z 500 für Peptide ausgeschlossen werden. Demnach mussten weitere nicht-peptidische Substanzen in den Fraktionen zu finden sein.

Wie sich in Abbildung 45 zeigt, lagen die Peptide nicht als reines Isolat vor. Den Peaks mit signifikanter Intensität wurde eine Masse zugeordnet, wobei alle Massen eine Größe unterhalb von m/z 650 aufwiesen. Detektiert wurde jeweils die Gesamtzahl an Ionen als TIC (Total Ion Current) und die selektierten Ionen als BPI (Base Peak Ion) unterhalb der Masse von m/z 650. Die Fraktion 5(1) wies überwiegend Massen im Bereich der Dipeptide bei m/z 200-300 auf. Die Fraktion 10(1) und 10(2) bei m/z 250 – 450. Eine Ausnahme stellte die Fraktion 11(1) dar, bei der die Messung des BPI (Base Peak Ion) der Hauptpeak eine Masse von m/z 727,23 aufwies. Allerdings war eine Peptidlänge von durchschnittlich sieben Aminosäuren in diesem Fraktionsbereich auszuschließen.

Die Hauptpeaks wurden über MassLynx™ analysiert und Peptidmassen bzw. mögliche Peptidsequenzen zugeordnet. Dabei konnten lediglich in Fraktion 5(1) die Peptide VF und LY eindeutig zugeordnet werden. Berücksichtigt man jedoch einen Fehler $m/z < 1$ in der Detektion der Massen, so sind weitere Peptide möglich. Die Aminosäuresequenzen der Lupinenproteinbestandteile (siehe Tabelle 3) wurden mit den Datenbanken (UniProt) abgeglichen. Die Sequenzen für Conglutin α , β , γ 1, γ 2, δ und Albumin wurden über ExPASy PeptideMass analysiert. Dazu wurden sämtliche Sequenzen über die Proteinase K (einem Enzym der Subtilisinfamilie) in einer Simulation verdaut und die Massen unterhalb von 3.000 Da betrachtet. Im Vergleich mit den detektierten Massen der Hydrolysate konnten weitere Peptidsequenzen im *in silico* Verdau bestimmt werden (siehe Tabelle 8).

Tabelle 8: Peptidabgleich der detektierten Massen aus dem *in silico* Verdau des Lupinenproteins

Fraktion	Detektiert			Conglutin α		Conglutin β		Conglutin γ 1		Conglutin γ 2		Conglutin δ		Albumin	
	Masse	AS	Ws (%)	Masse	AS	Masse	AS	Masse	AS	Masse	AS	Masse	AS	Masse	AS
5(1)	247,18	-		247,129	EV	247,13	DI	247,13	DL	247,13	DL, EV	246,14	NL	-	-
	249,21	-		-		-		245,186	IL	249,127	MV	-		-	-
	265,19	VF	100	263,139	PF	-		-		-		-		-	-
	295,18	LY	100	294,181	KF	295,13	EF	-		295,13	EF	-		-	-
10(1)	259,15	-		260,19	KL	-		-		-		388,21	QQI	-	-
	387,24	-		-		-		-		-		-		-	-
	444,75	-		-		-		443,22	PNNV, SHSI	-		-		-	-
	650,31	-		-		-		-		648,302	MTSNPV	-		-	-
10(2)	215,14	-		-		-		215,14	PV	215,14	PV	-		-	-
	444,77	-		-		-		443,22	PNNV, SHSI	443,26	PKQA	-		-	-
	545,35	-		546,252	NEGQV	-		-		-		-		-	-
	650,29	-		-		-		-		648,302	MTSNPV	-		-	-
11(1)	147,09	-		-		-		147,07	GA	147,07	GA	-		-	-
	444,78	-		-		-		-		443,26	PKQA	447,209	EGEL	-	-
	562,37	-		-		562,31	SKNTL	-		-		-		-	-
	727,23	-		-		-		-		-		-		-	-
	UniProt- Sequenz			CONA1 LUPAN		CONB5 LUPAN		CONG1 LUPAN		CONG2 LUPAN		COND1 LUPAN		ALB1 LUPAN	

Fragmente aus möglichen Albuminresten in der Proteinlösung konnten ausgeschlossen werden, da sich keine der detektierten Massen in der Proteinsequenz wiederfinden ließ. Obwohl das Conglutin γ nur einen Anteil von 5% des Gesamtglobulinanteils im Lupinenprotein ausmacht, fand sich dort ein Großteil der Massen aus den Fraktionen mit bioaktiven Peptiden wieder (Aminosäuresequenzen mit übereinstimmenden Massen wurden hervorgehoben).

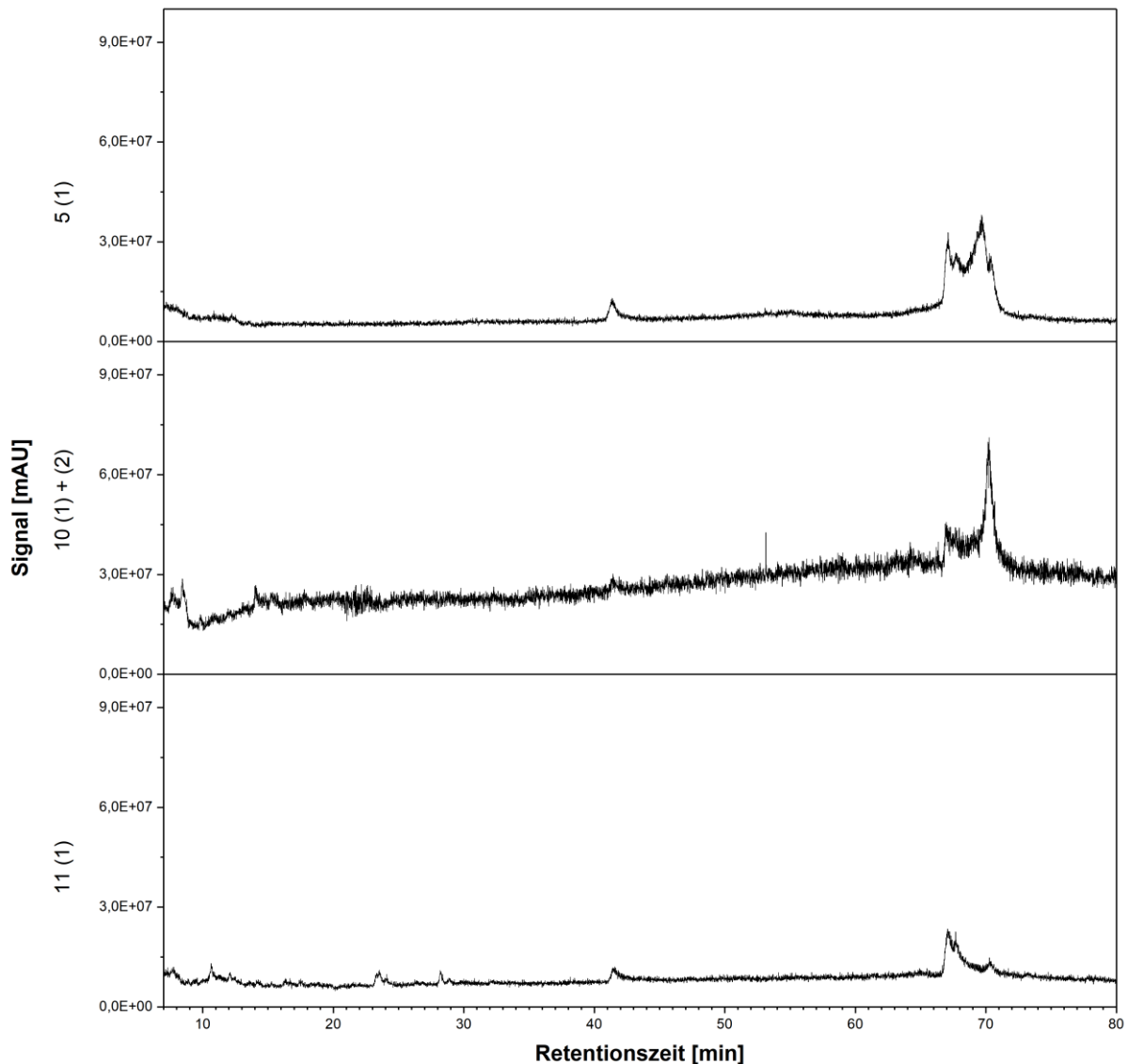


Abbildung 46: UPLC-Fraktionierung der Peptidfraktionen. Durch Überlagerungen der Peptidgrößen konnten keine Peaks einzelner Peptide detektiert werden. Neben Interferenzen des Lösungsmittels konnten in Fraktion 11(1) zwei Peaks bei einer Retentionszeit zwischen 20 und 30 min gefunden werden.

Die eindeutige Zuordnung einer bioaktiven Eigenschaft zu einem einzelnen Peptid, gestaltete sich durch die Überlagerung mehrerer Peptide innerhalb eines einzelnen Peaks

schwierig. Die Fraktionen wurden daher erneut über ein UPLC-System fraktioniert. Durch die geringen Ausbeuten im ersten Durchlauf, wurden im zweiten Fraktionierungsschritt kaum Peaks detektiert. Neben den Interferenzen durch den Anstieg des Lösemittelanteils im Gradienten bei $R_t = 42$ min und $R_t = 66$ min, sind wenige Peaks auszumachen. In Fraktion 11(1) fanden sich zwei Peaks bei $R_t = 24$ und 28 min. Durch Fraktionierung (5 min-Fraktionen) und Aufreinigung mit der bisher verwendeten Aufreinigungsstrategie konnten die Peaks erfolgreich isoliert werden und dem Peak aus der Fraktion 11(1)-5 mit der $R_t = 24$ min eine ORAC-Aktivität zugeordnet werden (Daten nicht aufgeführt).

4.4.2 Tandem-massenspektrometrische Analyse der bioaktiven Substanz

Über das MS/MS- Verfahren werden einzelne Massen im Massenspektrometer analysiert. Durch Verwendung von Ionenfallen (Quadrupol) werden Vorläuferionen einer bestimmten Masse selektiert. Diese Vorläuferionen werden in einer Kollisionskammer über das Stoßgas Helium fragmentiert. Je nach Intensität der zugeführten Energie in der Stoßzelle bilden sich Fragmente unterschiedlicher Größe. Die Massen der Produkt-Ionen werden über die TOF berechnet. Somit können Peptidsequenzen durch das Überlappen der Sequenzen bzw. Moleküle anhand der Charakteristika ihrer Massenfragmente bestimmt werden (siehe Abbildung 47).

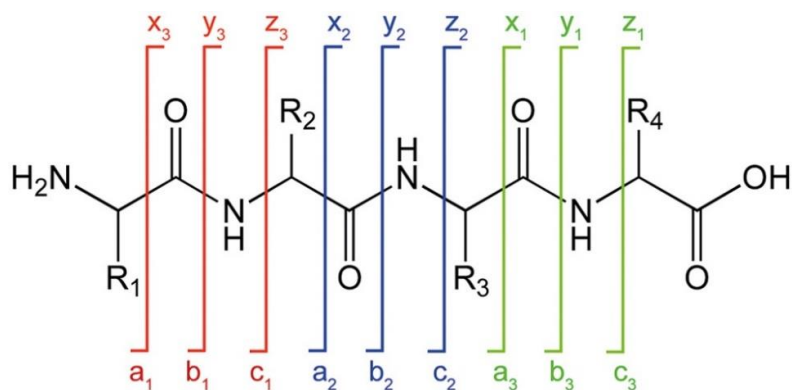


Abbildung 47: Prinzip der Peptidfragmentierung [131]

Der Peak der antioxidativen Fraktion 11(1)-5 enthielt eine Masse von m/z 727,17. Durch MS/MS- Fragmentierung bei einer Kollisionsspannung von 30 V entstanden mehrere spezifische Produkt-Ionen (siehe Tabelle 9, Anhang Abbildung 57 und Abbildung 58). Zur Strukturaufklärung wurde eine H-NMR-Spektroskopie angewandt. Dabei konnten drei Glucoside und zwei Aromaten aufgeklärt werden (Daten nicht aufgeführt). Aus der detektierten Masse von m/z 727,17 ergibt sich die Formel $C_{32}H_{39}O_{19}$. Daher liegt das

Vorhandensein eines Flavons nahe. Lupinen enthalten das Flavonoid Apigenin (Kapitel 3.2.2). Es konnte daher präzisiert werden, dass es sich um das Apigenin 6,8-di-C-glucosid-7-O-apiofuranosid handelt (siehe Abbildung 48).

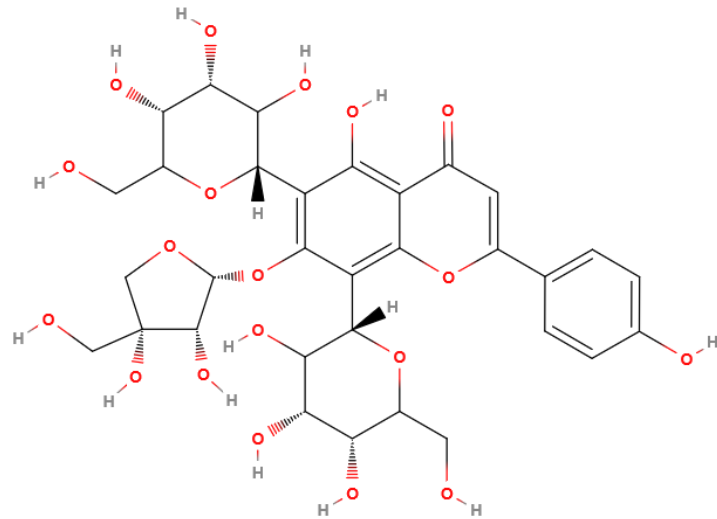


Abbildung 48: Molekulare Struktur des Apigenin 6,8-di-C-glucosid-7-O-apiofuranosid

Die gewonnenen Daten zur massenspektrometrischen Analyse konnten in Tabelle 9 zusammengefasst werden. Das Apigenin 6,8-di-C-glucosid-7-O-apiofuranosid wurde in *L. mexicanus* [132] nachgewiesen und konnte somit auch in *L. angustifolius* bestätigt werden.

Tabelle 9: Massenspektrometrische Analyse des Flavonoids über UHPLC-Q-TOF-MS

Komponente	MW [g/mol]	Chemische Formel	Masse des Vorläuferions [g/mol]		Fragmente aus Vorläuferion	
			Kalkuliert	Beobachtet	[M+H] ⁺ (m/z)	[M-H] ⁻ (m/z)
Apigenin 6,8-di- C-glucosid-7-O- apiofuranosid	726	C ₃₂ H ₃₉ O ₁₉	727,208	727,17	727,	725,
					608,	606,
					607,	605,
					577,	575,
					559,	485,
					481,	455,
					475,	395,
					457,	383,
					379,	335
					355,	
					325,	
307, 295						

4.4.3 Fazit

Die massenspektrometrische Analyse ist ein präzises Werkzeug zur Bestimmung von Molekülmassen. Ursprünglich wurde sie für die Detektion von Isotopen verwendet. Im späteren Verlauf erfolgte die Detektion von chemischen Molekülen. Durch die Entwicklung einer Ionenfalle gelang die erste Identifikation eines Proteins. Weiterentwicklungen wie das heutige UHPLC-ESI-QTOF-MS machen sie zu einem der wichtigsten Instrumente in der Strukturaufklärung und Identifikation von Molekülen und Proteinen. Es zeigte sich, dass diese fundamental von der Reinheit und Menge der zu analysierenden Probe abhängt. Mit der Verwendung von digitalen Datenbanken können Proteinhydrolysen simuliert werden und die Massen als wichtiges Indiz herangezogen werden. So konnten mehrere Peptidsequenzen für bioaktive Eigenschaften im Bereich der antioxidativen und antihypertensiven Eigenschaften eingegrenzt werden. Um den jeweiligen Peptiden eine bioaktive Eigenschaft zuzuordnen, wäre eine synthetische Herstellung der Peptide notwendig, mit einem darauf folgenden Bioscreening. Wie bereits in Kapitel 3.2.1 und 3.2.2 erläutert, konnte die Bindung von Polyphenolen an die Speicherproteine der Lupine nicht verhindert werden. Dadurch enthielt eine Peptidfraktion neben den Peptiden auch pflanzliche Komponenten wie Flavonoide. Durch weitere Verfahren zur chemischen Strukturaufklärung konnte das Flavonoid als Apigenin 6,8-di-C-glucosid-7-O-apiofuranosid identifiziert werden.

5 Diskussion und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Modul auf Basis von proteolytischen Keramikkapillaren zur Erzeugung definierter Proteinhydrolysate entwickelt und die Machbarkeit eines solchen biokatalytischen Systems zum Nachweis bioaktiver Peptide untersucht. Die modularen Eigenschaften konnten umfangreich beschrieben und die Eignung der Keramikkapillaren zur Verwendung als eine durchflussbasierte, proteolytische Trägermatrix bestätigt werden. Sie zeichneten sich durch eine hohe Robustheit und einfache Skalierbarkeit aus. Die Porenstruktur mit durchschnittlicher Porengröße von 1,5 μm erlaubte es unterschiedliche Volumenströme auf ihre biokatalytische Eignung zu testen. Dabei traten Effekte wie das Verblocken durch Proteinaggregate auf. Der zukünftige Einsatz von feinporigen Keramiksäumen könnte sich bei heterogenen Suspensionen als günstig erweisen. So könnten durch die Verwendung einer bimodalen Trägerstruktur und Erhöhung der Porosität die Eigenschaften im kontinuierlichen Dauerbetrieb verbessert werden und auch die für kontinuierliche Systeme wichtige Enzym Recovery und Wiederverwertbarkeit der Enzyme berechnet werden. Die Peptidausbeute könnte durch Erhöhung der Proteinkonzentration im Proteinfeed verbessert werden. Das Upscaling der Trägerstruktur ließe sich technisch leicht realisieren, wobei der Kompromiss aus Oberfläche (Porosität) und Diffusionslimitierung (Flussrate) für immobilisierte Enzyme nicht unerheblich ist. Bedenkt man Kosten von 36€/kg (Asa Spezialenzyme GmbH, Deutschland) für die Alcalase, so ist die Wiederverwertbarkeit aus Kostengründen, kein tragendes Argument für die Immobilisierung des Enzyms. Das Upscaling des Reaktormoduls ist an die technischen Eigenschaften der verwendeten Trägerstruktur gebunden, weshalb hier unter Umständen ein neues Konzept notwendig wäre.

Des Weiteren konnten verschiedene Proteinquellen auf ihre Eignung im kontinuierlich betriebenen Biokatalysesystem evaluiert und ein Lupinenproteinhydrolysat erzeugt werden. Bei der Entwicklung gilt es zu bedenken, dass ein Großteil der Speicherproteine aus Lebensmittelproteinen natürliche Proteaseinhibitoren besitzt, die in kontinuierlich betriebenen Systemen zu Einschränkungen führen können. Ebenfalls können Komponenten mit bioaktiven Eigenschaften an Nahrungsmittelproteine binden, die im Nachweis durch Bioscreenings zu falsch-positiven Ergebnissen führen [21]. So konnte,

durch die starke Konzentrierung einzelner Substanzen in der Fraktionierung, ein Flavonoid mit antioxidativen Eigenschaften nachgewiesen werden.

Eine präparative Aufreinigungsstrategie des Hydrolysats über die RP-FPLC konnte entwickelt werden. Diese wurde technisch ausgereizt, wobei die Auflösung der verwendeten Chromatographiesäule zu Überlagerungen in den Peptidfraktionen führte. Die Verlängerung der Wegstrecke würde zur Verbesserung der Auflösung führen. Durch die Verwendung einer zweiten Chromatographiesäule könnte somit eventuell ein weiterer Fraktionierungsschritt eingespart werden. Die Fraktionierung der Hydrolysate galt für den Prozess als „Bottleneck“, da zum einen Verluste in der Aufreinigung auftraten und zum anderen mehrere Wiederholungen für die Erzeugung von homogenen Peptidisolaten notwendig waren. Der Zeitfaktor von acht Tagen von der Erzeugung des Hydrolysats bis zum Abschluss der Lyophilisation ist ebenfalls bei der Entwicklung biokatalytischer Prozesse und Aufreinigungsverfahren zu berücksichtigen.

Im weiteren Verlauf konnten verschiedene Assays zum Nachweis der bioaktiven Eigenschaften untersucht werden. Dabei zeigte sich, dass die Peptidausbeute und Reinheit des Aufreinigungsverfahrens entscheidend für die Aussagekraft der Nachweismethoden waren. Der Nutzen von Substanzen mit bioaktiven Eigenschaften wie der antioxidativen Kapazität muss in Frage gestellt werden. Zum einen konnte in jeder Fraktion ein antioxidatives Potential nachgewiesen werden, zum anderen ist deren Wirkung in biologischen Systemen, über ein natürliches Maß hinaus, wissenschaftlich bisher nicht erwiesen [125]. Die Ergebnisse aus *in vitro* Versuchen sind nicht eindeutig auf *in vivo* Versuche übertragbar. Oral zugeführte antioxidative Stoffe werden im Körper als „fremd“ erkannt und schnell metabolisiert, dadurch können sie ihre Wirkung kaum entfalten. Dies ist auch ein allgemein diskutierter Nachteil von peptidbasierten Stoffen. Die Halbwertszeit von Peptiden im menschlichen Körper ist äußerst gering, da sie von gastrointestinalen Enzymen schnell verdaut oder von Leber und Niere aus dem Blutkreislauf entfernt werden. Aus diesem Grund werden sie als Therapeutikum überwiegend intravenös verabreicht. Ihre mangelnde Spezifität und die hohen Herstellungskosten machen sie für das Targeting von Krebszellen bisher uninteressant. Hier geht jedoch die Entwicklung der Peptidtherapeutika der nächsten Generation hin zur Optimierung der Stabilität und Selektivität [134]. Das größte und wichtigste Feld in der Forschung im Bereich der bioaktiven Peptide sind die antimikrobiellen Peptide. Die hier entwickelten Nachweisverfahren sollten weiter optimiert und für hohe Durchsatzraten

ausgebaut werden. Der Fokus des Prozesses sollte gänzlich auf dem Screening von antimikrobiellen (antikanzerogenen) Therapeutika ausgerichtet werden, da in Zukunft eine starke Nachfrage auf dem weltweiten Markt bestehen wird [1].

Für die Herstellung von bioaktiven Peptidisolaten im industriellen Maßstab ist das entwickelte Verfahren wenig geeignet. Dieser Prozess ist als top-down-Prozess zu verstehen, bei dem der Wirkstoff aus komplexen Proteinstrukturen isoliert wird. Der Anteil des Peptidwirkstoffs am Protein ist in der Regel kleiner als 0,01%. Dies erscheint zum einen sehr ressourcenintensiv und unökologisch, da es sich um ein Nahrungsmittelprotein handelt. In Anbetracht des kostenintensiven Downstream-Prozesses ist diese Prozessstrategie zum anderen nicht als ökonomisch anzusehen. Dem gegenüber stehen sehr zielführende Bottom-up-Prozesse, deren Effektivität und Ausbeuten durch den zukünftigen Fortschritt der Technologie zunehmen wird. Hier sind besonders die Fmoc Solid Phase Peptid Synthese Systeme zu nennen. Im großindustriellen Maßstab sind bereits Ausbeuten mit definierter Peptidsequenz im kg-Bereich möglich. Als Beispiel ist Linaclotid, ein Guanylatcyclase-C (GC-C)-Rezeptor-Agonist zu nennen [134]. Das kontinuierlich erzeugte Proteinhydrolysat der Süßlupine konnte aufgereinigt und die Peptidfraktionen bioanalytisch charakterisiert werden. Hier zeigt sich, dass die Aufreinigungsstrategie für den analytischen Maßstab zum Nachweis von bioaktiven Peptiden grundsätzlich geeignet ist. Der Vorteil dieses Ansatzes ist, dass der Grad der Hydrolyse über die Flussrate gesteuert werden kann, welches mit keinem bisher etablierten Verfahren in vergleichbarer Form Anwendung findet. Daher ist besonders die systematische Untersuchung von bioaktiven Proteinintermediaten möglich, was zukünftig weiter verfolgt werden sollte. Der in diesem Projekt entwickelte Prozess könnte als Basis für einen industriellen Herstellungsprozess eines Proteinhydrolysats mit definierten bioaktiven Eigenschaften dienen.

6 Anhang

Im Folgenden werden ergänzende Daten zur oben genannten Vorgehensweise aufgeführt. Des Weiteren werden die verwendeten Methoden beschrieben.

6.1 Ergänzende Daten

6.1.1 Untersuchung der Substratspezifität von Alcalase

Für die Ermittlung der Enzymaktivität wurden zwei Substrate mit Nitrophenylester auf ihre Eignung untersucht und eine Stammlösung mit 1 g/L hergestellt. Das gebildete Produkt (p-Nitrophenol) wurde spektrophotometrisch bei einer Wellenlänge von 402 nm in einer kinetischen Messung detektiert. Die eingesetzte Enzymmenge betrug 1 mg/L. Die Reaktionslösung des Assays wurde mit 25 μ L/mL Stammlösung in Tris pH 7,8 angesetzt. Für Alcalase konnte eine höhere Spezifität für das BAN-Assay festgestellt werden (Abbildung 49).

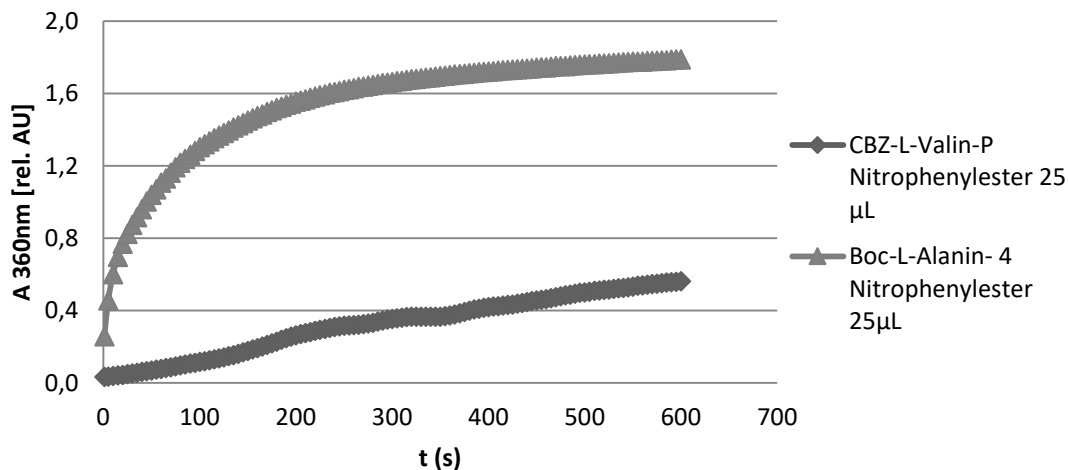


Abbildung 49: Vergleich der Substrate für die Messung der Enzymaktivität. Die Spaltung des Boc-L-Alanin-4 Nitrophenylester wurde bei Alcalase schneller katalysiert als beim CBZ-L-Valin-P-Nitrophenylester.

6.1.2 Ermittlung der Flussraten-abhängigen Verweilzeit des Kapillarmoduls

Die relative Retentionszeit einer Substanz wurde mit einer 25 mg/L Nitrophenol-Lösung ermittelt. Das Nitrophenol wurde bei einer Wellenlänge von 402 nm detektiert. Die Messung erfolgte für jede Flussrate durch einen Nadelpuls (Dirac-Stoß) und wurde in einer Doppelbestimmung durchgeführt. Die Verweilzeit stellt die Zeit vom Detektionspeak bis zum Nullwert dar. Die potenzierte Trendlinie der Datenpunkte wies eine Korrelation über 99,48% auf (Abbildung 50).

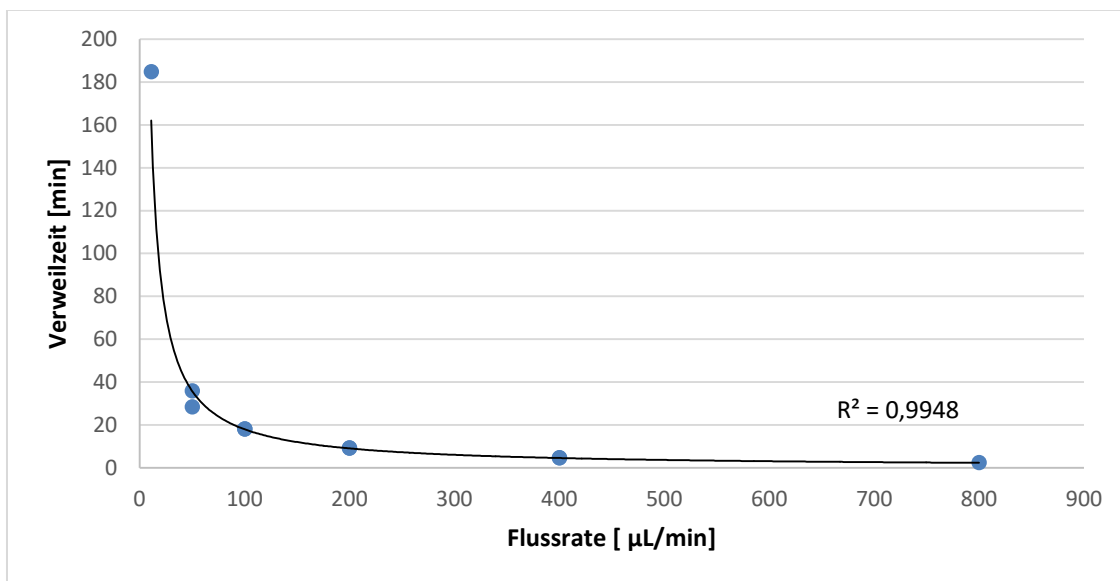


Abbildung 50: Verweilzeit von Nitrophenol im Kapillarmodul. Durch Verdopplung der Flussrate konnte die Verweilzeit der Substanz im Reaktormodul halbiert werden.

6.1.3 Untersuchung der Proteinquantifizierung bei APTES-silanisierten ZrO_2 Kapillaren

Durch die Silanisierung der Kapillare kommt es zu Interferenzen in der Proteinquantifizierung. Nach erfolgter Immobilisierung wurde der Proteingehalt im Überstand mit einer Bradford-Lösung (ROTI® Quant, Roth) quantifiziert. Der Immobilisierungsansatz wurde mit einer Enzymkonzentration von 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ angesetzt und die Beladungskapazität nach (4) berechnet.

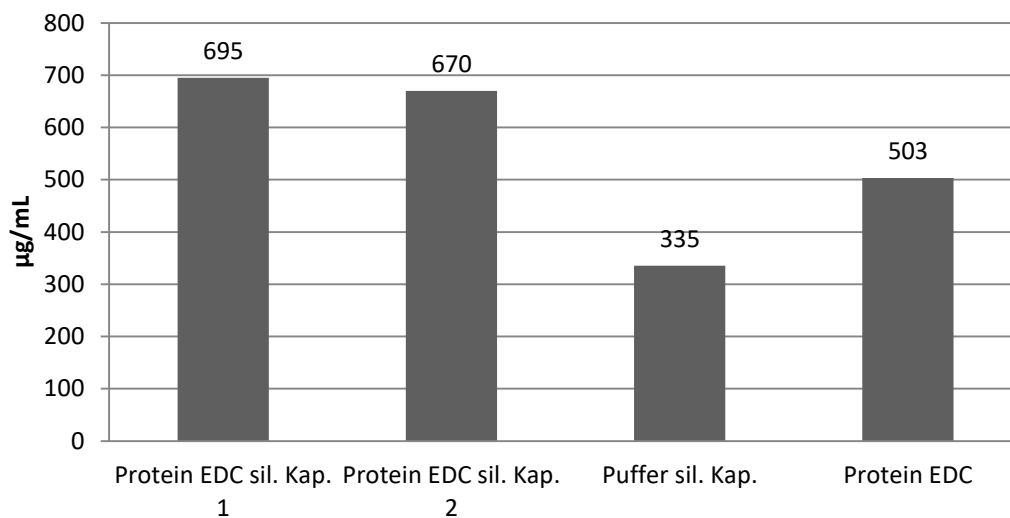


Abbildung 51: Proteingehalt des Immobilisierungsansatzes der APTES Kapillaren. Die Pufferlösung mit silanisierter Kapillare erzeugt eine falsch-positive Interferenz von 335 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Der ermittelte Proteingehalt des Coupling-Ansatzes entspricht der eingesetzten Enzymkonzentration.

Die Beladungskapazität wurde für pulverisiertes ZrO_2 bestimmt, dabei wurden unterschiedliche Methoden verwendet. Das Pulver wurde sowohl im Eppendorfgesäß als auch in einer 24-Well-Platte mit Enzym unter Schwenken bei 4°C über Nacht immobilisiert. Durch die starke Hydrophobizität des gesinterten Pulvers konnte unter Verwendung des Eppendorfgesäßes eine bessere Immobilisierung erreicht werden. Jedoch ist sie im Vergleich zu unsilanisiertem Pulver stark vermindert (Abbildung 52).

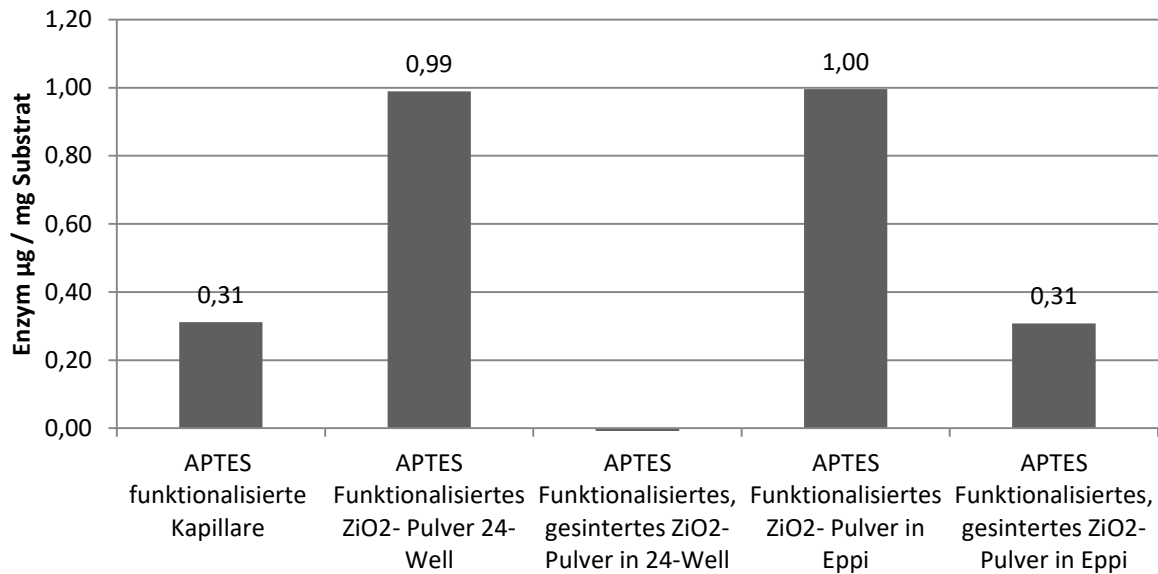


Abbildung 52: Beladungskapazität ZrO_2 . Auf funktionalisiertem ZrO_2 -Pulver, konnte die dreifache Menge an Enzym im Vergleich zur Kapillare immobilisiert werden. Gesintertes Pulver hingegen weist eine geringere Beladungsmenge auf.

6.1.4 Bestimmung der Peptidkonzentration der verschiedenen Lupinenhydrolysatfraktionen

Für die Bestimmung der Peptidkonzentrationen wurden die Peptide der lyophilisierten Fraktionen in 200 μL 0,05 M Tris pH 7,8 resuspendiert und anschließend mit Hilfe des BCA Assays (Pierce™ BCA Protein Assay Kit, Thermo Fisher) bestimmt. Die in den Bioscreenings eingesetzten Peptidproben wiesen eine Konzentration von 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ bei ORAC- und ACE-Test, 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ bei dem AMP-Test und 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ bei dem ACP-Test auf. Anhand der in [Abbildung 53](#), [Abbildung 54](#) und [Abbildung 55](#) ermittelten Konzentrationen wurden die Proben entsprechend normiert.

Im Folgenden sind die Peptidkonzentrationen für die drei Fraktionierungsschritte aus [Kapitel 4.3](#) aufgeführt:

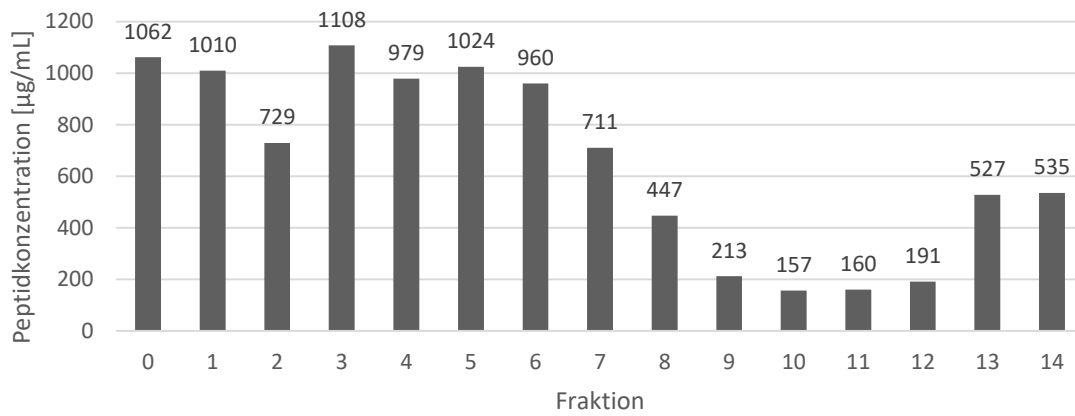


Abbildung 53: Peptidkonzentration der Fraktionierung 1

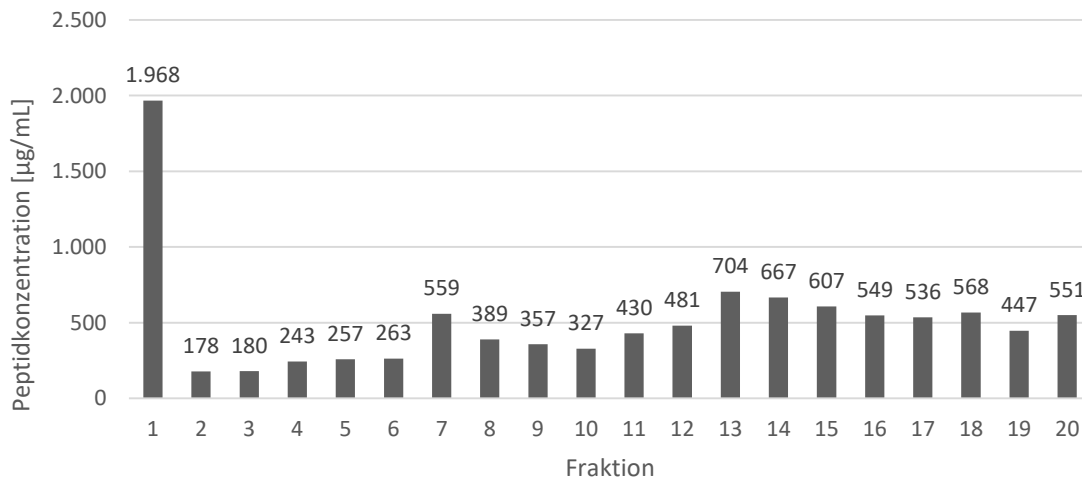


Abbildung 54: Peptidkonzentration der Fraktionierung 2

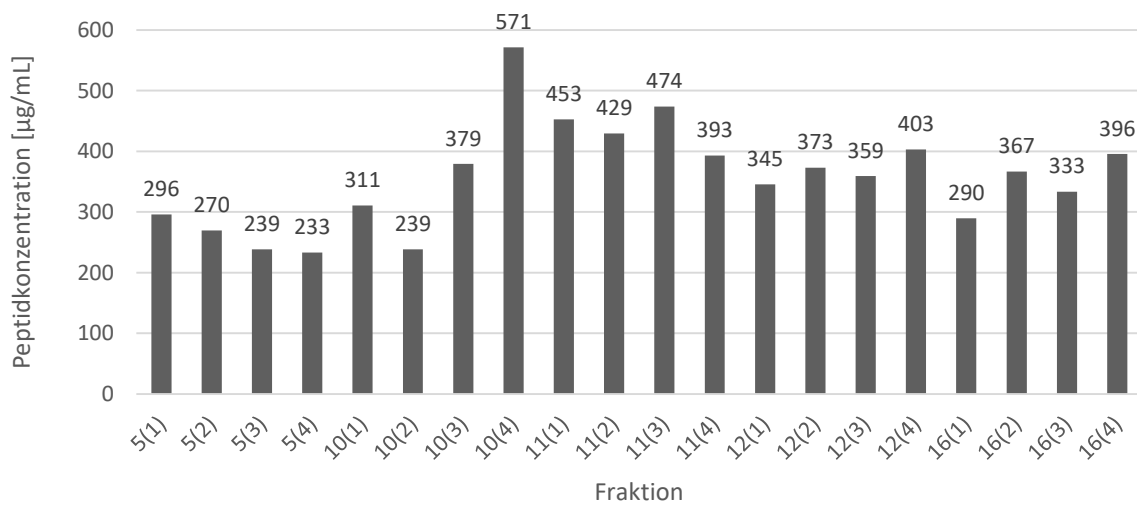


Abbildung 55: Peptidkonzentration der Feinfraktionierung

6.1.5 Schema zur Vereinigung der Peptidfraktionen aus der FPLC

Die Fraktionen aus den FPLC-Läufen wurden wie folgt vereinigt:

Tabelle 10: Fraktionierungsschema für das Lupinenproteinhydrolysat

Fraktionierung 1		Fraktionierung 2		Feinfraktionierung	
Fraktion	Fraktionen	Fraktion	Fraktionen	Fraktion	Fraktionen
1	1C2 - 1C4	1	1B4 - 1C2	5-1	2B5
2	1C5 - 2A2	2	1C3 - 2A1	5-2	2C1
3	2A3 - 2A5	3	2A2 - 2A5	5-3	2C2
4	2B1 - 2B4	4	2B1 - 2B4	5-4	2C3
5	2B5 - 2C2	5	2B5 - 2C3	10-1	3C5
6	2C3 - 3A1	6	2C4 - 3A2	10-2	4A1
7	3A2 - 3A5	7	3A3 - 3B1	10-3	4A2
8	3B1 - 3B3	8	3B2 - 3B5	10-4	4A3
9	3B4 - 3C1	9	3C1 - 3C4	11-1	4A4
10	3C2 - 3C4	10	3C5 - 4A3	11-2	4A5
11	3C5 - 4A2	11	4A4 - 4B2	11-3	4B1
12	4A3 - 4B1	12	4B3 - 4C1	11-4	4B2
13	4B2 - 4B4	13	4C2 - 4C5	12-1	4B3
14	4B5 - 4C2	14	5A1 - 5A4	12-2	4B4
15	5A3 - 5A5	15	5A5 - 5B3	12-3	4B5
		16	5B4 - 5C2	12-4	4C1
		17	5C3 - 6A1	16-1	5B4
		18	6A2 - 6A5	16-2	5B5
		19	6B1 - 6B4	16-3	5C1
		20	6B5 - 6C3	16-4	5C2

6.1.6 Kontaminationsprüfung der Bakterienkulturen

Die verwendeten Bakterienkulturen wurden zuvor mit Hilfe einer Gram-Färbung auf mögliche Kontaminationen überprüft. Dabei war davon auszugehen, dass *E. coli* als kurzes, stäbchenförmiges Bakterium zu erkennen sein sollte. *B. subtilis* hingegen als längliches, stäbchenförmiges Bakterium. Die Gramfärbung färbt gram⁺ Bakterien rötlich und gram⁻ bläulich ein. Durch die Lichtbrechung und die Aufnahmemöglichkeit war die eindeutige Rotfärbung der gram⁻ Bakterien nicht digital festzuhalten. In der gram⁺-Kultur waren ausschließlich blau gefärbte Bakterien sichtbar (siehe Abbildung 56).

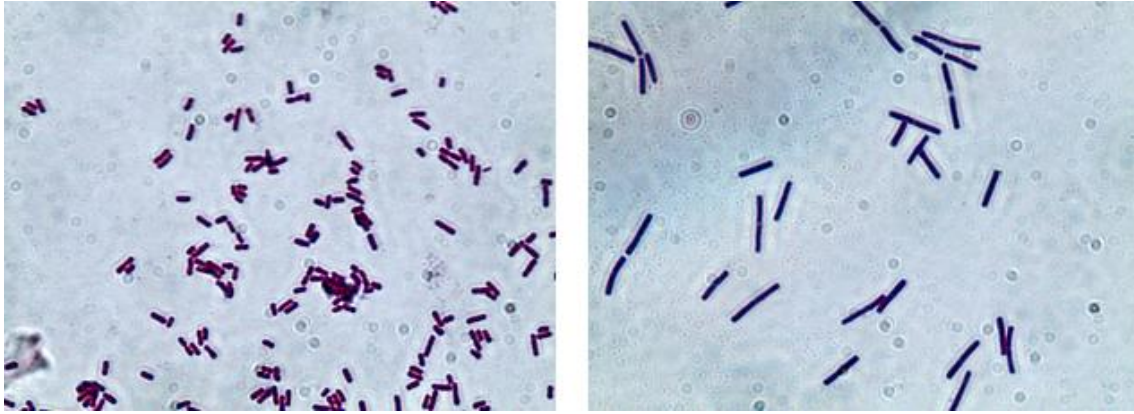


Abbildung 56: Gram-Färbung von *E. coli* (l.) und *B. subtilis* (r.) bei 1000-facher Vergrößerung. Die Bakterien von *E. coli* erscheinen im Vergleich zu *B. subtilis* deutlich kleiner. *B. subtilis* zeigt die typische Kettenbildung.

6.1.7 Massenspektrometrische Analyse der Masse m/z 727

Die in Kapitel 4.4.1 detektierte Masse mit der Größe m/z 727,14 bzw. m/z 725,02 wurde über Tandemmassenspektrometrie analysiert und in kleinere Ionen zerlegt. Die Ionisierung über das Elektronensprayverfahren wurde jeweils positiv (siehe Abbildung 57) als auch negativ (siehe Abbildung 58) durchgeführt. Die Ionen sind in Tabelle 9 aufgeführt.

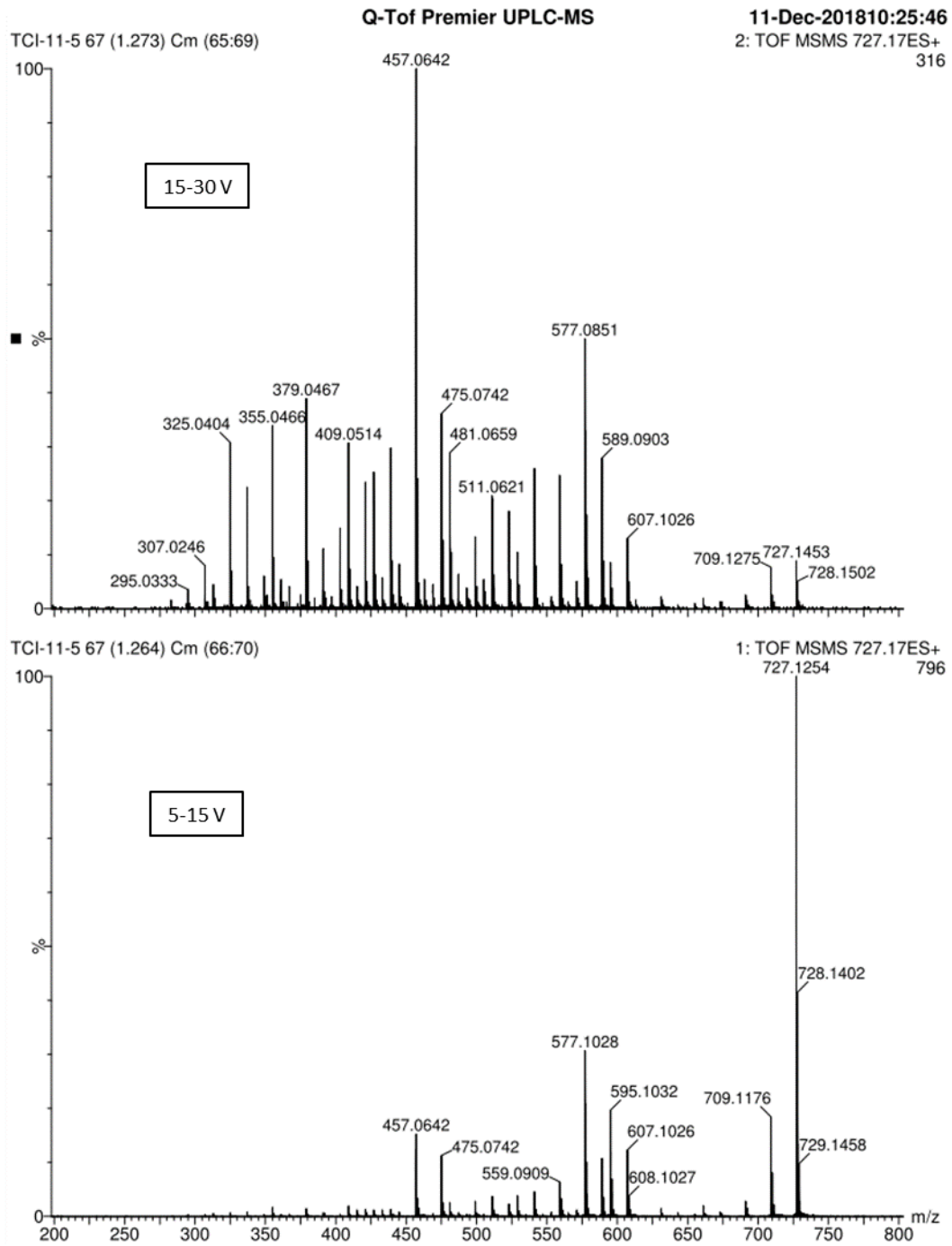


Abbildung 57: Tandem-MS der Masse 727,14 mit ES+ mit unterschiedlichen Beschleunigungen

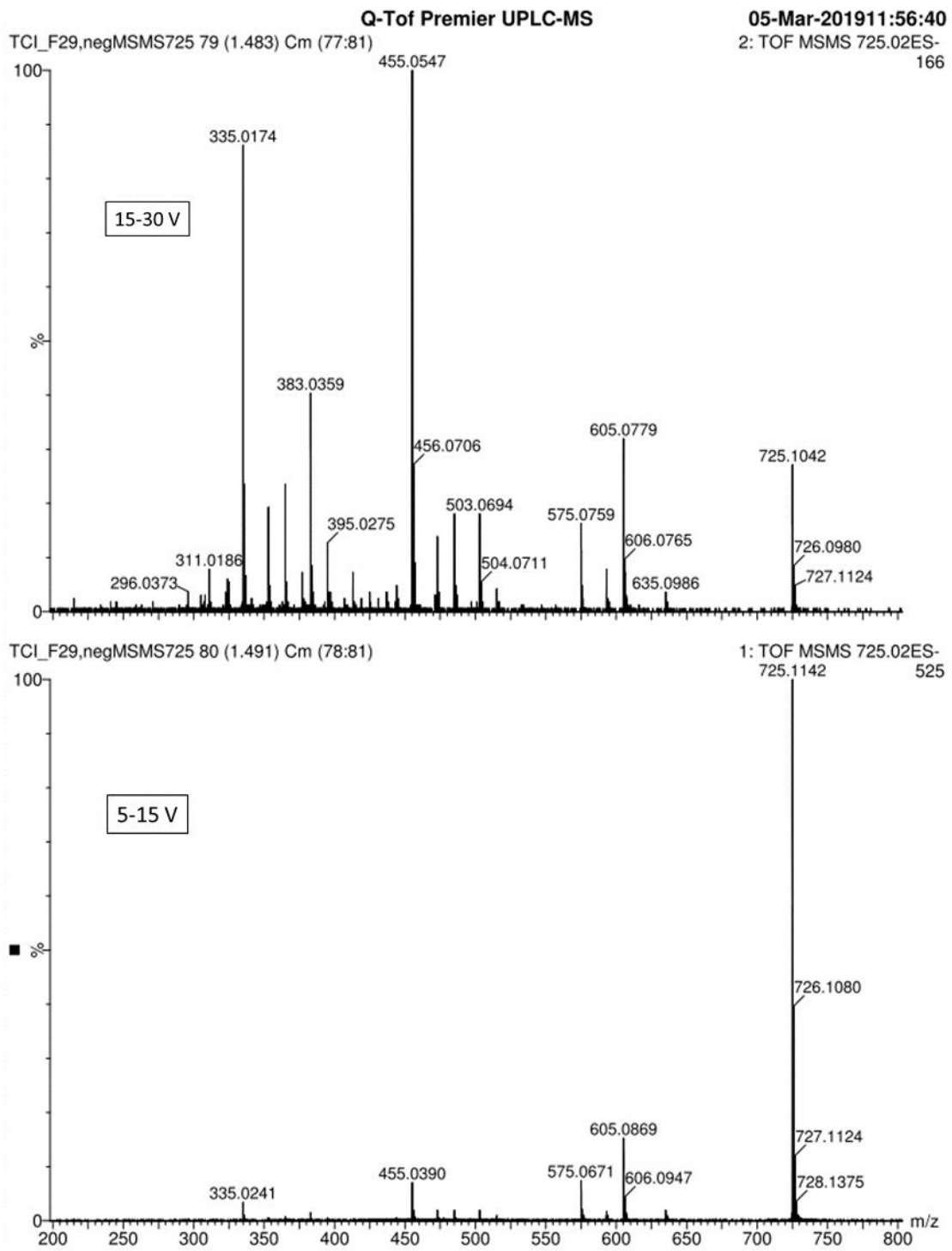


Abbildung 58: Tandem-MS der Masse 725,02 mit ES- unterschiedlichen Beschleunigungen

6.2 Methoden

6.2.1 Verwendete Puffer und Medien

6.2.1.1 Verwendete Puffer

Tris-Puffer

7,9 g Tris-Hydrochlorid
1 L ddH₂O
pH-Wert auf 7,8 einstellen

MES⁺ - Puffer

1,95 g MES
2,92 g NaCl
1,11 g CaCl
0,1 L ddH₂O
pH-Wert auf 7,8 einstellen

6.2.1.2 Verwendete Immobilisierungslösung

Immobilisierungslösung

1 mg Enzym
12,4 mg EDC
4,6 mg NHS
1 mL MES⁺-Puffer
Zuerst EDC und NHS lösen, dann Enzym hinzugeben

6.2.1.3 Verwendete Lösungen zur Messung der Enzymaktivität

BAN - Stammlösung

5 mg Boc-L-Alanin 4 Nitrophenylester
5 mL 80% Acetonitril
Vor Licht schützen und kühlen

BAN - Reaktionslösung

10 mL Tris Puffer
100 µL BAN-Stammlösung

6.2.1.4 Verwendete Eluenten in der Chromatografie

Eluent A	Eluent B
949 mL ddH ₂ O [94,9%]	199 mL ddH ₂ O [19,9%]
50 mL Acetonitril [5%]	800 mL Acetonitril [80%]
1 mL Trifluoressigsäure [0,1%]	1 mL Trifluoressigsäure [0,1%]

Die Eluenten wurden vor ihrer Verwendung in der HPLC/FPLC jeweils 15 Minuten lang im Ultraschallbad entgast.

6.2.1.5 Verwendete Medien

LB-Medium [Miller]
1 L ddH ₂ O
10 g Tryptophan
5 g Hefe
10 g NaCl
[15 g Agar für Platten]

Das LB-Medium wurde für 30 Minuten in einer 1 Liter Schott Flasche dampfdrucksterilisiert.

M9-Minimalmedium	Benötigte Stammlösungen
200 mL M9-Stammlösung	M9 Stammlösung
1 mL Calciumchlorid-Lösung	42,5 g Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O
10 mL Spurenelement-Lösung	15 g KH ₂ PO ₄
1 mL Magnesiumsulfat-Lösung	5,0 g NH ₄ Cl
1 mL Eisenchlorid-Lösung	2,5 g NaCl
15 mL Glucoselösung	Auf 1 Liter mit ddH ₂ O
	pH 7 einstellen
	Spurenelement-Stammlösung
	100 mg MnCl ₂ ·4H ₂ O
	170 mg ZnCl ₂
	43 mg CuCl ₂ ·2H ₂ O
	60 mg CoCl ₂ ·6H ₂ O
	60 mg Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O
	Auf 1 Liter mit ddH ₂ O

Calciumchlorid-Lösung

1,47 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

Auf 100 mL mit ddH₂O

Magnesiumsulfat-Lösung

24,6 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

Auf 100 mL mit ddH₂O

Eisenchlorid-Lösung

1,35 g $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

2,1 g Zitronensäure $\cdot\text{H}_2\text{O}$

Auf 100 mL mit ddH₂O

Glucose-Lösung

200 g $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$

Auf 1 Liter mit ddH₂O

Die benötigten Stammlösungen wurden unter der Sterilbank mit sterilen 0,22 μm PES-Filtern sterilfiltriert und anschließend ebenfalls unter der Sterilbank in oben angegebenen Mengen in eine vorher 30 Minuten lang dampdrucksterilisierte 1 Liter Schott Flasche überführt.

6.2.2 Angewandte Methoden

6.2.2.1 Herstellung der Proteinlösung aus Lupinenprotein

Die Lupinenproteinlösung mit der Ausgangskonzentration 5 g/L wurde wie folgt angesetzt: 826 mg Lupinenproteinpulver wurden in 40 mL TRIS-Puffer mit dem pH 12 in ein 50 mL Falcon gegeben und für 2-3 Stunden bei 8°C geschwenkt. Die Suspension wurde im Anschluss bei 10.000g für eine Stunde zentrifugiert, der Überstand wurde abgenommen und das Pellet verworfen. Der Überstand wurde auf einen pH-Wert von 7,8 eingestellt, bevor die Lösung erneut über Nacht bei 8°C geschwenkt wurde. Nach diesem Schritt wurde erneut bei 10.000g für 1 ½ Stunden zentrifugiert, der Überstand wurde abgenommen und das Pellet verworfen. Anschließend wurde der Überstand durch 0,22 μm PES-Filter filtriert. Die Lupinenproteinlösung wurde im Kühlschrank bei 8°C aufbewahrt und vor jeder Verwendung erneut durch einen 0,22 μm PES-Filter filtriert, um mögliche mit der Zeit gebildete Proteinaggregate zu entfernen.

6.2.2.2 Gefriertrocknung

Die fraktionierten Hydrolysate wurden in 50 mL Falcon-Tubes gepoolt und für mindestens eine Stunde bei -80°C eingefroren. Die detaillierte Betriebsweise findet sich in Kapitel 4.2.3.

6.2.2.3 BCA-Assay

Das BCA- Assay wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Abweichend davon wurde ein Probenvolumen von 12,5 µL und ein Reaktionsansatz von 100 verwendet.

6.2.2.4 SDS-PAGE

Die Gele wurden nach Tabelle 11 angefertigt. Für den Lauf wurde ein BioRad PowerPac Basic Power Supply verwendet. Die Betriebsweise war bei 15 min mit 100V und anschließend 45-60 min bei 150V. Als Marker wurde Pierce Prestained Marker 26619 verwendet. Die Trenn- und Sammelgele wurden wie folgt hergestellt:

Tabelle 11: Zusammensetzung für Trenn- und Sammelgele.

	Trenngel (12%)	Sammelgel (6%)
	1 Gel	1-4 Gele
Polyacrylamid/Bisacrylamid-Mischung (37,5:1), 40%ig	1,5 mL	750 µL
SDS (1%)	0,5 mL	300 µL
Tris/HCl (1,5 M), pH 8,8	1,4 mL	630 µL (pH 6,8)
dd H ₂ O	1,6 mL	3,77 mL
TEMED	10 µL	10 µL
APS (25%)	10 µL	10 µL

Alle Gele wurden mit einer Proteinkonzentration von 1 g/L beladen. Die Färbung erfolgte mit Coomassie R-250.

6.2.2.5 ACE-Assay

Das Hippuryl-Histidyl-L-Leucin wurde in Tris Puffer angesetzt (5mM), das ACE mit einer Konzentration von 60 mU/mL vorbereitet, eine Kalibrierreihe mit 10; 20; 40; 60 mU/mL erstellt und auf Eis gelagert. Die Hippursäure wurde in den Konzentrationen 0,5, 1, 1,5, 2 und 2,5 mM angesetzt. Der Reaktionsansatz bestand aus 90 µL HHL und 10 µL Probe. Die Inkubationszeit betrug 5 min. Anschließend wurden 30 µL ACE-Lösung (60 mU/mL) zugegeben und für 30 min inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 8 µL 5 M HCl gestoppt. Die Reaktionsprodukte wurden mittels RP-HPLC analysiert. Als Eluenten wurden die Eluenten aus 6.2.1.4 verwendet. Als Säule wurde die Zorbax 3,5 µm SB-C8 der Firma Agilent eingesetzt, welche im Säulenofen auf 40°C temperiert war. Die Detektion erfolgte über den DAD-Detektor bei einer Wellenlänge von 228nm.

Tabelle 12: Gradientenprogramm der HPLC für den ACE-Test

Zeit [min]	Anteil A [%]	Anteil B [%]	Flussrate [mL/min]
13	0	100	1,5
13,1	100	0	1,5
17	100	0	1,5

6.2.2.6 ORAC-Assay

Für den Test wurde zuerst eine Trolox-Kalibrationsreihe mit den Konzentrationen 1, 0,5, 0,25 und 0,125 mM angesetzt. Die Peptidproben wurden dann auf eine Konzentration von 200 µg/mL normiert. In eine 96-Well-Fluoroscan-Plate wurden zweimal jeweils 12,5 µL jeder Trolox-Konzentration, des TRIS-Puffers als Referenz sowie der Peptidproben pipettiert. Im Anschluss daran wurde mit einer Multichannel-Pipette zu jedem Well 100 µL einer Fluoresceinlösung (0,15 µM/L) gegeben und dann bei 37°C inkubiert. Nach 20 min Inkubationszeit wurde mit der Multichannel-Pipette in jedes Well 12,5 µL einer AAPH-Lösung (600 mM/L) pipettiert. Die fluorimetrische Messung wurde sofort gestartet. Sie lief insgesamt über einen Zeitraum von 5 h, wobei die Fluoreszenz in einminütigen Intervallen gemessen wurde. Zur Auswertung wurde die jeweilige Fläche unterhalb der Kurve (AUC), welche proportional zur antioxidativen Kapazität ist, mit Hilfe einer trapezoidalen Methode bestimmt. Um den Netto-AUC (NET-AUC) zu bestimmen wurde von den Ausgangs-AUC Werten jeweils der AUC-Wert der TRIS-Referenzprobe subtrahiert. Aus den Netto-AUC Werten der Trolox-Proben sowie der TRIS-Referenzprobe ergab sich die Kalibrationsreihe. Die antioxidative Kapazität der

Peptidproben wurde jeweils in Relation zur antioxidativen Kapazität der Trolox-Probe mit der Konzentration 1 mM/L gesetzt

6.2.2.7 RP-HPLC- Einstellungen

Für die RP-HPLC wurden jeweils 10 µL Probenvolumen appliziert. Die Detektion erfolgte über UV-Vis bei einer Wellenlänge von 214 nm. Die Säulentemperatur betrug 50°C. Verwendet wurden die Eluenten aus 6.2.1.4 Alle weiteren Einstellungen finden sich in Kapitel 4.2.2.

Tabelle 13: Gradientenprogramm der RP-HPLC zur Peptidanalyse

Zeit [min]	Anteil A [%]	Anteil B [%]	Flussrate [mL/min]
0	100	0	0,4
3	90	10	0,4
55	50	50	0,4
60	0	100	0,4
65	0	100	0,4
65,1	100	0	0,4
75	100	0	0,4

Tabelle 14: Zusammensetzung des verwendeten Peptidstandards

Bezeichnung	Peptidsequenz
Gly-Tyr	Gly-Tyr
Val-Tyr-Val	Val-Tyr-Val
Leu enkephalin	Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu
Met enkephalin	Tyr-Gly-Gly-Phe-Met
Angiotensin II	Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe

Geräteverzeichnis

ÄKTA Pure Fast Protein Liquid Chromatograph, GE Healthcare, USA

Biologic QuadTec UV-VIS Detector, BioRad, USA

Chromaster High Performance Liquid Chromatograph 5160, Hitachi, Japan

Fluoreszenzspektrophotometer, F-7000, Hitachi, Japan

Heraeus™ Multifuge™ X3 Universalzentrifuge, Thermo Scientific, USA

Multiskan™ Go Mikrotiterplatten-Spektrophotometer, Thermo Scientific, USA

Wasserbad Julabo TW12, JULABO GmbH, Deutschland

Kontinuierliche Hydrolyse:

Pumpe: ISMATEC® IPC High Precision Multichannel Dispenser, Ismatec, Deutschland

Säulenofen: Säulenofen T-1, TECHLAB GmbH, Deutschland

Gefriertrocknung:

Lyophilie: Alpha 2-4 LSCplus, CHRIST, Deutschland

Vakuumpumpe: vacuubrand® Chemistry Hybrid PumpRC6, Vacuubrand GmbH, Deutschland

High Pressure Liquid Chromatography:

Dioden-Array-Detektor: Hitachi Chromaster 5430, VWR, Deutschland

Pumpe: Hitachi Chromaster 5160, VWR, Deutschland

Autosampler: Hitachi Chromaster 5260, VWR, Deutschland

Säulenofen: Hitachi Chromaster 5310, VWR, Deutschland

Säule für HPLC: Aeris Peptide 3,6 µm XB-C18, Phenomenex, USA

Säule für ACE-Test: Zorbax 3,5 µm SB-C8, Agilent, USA

Fast Protein Liquid Chromatography:

FPLC: ÄKTA Pure, General Electric, USA

Fraktionssammler: F9-C Fraction Collector, General Electric, USA

UV-Detektor: Hitachi UV-Detector L-7400, Merck®, Deutschland

Geräteverzeichnis

Säule für FPLC: Aeris Peptide 5 µm XB-C18 LC column, Phenomenex, USA

Massenspektrometrie/Ultra Performance Liquid Chromatography:

UPLC: ACQUITY UPLC M-Class System, Waters, USA

Fraktionierung: 2695 Separation Module Waters, USA
Quattro micro API MS Waters, USA

Säule: Aeris Peptide XB-C18 1,7 µm, Phenomenex, USA

Q-TOF-MS: Xevo G2-XS QTOF, Waters, USA

H-NMR: Ascend 400, Bruker, USA

Zentrifugen:

Tischzentrifuge: HERAEUS PICO 21, Thermo Scientific®, USA

Standzentrifuge: Multifuge X3 FR, Thermo Scientific®, USA

Mikroplatten-Spektrophotometer:

Multiskan GO, Thermo Scientific®, USA

Küvetten-Spektrophotometer:

Libra, Biochrom®, Deutschland

Fluoreszenzspektrometer:

F-7000, Hitachi, Japan

Waagen:

Analysewaage: MC1 Analytic AC 2105, Sartorius®, Deutschland

Digitalwaage: CP8201, Sartorius®, Deutschland

Ultraschallbad:

Sonorex Super RK 510H Bandelin, Deutschland

Wasser-Ultrafiltrationsanlage:

arium® Pro, Sartorius®, Deutschland

Thermomixer:

Thermomixer comfort, Eppendorf®, Deutschland

Brutschrank:

Geräteverzeichnis

BE200, Memmert, Deutschland

Inkubationsschüttler:

innova® 44 Incubator Shaker Series, New Brunswick Scientific, USA

Certomat® BS-1, Sartorius® stedim biotech, Deutschland

Cleanbench:

HeraSafe®, Thermo Scientific®, USA

Chemikalienverzeichnis

Proteine

Lupinenprotein aus Süßlupinensamen - VEGJi plant based nutrition, Deutschland

Hanfprotein - VEGJi plant based nutrition, Deutschland

Erbsenprotein - VEGJi plant based nutrition, Deutschland

Reisprotein - VEGJi plant based nutrition, Deutschland

Kürbiskernprotein - VEGJi plant based nutrition, Deutschland

Mandelprotein - VEGJi plant based nutrition, Deutschland

Sonnenblumenprotein - VEGJi plant based nutrition, Deutschland

Macapulver - VEGJi plant based nutrition, Deutschland

Gerstengraspulver - VEGJi plant based nutrition, Deutschland

Casein – Serva Electrophoresis GmbH, Deutschland

Enzyme

Enzym	E.C. Nummer	Spez. Aktivität (U/mg)	Hersteller
α -Chymotrypsin B	3.4.21.1	40	Sigma Aldrich, USA
Trypsin	3.4.21.4	40	Sigma Aldrich, USA
Alcalase® 2.5 FG	3.4.21.62	1375*	Novozymes, Dänemark
Subtilisin A	3.4.21.62	7-15	Sigma Aldrich, USA
ACE (from Rabbit Lung)	3.4.15.1		Sigma Aldrich, USA

Feinchemikalien

Pefabloc® SC, analytical standard - Sigma Aldrich, USA

Chemikalien:

(±)-6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-Carbonsäure - Sigma Aldrich, USA

2,2'-Azobis(2-methyl-propionamidin)-dihydrochlorid - Sigma Aldrich, USA

Acetonitril HPLC gradient grade - VWR/BDH Chemicals, Deutschland

Agar-Agar, Kobe I, pulverisiert, für die Mikrobiologie - Carl Roth®, Deutschland

Boc-L-alanine 4-nitrophenyl ester - Sigma Aldrich®, USA

Chemikalienverzeichnis

CaCl₂ - Carl Roth®, Deutschland

Captopril, meets USP testing specifications - Sigma Aldrich®, USA

Citronensäure·H₂O zur Analyse - Sigma Aldrich®, USA

CoCl₂·6H₂O - Sigma Aldrich®, USA

CuCl₂·2H₂O - Fluka, USA

D(+)-Glucose·H₂O - Carl Roth®, Deutschland

FeCl₃ - Merck®, Deutschland

Fluorescein, free acid - Sigma® Life Science, USA

Hefeextrakt mikro-granuliert für die Bakteriologie - Carl Roth®, Deutschland

HPLC peptide standard mixture, analytical standard - Sigma Aldrich®, USA

KH₂PO₄ - Carl Roth®, Deutschland

Lactoferricin B (bovine) trifluoroacetate salt - Bachem®, Schweiz

Life Science - Hippursäure, 98% - Sigma®, USA

MES anhydrous - PanReac / AppliChem® - ITW reagents, Deutschland

MgSO₄ zur Analyse - AppliChem / BioChemica

MnCl₂·4H₂O - Fluka, USA

N-3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimid - Fluka® Analytical

Na₂HPO₄·2H₂O - Riedel de Haën, Deutschland

Na₂MoO₄·2H₂O - Fluka, USA

NaCl technisch - VWR chemicals, Deutschland

NH₄Cl - Fluka, USA

N-Hippuryl-His-Leu hydrate - Sigma® Life Science, USA

N-Hydroxysuccinamid - Sigma® Chemistry, USA

Pre-diluted Protein assay standards (Bovine serum albumin) - Thermo Scientific® protein biology, USA

Trifluoressigsäure, Reinheit ≥ 99,9% zur Peptidsynthese - Carl Roth®, Deutschland

Tris-hydrochloride PUFFERAN® - Carl Roth®, Deutschland

Trypton/Pepton aus Casein, pankreatisch verdaut, für die Mikrobiologie - Carl Roth®, Deutschland

Chemikalienverzeichnis

ZnCl₂ reagent grade ≥98% - Sigma Aldrich®, USA

Kits:

Pierce™ BCA Protein Assay Kit - Thermo Scientific® protein biology, USA

Stämme und Zelllinien:

Bacillus subtilis wild-type

Escherichia coli K1

A549 Adenokarzinom-Zelllinie

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Wirkungsweisen von bioaktiven Peptiden	3
Abbildung 2: Enzymatische Herstellung und Screening von bioaktiven Peptiden.....	6
Abbildung 3: Prinzip der ORAC Messung.....	10
Abbildung 4: Blutdruckregulierung über das RAAS	10
Abbildung 5: Aufbau von Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien.....	11
Abbildung 6: Unterschiedliche Zellmembraninteraktionen von antimikrobiellen Peptiden.....	13
Abbildung 7: <i>Lupinus angustifolius</i>	16
Abbildung 8: Katalytische Triade einer Protease	18
Abbildung 9: Enzymimmobilisierung des Kapillarreaktorsystems	20
Abbildung 10: Modell der Durchflussbiokatalyse[116].....	22
Abbildung 11: MS-Peptid-Sequenzierung.....	24
Abbildung 12: Aufbau des Einzelkapillarmoduls	26
Abbildung 13: Vergleich des Immobilisierungsmodus	28
Abbildung 14: Coomassie gefärbte und gespülte Kapillaren.....	28
Abbildung 15: Auswascheffekte unterschiedlicher Immobilisierungsarten.....	29
Abbildung 16: Reproduzierbarkeit der Kapillaraktivität.....	29
Abbildung 17: Vergleich des Substratumsatzes.....	30
Abbildung 18: Flussraten-abhängige Produktbildung	31
Abbildung 19: Flussraten-abhängige Hydrolyse des Lupinenproteins.....	32
Abbildung 20: Vergleich der biokatalytischen Umsetzung verschiedener Substrate.	33
Abbildung 21: Batch-Verdau Vergleich der Proteasen (RP-HPLC).....	34
Abbildung 22: Batch-Verdau Vergleich der Proteasen (SDS-PAGE).....	35
Abbildung 23: Vergleich des Peptidfingerprints aus Batch-und Kontinuierlicher Hydrolyse (RP-HPLC).....	36
Abbildung 24: Löslichkeitstest der Proteinquellen (SDS-PAGE).	38
Abbildung 25: Kontinuierliche Hydrolyse verschiedener Proteinfeeds und Flussraten (SDS-PAGE).....	39
Abbildung 26: Flussraten-abhängige Peptidbildung verschiedener Proteinlösungen (RP-HPLC).....	41
Abbildung 27: Prototyp eines Multikapillarmoduls	42
Abbildung 28: Optimierung der Temperatur (RP-HPLC).....	46
Abbildung 29: Optimierung der Flussrate (RP-HPLC).	47
Abbildung 30: Optimierung der Flussrate bei verschiedenen Temperaturen für das Lupinenproteinhydrolysat (RP-HPLC).....	48
Abbildung 31: Vergleich der Chromatogramme nach dem Scale-Up.	50
Abbildung 32: Fraktionierung 1 des Lupinenproteinhydrolysats (FPLC)	54
Abbildung 33: Fraktionierung 2 des Lupinenproteinhydrolysats (FPLC).	55
Abbildung 34: Antioxidative Kapazität des Lupinenproteinhydrolysats Fraktionierung 1.	56
Abbildung 35: Antioxidative Kapazität des Lupinenproteinhydrolysats Fraktionierung 2	57
Abbildung 36: Antioxidative Kapazität des Lupinenproteinhydrolysats nach Feinfraktionierung	58
Abbildung 37: Antihypertensive Eigenschaften des Lupinenproteinhydrolysats Fraktionierung 1.....	59

Abbildung 38: Antihypertensive Eigenschaften des Lupinenproteinhydrolysats Fraktionierung 2.....	60
Abbildung 39: Antihypertensive Eigenschaften des Lupinenproteinhydrolysats Feinfraktionierung.	61
Abbildung 40: Hemmhoftest bei <i>E. coli</i> und <i>B. subtilis</i>	62
Abbildung 41: Wachstumskurven von <i>E. coli</i> in der Microbroth-Kultivierung.....	64
Abbildung 42: Wachstumskurven von <i>B. subtilis</i> in der Microbroth-Kultivierung.	65
Abbildung 43: CTB-Test der antikanzerogenen Peptide	67
Abbildung 44: ESI-Q-TOF-MS Aufbau.....	70
Abbildung 45: UHPLC-Q-TOF-MS der Lupinenhydrolysatfraktionen	73
Abbildung 46: UPLC-Fraktionierung der Peptidfraktionen	75
Abbildung 47: Prinzip der Peptidfragmentierung	76
Abbildung 48: Molekulare Struktur des Apigenin 6,8-di-C-glucosid-7-O-apiofuranosid	77
Abbildung 49: Vergleich der Substrate für die Messung der Enzymaktivität.....	82
Abbildung 50: Verweilzeit von Nitrophenol im Kapillarmodul.....	83
Abbildung 51: Proteingehalt des Immobilisierungsansatzes der APTES Kapillaren.....	84
Abbildung 52: Beladungskapazität ZrO ₂	85
Abbildung 53: Peptidkonzentration der Fraktionierung 1.....	86
Abbildung 54: Peptidkonzentration der Fraktionierung 2.....	86
Abbildung 55: Peptidkonzentration der Feinfraktionierung.....	86
Abbildung 56: Gram-Färbung von <i>E. coli</i> (l.) und <i>B. subtilis</i> (r.)	88
Abbildung 57: Tandem-MS der Masse 727,14 mit ES+ mit unterschiedlichen Beschleunigungen.....	89
Abbildung 58: Tandem-MS der Masse 725,02 mit ES- unterschiedlichen Beschleunigungen	90

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Bioaktive Peptide unterschiedlichen Ursprungs und ihre Funktion	4
Tabelle 2: Bioaktive Peptide in kommerziellen Produkten (Modifiziert nach [45])	8
Tabelle 3: Hauptbestandteile des Conglutins in <i>L. angustifolius</i> L [103], [100]	17
Tabelle 4: In dieser Arbeit verwendete Proteasen	18
Tabelle 5: Löslichkeit von Proteinpulver	37
Tabelle 6: Kalkulierte und praktische Scale-Up Werte	49
Tabelle 7: Lyophilisationsprogramm für Peptide	51
Tabelle 8: Peptidabgleich der detektierten Massen aus dem <i>in silico</i> Verdau des Lupinenproteins	74
Tabelle 9: Massenspektrometrische Analyse des Flavonoids über UHPLC-Q-TOF-MS	77
Tabelle 10: Fraktionierungsschema für Lupinenhydrolysat	87
Tabelle 11: Zusammensetzung für Trenn- und Sammelgele.	94
Tabelle 12: Gradientenprogramm der HPLC für den ACE-Test	95
Tabelle 13: Gradientenprogramm der RP-HPLC zur Peptidanalyse	96
Tabelle 14: Zusammensetzung des verwendeten Peptidstandards	96

Literaturverzeichnis

- [1] Lau, J. L., Dunn, M. K. (2018). Therapeutic peptides: Historical perspectives, current development trends, and future directions. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 26(10), 2700-2707.
- [2] SpirPep Database: <http://spirppepapp.sbi.kmutt.ac.th> Abgerufen am 23.01.19
- [3] Ludwig August Kraus *Kritisch etymologisches medizinisches Lexikon Band 1*, 1831
- [4] Daliri, E., Oh, D., Lee, B. (2017). Bioactive peptides. *Foods*, 6(5), 32.
- [5] Korhonen, H., Pihlanto, A. (2006). Bioactive peptides: production and functionality. *International dairy journal*, 16(9), 945-960.
- [6] Brantl, V., Teschemacher, H., Henschen, A., Lottspeich, F. (1979). Novel opioid peptides derived from casein (β -casomorphins). I. Isolation from bovine casein peptone. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für Physiologische Chemie*, 360(2), 1211-1224
- [7] Yoshikawa, M., Kishi, K., Takahashi, M., Watanabe, A., Miyamura, T., Yamazaki, M., Chiba, H. (1993). Immunostimulating peptide derived from soybean protein. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 685(1), 375-376.
- [8] Matthies, H., Stark, H. and Hartrodt, B. (1984) Derivatives of β -casomorphins with high analgesic potency. *Peptides* 5, 463-470.
- [9] Meisel, H., Goepfert, A. and Gunther, S. (1997) Occurrence of ACE Inhibitory Peptides in milk products. *Milchwissenschaft* 52, 307-311
- [10] Zucht, H. D., Raida, M., Adermann, K., Mägert, H. J., Forssmann, W. G. (1995). Casocidin-I: a casein- α 2 derived peptide exhibits antibacterial activity. *FEBS letters*, 372(2-3), 185-188
- [11] Nishi, T., Hara, H. & Tomita, F. (2003) Soybean β -conglycinin peptone suppresses food intake and gastric emptying by increasing plasma cholecystokinin levels in rats. *J. Nutr.* 133:352-357.

- [12] Nielsen, S. D., Beverly, R. L., Qu, Y., Dallas, D. C. (2017). Milk bioactive peptide database: A comprehensive database of milk protein-derived bioactive peptides and novel visualization. *Food Chemistry*, 232, 673-682.
- [13] Markwardt, F. (1970). [69] Hirudin as an inhibitor of thrombin. In *Methods in enzymology* (Vol. 19, pp. 924-932). Academic Press.
- [14] Ferreira, S. H., Bartelt, D. C., Greene, L. J. (1970). Isolation of bradykinin-potentiating peptides from *Bothrops jararaca* venom. *Biochemistry*, 9(13), 2583-2593.
- [15] Kirkpatrick, C. L., Parsley, N. C., Bartges, T. E., Wing, C. E., Kommineni, S., Kristich, C. J., ... Hicks, L. M. (2018). Exploring bioactive peptides from bacterial secretomes using Pep SAVI-MS: identification and characterization of Bac-21 from *Enterococcus faecalis* pPD 1. *Microbial biotechnology*, 11(5), 943-951.
- [16] Rozek T, Wegener KL, Bowie JH, Olver IN, Carver JA, Wallace JC, Tyler MJ. 2000 *Eur J Biochem*. 2000 Sep;267(17):5330-41. PubMed.
- [17] Cheung, R., Ng, T., Wong, J. (2015). Marine peptides: Bioactivities and applications. *Marine drugs*, 13(7), 4006-4043.
- [18] Talpir, R., Benayahu, Y., Kashman, Y., Pannell, L., Schleyer, M. (1994). Hemiasterlin and geodiamolide TA; two new cytotoxic peptides from the marine sponge *Hemiasterella minor* (Kirkpatrick). *Tetrahedron Letters*, 35(25), 4453-4456.
- [19] Maeno, M., Yamamoto, N., Takano, T. (1996). Identification of an antihypertensive peptide from casein hydrolysate produced by a proteinase from *Lactobacillus helveticus* CP790. *Journal of Dairy Science*, 79(8), 1316-1321.
- [20] Xu, X.; Gao, Y. Purification and identification of angiotensin I-converting enzyme-inhibitory peptides from apalbumin 2 during simulated gastrointestinal digestion. *J. Sci. Food Agric*. 2015, 95, 906–914.
- [21] Silva-Sánchez, C., De La Rosa, A. B., León-Galván, M. F., De Lumen, B. O., de León-Rodríguez, A., De Mejía, E. G. (2008). Bioactive peptides in amaranth (*Amaranthus*

- hypochondriacus) seed. *Journal of agricultural and food chemistry*, 56(4), 1233-1240.
- [22] Chen, H. M., Muramoto, K., Yamauchi, F. (1995). Structural analysis of antioxidative peptides from Soybean. beta.-Conglycinin. *Journal of agricultural and food chemistry*, 43(3), 574-578.
- [23] Kandarakis, E. D., Iriuchijima, T., Prasad, C., Wilber, J. F. (1985). Distribution and characterization of cyclo (His-Pro)-like immuno-reactivity in the human gastrointestinal tract. *Neuropeptides*, 6(1), 21-25.
- [24] Waghu FH, Barai RS, Gurung P, Idicula-Thomas S. CAMPR3: a database on sequences, structures and signatures of antimicrobial peptides. *Nucleic Acids Res.* 2015: gkv1051v1-gkv1051. Epub 2015 Oct 13. PubMed PMID: 26467475.
- [25] Astwood, J. D., Leach, J. N., Fuchs, R. L. (1996). Stability of food allergens to digestion in vitro. *Nature biotechnology*, 14(10), 1269.
- [26] Agyei, D., Danquah, M. K. (2011). Industrial-scale manufacturing of pharmaceutical-grade bioactive peptides. *Biotechnology advances*, 29(3), 272-277.
- [27] Godfrey T, Reichelt J (1982) *Industrial enzymology: the application of enzymes in industry*. Nature Press, New York
- [28] Pritchard, S. R., Phillips, M., Kailasapathy, K. (2010). Identification of bioactive peptides in commercial Cheddar cheese. *Food research international*, 43(5), 1545-1548.
- [29] Donkor, O. N., Henriksson, A., Singh, T. K., Vasiljevic, T., Shah, N. P. (2007). ACE-inhibitory activity of probiotic yoghurt. *International dairy journal*, 17(11), 1321-1331
- [30] Nakamura, Y., Yamamoto, M., Sakai, K., Okubo, A., Yamazaki, S., Takano, T. (1995). Purification and characterization of angiotensin I converting enzyme inhibitors from sour milk. *Journal of Dairy Science*, 78, 777-783.

- [31] Ummadi, M. S., Curic-Bawden, M. (2008). Use of protein hydrolysates in industrial starter culture fermentations. In *Protein hydrolysates in biotechnology* (pp. 91-114). Springer, Dordrecht.
- [32] Yasuda, M. (2011). Fermented tofu, tofuyo. In *Soybean-Biochemistry, Chemistry and Physiology*. IntechOpen.
- [33] Kannan, A., Hettiarachchy, N. S., Lay, J. O., Liyanage, R. (2010). Human cancer cell proliferation inhibition by a pentapeptide isolated and characterized from rice bran. *Peptides*, 31(9), 1629-1634.
- [34] Harnedy, P. A., FitzGerald, R. J. (2012). Bioactive peptides from marine processing waste and shellfish: A review. *Journal of functional foods*, 4(1), 6-24.
- [35] Fontoura, R., Daroit, D. J., Correa, A. P., Meira, S. M., Mosquera, M., Brandelli, A. (2014). Production of feather hydrolysates with antioxidant, angiotensin-I converting enzyme-and dipeptidyl peptidase-IV-inhibitory activities. *New biotechnology*, 31(5), 506-513.
- [36] Przybylski, R., Firdaus, L., Châtaigné, G., Dhulster, P., Nedjar, N. (2016). Production of an antimicrobial peptide derived from slaughterhouse by-product and its potential application on meat as preservative. *Food chemistry*, 211, 306-313.
- [37] Bellisle, F., Diplock, A. T., Hornstra, G., Koletzko, B., Roberfroid, M., Salminen, S., Saris, W. H. M. (1998). *British Journal of Nutrition Volume 80 Supplement Number 1 August 1998: Functional Food Science in Europe*. British Journal of Nutrition (United Kingdom).
- [38] Maeda-Yamamoto, M. (2017). Development of functional agricultural products and use of a new health claim system in Japan. *Trends in food science & technology*, 69, 324-332.
- [39] Kaur, N., Singh, D. P. (2017). Deciphering the consumer behaviour facets of functional foods: A literature review. *Appetite*, 112, 167-187.
- [40] Korhonen, H. (2009). Milk-derived bioactive peptides: From science to applications. *Journal of functional foods*, 1(2), 177-187.

- [41] Park, Y. W., Haenlein, G. F., Ag, D. S. (2013). Milk and dairy products in human nutrition. Production, Composition and Health. Ed. Wiley-Blackwell. A John Wiley&Sons, Ltd, Publication, 700.
- [42] Lafarga, T., Hayes, M. (2014). Bioactive peptides from meat muscle and by-products: generation, functionality and application as functional ingredients. *Meat science*, 98(2), 227-239.
- [43] Lafarga, T., Hayes, M. (2017). Bioactive protein hydrolysates in the functional food ingredient industry: Overcoming current challenges. *Food Reviews International*, 33(3), 217-246.
- [44] Le Gouic, A. V., Harnedy, P. A., FitzGerald, R. J. (2019). Bioactive peptides from fish protein by-products. *Bioactive Molecules in Food*, 355-388.
- [45] Hayes, M., Tiwari, B. (2015). Bioactive carbohydrates and peptides in foods: An overview of sources, downstream processing steps and associated bioactivities. *International journal of molecular sciences*, 16(9), 22485-22508.
- [46] Smith, M. E., van der Maesen, K., Somera, F. P. (1998). Macrophage and microglial responses to cytokines in vitro: phagocytic activity, proteolytic enzyme release, and free radical production. *Journal of neuroscience research*, 54(1), 68-78.
- [47] Harman, D. (2002). Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *Science's SAGE KE*, 2002(37), 14.
- [48] Finkel, T., Holbrook, N. J. (2000). Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *nature*, 408(6809), 239.
- [49] Gough, D. R., Cotter, T. G. (2011). Hydrogen peroxide: a Jekyll and Hyde signalling molecule. *Cell death & disease*, 2(10), e213.
- [50] Ristow, M. (2014). Unraveling the truth about antioxidants: mitohormesis explains ROS-induced health benefits. *Nature medicine*, 20(7), 709.
- [51] Schieber, M., Chandel, N. S. (2014). ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Current biology*, 24(10), R453-R462.

- [52] Hertog, M. G., Feskens, E. J., Kromhout, D., Hollman, P. C. H., Katan, M. B. (1993). Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *The lancet*, 342(8878), 1007-1011.
- [53] Lorenzo, J. M., Munekata, P. E., Gomez, B., Barba, F. J., Mora, L., Perez-Santaescolastica, C., Toldra, F. (2018). Bioactive peptides as natural antioxidants in food products–A review. *Trends in food science & technology*, 79, 136-147.
- [54] Ou, B., Hampsch-Woodill, M., Prior, R. L. (2001). Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *Journal of agricultural and food chemistry*, 49(10), 4619-4626.
- [55] Oparil, S., Haber, E. (1974). The renin-angiotensin system. *New England Journal of Medicine*, 291(8), 389-401.
- [56] <https://www.repetico.de/card-51274122> Abgerufen am 17.04
- [57] Vrieling, A., Obel-Jorgensen, A., Coddling, P. W. (1996). Hippuryl-l-histidyl-l-leucine, a Substrate for Angiotensin Converting Enzyme. *Acta Crystallographica Section C: Crystal Structure Communications*, 52(5), 1300-1302.
- [58] Schleifer, K. H., Kandler, O. (1972). Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. *Bacteriological reviews*, 36(4), 407.
- [59] Silhavy, T. J., Kahne, D., Walker, S. (2010). The bacterial cell envelope. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 2(5), a000414.
- [60] Li, J., Koh, J. J., Liu, S., Lakshminarayanan, R., Verma, C. S., Beuerman, R. W. (2017). Membrane active antimicrobial peptides: translating mechanistic insights to design. *Frontiers in neuroscience*, 11, 73.
- [61] Schwechheimer, C., Kuehn, M. J. (2015). Outer-membrane vesicles from Gram-negative bacteria: biogenesis and functions. *Nature reviews microbiology*, 13(10), 605.
- [62] Bertelsen, K., Dorosz, J., Hansen, S. K., Nielsen, N. C., Vosegaard, T. (2012). Mechanisms of peptide-induced pore formation in lipid bilayers investigated by oriented ³¹P solid-state NMR spectroscopy. *PLoS One*, 7(10), e47745.

- [63] Fernandez, D. I., Le Brun, A. P., Whitwell, T. C., Sani, M.-A., James, M., and Separovic, F. (2012). The antimicrobial peptide aurein 1.2 disrupts model membranes via the carpet mechanism. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 14, 15739–15751.
- [64] Bahar, A., Ren, D. (2013). Antimicrobial peptides. *Pharmaceuticals*, 6(12), 1543-1575.
- [65] Le, C. F., Fang, C. M., Sekaran, S. D. (2017). Intracellular targeting mechanisms by antimicrobial peptides. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 61(4), e02340-16.
- [66] Park, C. B., Kim, M. S., Kim, S. C. (1996). A novel antimicrobial peptide from *Bufo bufo gargarizans*. *Biochemical and biophysical research communications*, 218(1), 408-413.
- [67] Giuliani, A., Pirri, G., Nicoletto, S. (2007). Antimicrobial peptides: an overview of a promising class of therapeutics. *Open Life Sciences*, 2(1), 1-33.
- [68] Hancock, R. E., Diamond, G. (2000). The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defences. *Trends in microbiology*, 8(9), 402-410.
- [69] Chia, T. J., Wu, Y. C., Chen, J. Y., Chi, S. C. (2010). Antimicrobial peptides (AMP) with antiviral activity against fish nodavirus. *Fish & Shellfish Immunology*, 28(3), 434-439.
- [70] Nizet, V. (2006). Antimicrobial peptide resistance mechanisms of human bacterial pathogens. *Current issues in molecular biology*, 8(1), 11.
- [71] Poole, K. (2007). Efflux pumps as antimicrobial resistance mechanisms. *Annals of medicine*, 39(3), 162-176.
- [72] Atkinson, M. J., Hesch, R. D. (1985). *Peptide hormones as mediators in immunology and oncology*. Raven Press.
- [73] Ohsaki, Y., Gazdar, A. F., Chen, H. C., Johnson, B. E. (1992). Antitumor activity of magainin analogues against human lung cancer cell lines. *Cancer research*, 52(13), 3534-3538.

- [74] Papo, N., Braunstein, A., Eshhar, Z., Shai, Y. (2004). Suppression of human prostate tumor growth in mice by a cytolytic d-, l-amino acid peptide: membrane lysis, increased necrosis, and inhibition of prostate-specific antigen secretion. *Cancer research*, 64(16), 5779-5786.
- [75] Gaspar, D., Veiga, A. S., Castanho, M. A. (2013). From antimicrobial to anticancer peptides. A review. *Frontiers in microbiology*, 4, 294.
- [76] <https://www.gminsights.com/industry-analysis/protein-hydrolysate-market>
Abgerufen am 29.05.19
- [77] Müller, K., Eisner, P., Schott, M., Bez, J., Bader, S., Hasenkopf, K., Frankl, M. (2012). U.S. Patent No. 8,309,160. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- [78] <https://veganfitness.de> Abgerufen am 26.05.19
- [79] Fan, T. Y., Sosulski, F. W. (1974). Dispersibility and isolation of proteins from legume flours. *Canadian Institute of Food Science and Technology Journal*, 7(4), 256-259.
- [80] Wäsche, A., Müller, K., Knauf, U. (2001). New processing of lupin protein isolates and functional properties. *Food/Nahrung*, 45(6), 393-395
- [81] D'Agostina, A., Antonioni, C., Resta, D., Arnoldi, A., Bez, J., Knauf, U., Wäsche, A. (2006). Optimization of a pilot-scale process for producing lupin protein isolates with valuable technological properties and minimum thermal damage. *Journal of agricultural and food chemistry*, 54(1), 92-98.
- [82] Belitz, H.-D., Grosch, W., Schieberle, P. (2009) *Food Chemistry*. 4th edition. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- [83] Ruiz Jr, L. P., Hove, E. L. (1976). Conditions affecting production of a protein isolate from lupin seed kernels. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 27(7), 667-674.
- [84] Chew, P. G., Casey, A. J., Johnson, S. K. (2003). Protein quality and physico-functionality of Australian sweet lupin (*Lupinus angustifolius* cv. Gungurru)

- protein concentrates prepared by isoelectric precipitation or ultrafiltration. *Food chemistry*, 83(4), 575-583.
- [85] Melander, W., Horváth, C. (1977). Salt effects on hydrophobic interactions in precipitation and chromatography of proteins: an interpretation of the lyotropic series. *Archives of biochemistry and biophysics*, 183(1), 200-215.
- [86] Sussmann, D., Pickardt, C., Schweiggert, U., Eisner, P. (2013). Influence of different processing parameters on the isolation of lupin (*Lupinus angustifolius* L.) protein isolates: a preliminary study. *Journal of Food Process Engineering*, 36(1), 18-28.
- [87] Arts, M. J., Haenen, G. R., Wilms, L. C., Beetstra, S. A., Heijnen, C. G., Voss, H. P., Bast, A. (2002). Interactions between flavonoids and proteins: effect on the total antioxidant capacity. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50(5), 1184-1187.
- [88] Sun, X., Engstrom, M. T., Salminen, J. P., Hagerman, A. E. (2017). Polyphenol Antioxidants Bind Irreversibly to Protein Under Oxidative Conditions. *The FASEB Journal*, 31(1_supplement), 646-9.
- [89] https://www.bundessortenamt.de/bsa/media/Files/Saatgut/P1_mErfbes_LW_Art_20181119.pdf
- [90] Lucas, M. M., Stoddard, F. L., Annicchiarico, P., Frias, J., Martinez-Villaluenga, C., Sussmann, D., Pueyo, J. J. (2015). The future of lupin as a protein crop in Europe. *Frontiers in plant science*, 6, 705
- [91] Fischer, K., Roux, S., Jürgens, H. U., Ruge-Wehling, B. (2018). LupiBreed-Erhöhung der Ertragsstabilität und Ertragsleistung der Süßlupine zur Sicherung der einheimischen Eiweißversorgung (Teilprojekt JKI-Entwicklung von Prebreeding-Linien für die Sortenzüchtung).
- [92] <https://www.agric.wa.gov.au/lupins/lupin-western-australian-farming>
Abgerufen am 23.05.19
- [93] <https://www.moz.de/nachrichten/brandenburg/artikel-ansicht/dg/0/1/1526952/> Abgerufen am 23.05

- [94] <https://www.theantiquarium.com/item/003211/pierre-joseph-buchoz-geranatium> Abgerufen am 23.05.19
- [95] de Boer, J., Helms, M., Aiking, H. (2006). Protein consumption and sustainability: diet diversity in EU-15. *Ecological Economics*, 59(3), 267-274.
- [96] Awad, R. A., Salama, W. M., Farahat, A. M. (2014). Effect of lupine as cheese base substitution on technological and nutritional properties of processed cheese analogue. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*, 13(1), 55-64.
- [97] Hove, E. L. (1974). Composition and protein quality of sweet lupin seed. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 25(7), 851-859.
- [98] Sujak, A., Kotlarz, A., Strobel, W. (2006). Compositional and nutritional evaluation of several lupin seeds. *Food chemistry*, 98(4), 711-719.
- [99] T. Osborne: *The Vegetable Proteins*. [129]In: Longmans, Green and Co., 2.Auflage (1924)
- [100] Duranti, M., Consonni, A., Magni, C., Sessa, F., Scarafoni, A. (2008). The major proteins of lupin seed: characterisation and molecular properties for use as functional and nutraceutical ingredients. *Trends in Food Science & Technology*, 19(12), 624-633.
- [101] Shewry, P. R., Casey, R. (1999). Seed proteins. In *Seed proteins* (pp. 1-10). Springer, Dordrecht.
- [102] Blagrove, R., Gillespie, J.: Isolation, Purification and Characterization of the Seed Globulins of *Lupinus angustifolius*. In: *Aust J Plant Physio.* 2, S.13 (1975)
- [103] Muranyi, I. S., Volke, D., Hoffmann, R., Eisner, P., Herfellner, T., Brunnbauer, M., ... Schweiggert-Weisz, U. (2016). Protein distribution in lupin protein isolates from *Lupinus angustifolius* L. prepared by various isolation techniques. *Food chemistry*, 207, 6-15.
- [104] Czubinski, J., Feder, S. (2019). Lupin seeds storage protein composition and their interactions with native flavonoids. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 99(8), 4011-4018.

- [105] Czubinski, J., Dwiecki, K., Siger, A., Kachlicki, P., Neunert, G., Lampart-Szczapa, E., Nogala-Kalucka, M. (2012). Release of flavonoids from lupin globulin proteins during digestion in a model system. *Journal of agricultural and food chemistry*, 60(7), 1830-1836. *od Science and Technology Journal*, 7(4), 256-259.
- [106] Boschini, G., Scigliuolo, G. M., Resta, D., Arnoldi, A. (2014). Optimization of the enzymatic hydrolysis of lupin (*Lupinus*) proteins for producing ACE-inhibitory peptides. *Journal of agricultural and food chemistry*, 62(8), 1846-1851.
- [107] Shafee, T. (2014). Evolvability of a viral protease: experimental evolution of catalysis, robustness and specificity (Doctoral dissertation, University of Cambridge).
- [108] Gossauer, A. (2006). *Struktur und Reaktivität der Biomoleküle*, Verlag Helvetica Chimica Acta.
- [109] King, E. J., Moss, D. W. (1963). International enzyme units and isoenzyme nomenclature. *Journal of clinical pathology*, 16, 391-393.
- [110] Martínez-Medina, G. A., Barragán, A. P., Ruiz, H. A., Ilyina, A., Hernández, J. L. M., Rodríguez-Jasso, R. M., ... Aguilar-González, C. N. (2019). Fungal Proteases and Production of Bioactive Peptides for the Food Industry. In *Enzymes in Food Biotechnology* (pp. 221-246). Academic Press.
- [111] Guerard, F., Dufosse, L., De La Broise, D., Binet, A. (2001). Enzymatic hydrolysis of proteins from yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) wastes using Alcalase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 11(4-6), 1051-1059.
- [112] Yust, M. M., Pedroche, J., Giron-Calle, J., Alaiz, M., Millán, F., Vioque, J. (2003). Production of ace inhibitory peptides by digestion of chickpea legumin with alcalase. *Food Chemistry*, 81(3), 363-369.
- [113] Thiansilakul, Y., Benjakul, S., Shahidi, F. (2007). Antioxidative activity of protein hydrolysate from round scad muscle using alcalase and flavourzyme. *Journal of Food Biochemistry*, 31(2), 266-287.

- [114] Guisan, J. M. (Ed.). (2006). Immobilization of enzymes and cells (Vol. 22). Springer Science & Business Media.
- [115] Chmiel, H., Takors, R., Weuster-Botz, D. (Eds.). (2018). Bioprozesstechnik. Springer Spektrum.
- [116] Sewczyk, T., Antink, M. H., Maas, M., Kroll, S., Beutel, S. (2018). Flow rate dependent continuous hydrolysis of protein isolates. *AMB Express*, 8(1), 18.
- [117] Hove, E. L., King, S. (1979). Trypsin inhibitor contents of lupin seeds and other grain legumes. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 22(1), 41-42.
- [118] Sathe, S. K., Deshpande, S. S., Salunkhe, D. K. (1982). Functional properties of lupin seed (*Lupinus mutabilis*) proteins and protein concentrates. *Journal of food science*, 47(2), 491-497.
- [119] Standing, K. G. (2003). Peptide and protein de novo sequencing by mass spectrometry. *Current opinion in structural biology*, 13(5), 595-601.
- [120] Switzar, L., Giera, M., Niessen, W. M. (2013). Protein digestion: an overview of the available techniques and recent developments. *Journal of proteome research*, 12(3), 1067-1077.
- [121] Antink, M. M. H., Sewczyk, T., Kroll, S., Árki, P., Beutel, S., Rezwan, K., Maas, M. (2019). Proteolytic ceramic capillary membranes for the production of peptides under flow. *Biochemical Engineering Journal*, 147, 89-99.
- [122] Vashist, S. K., Dixit, C. K. (2011). Interference of N-hydroxysuccinimide with bicinchoninic acid protein assay. *Biochemical and biophysical research communications*, 411(2), 455-457.
- [123] Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2), 248-254.
- [124] Antharavally, B. S., Mallia, K. A., Rangaraj, P., Haney, P., Bell, P. A. (2009). Quantitation of proteins using a dye-metal-based colorimetric protein assay. *Analytical biochemistry*, 385(2), 342-345.

- [125] Jahani, S., Shakiba, A., Jahani, L. (2015). The Antimicrobial effect of lactoferrin on Gram-negative and Gram-positive bacteria. *International Journal of Infection*, 2(3).
- [126] Ulvatne, H., Samuelsen, Ø., Haukland, H. H., Krämer, M., Vorland, L. H. (2004). Lactoferricin B inhibits bacterial macromolecular synthesis in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *FEMS microbiology letters*, 237(2), 377-384.
- [127] Laganowsky, A., Reading, E., Hopper, J. T., Robinson, C. V. (2013). Mass spectrometry of intact membrane protein complexes. *Nature protocols*, 8(4), 639.
- [128] Konermann, L., Ahadi, E., Rodriguez, A. D., Vahidi, S. (2012). Unraveling the mechanism of electrospray ionization.
- [129] Wilm, M. (2011). Principles of electrospray ionization. *Molecular & cellular proteomics*, 10(7), M111-009407.
- [130] www.expasy.org Abgerufen am 27.07.19
- [131] <https://www.git-labor.de/forschung/life-sciences-biotechnologie/tandem-massenspektrometrie> Abgerufen am 19.06.19
- [132] de Jesús Uribe-Gómez, J., Zamora-Natera, J. F., Bañuelos-Pineda, J., Kachlicki, P., Stobiecki, M., García-López, P. M. (2014). Flavonoid profile of *Lupinus mexicanus* germinated seed extract and evaluation of its neuroprotective effect. *Histol Histopathol*, 29, 1415-1421.
- [133] Bast, A., Haenen, G. R. (2013). Ten misconceptions about antioxidants. *Trends in pharmacological sciences*, 34(8), 430-436.
- [134] Hu, J., Chen, C., Zhang, S., Zhao, X., Xu, H., Zhao, X., Lu, J. R. (2011). Designed antimicrobial and antitumor peptides with high selectivity. *Biomacromolecules*, 12(11), 3839-3843.
- [135] Góngora-Benítez, M., Tulla-Puche, J., Paradís-Bas, M., Werbitzky, O., Giraud, M., Albericio, F. (2011). Optimized Fmoc solid-phase synthesis of the cysteine-rich peptide linaclotide. *Peptide Science*, 96(1), 69-80.

Unterstützende Arbeiten

An einem Teil der in dieser Dissertation durchgeführten Experimente und Entwicklungen waren neben dem Autor weitere Personen beteiligt welche im Folgenden aufgeführt sind:

Kooperationen

Marieke Hoog Antink: Herstellung der Keramikkapillaren und Oberflächenfunktionalisierung (Advanced Ceramics, Universität Bremen)

Teile der praktischen Arbeiten der vorliegenden Dissertation wurden in folgenden studentischen Abschlussarbeiten nach Vorgabe und in Zusammenarbeit mit dem Autor der Dissertation durchgeführt:

Praktika

Conrad Kuhwald: RP-HPLC Optimierung und die Übertragung auf die präparative RP-FPLC
→ Teilergebnis in Kapitel 4.2.1

Bachelorarbeiten

Samuel Edward Hakim: Nachweis bioaktiver Peptide aus proteolytischen Proteinhydrolysaten der Süßlupinen. 08/2017 – 11/2017
→ Teilergebnis in Kapitel 4.3

Masterarbeiten

Lorn Messner: Analyse und Charakterisierung von bioaktiven Peptiden aus Lupinenproteinhydrolysat. 05/2018 – 10/2018
→ Teilergebnis in Kapitel 4.3

Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name	Tim Sewczyk
Geburtsdatum	09.10.1987
Geburtsort	Minden
Nationalität	Deutsch

Ausbildung

2016 – 2020	Promotionsstudium: Chemie Institut für Technische Chemie Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover
2014	Masterarbeit am Institut für experimentelle Onkologie Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München
2012 – 2015	Masterstudium: Molekulare und Angewandte Biotechnologie Rheinisch-Westfälische Technische Hochschule Aachen
2010	Auslandsstudium: Biotechnology University of Mauritius
2008 – 2012	Bachelorstudium: Technische und Angewandte Biologie Hochschule Bremen
1998 – 2007	Allgemeine Hochschulreife Herder Gymnasium Minden