

**Entwicklung und Anwendung
prozesstechnischer und analytischer
Systeme zur Wertschöpfung bioaktiver
Inhaltsstoffe aus Kartoffeln**

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

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

genehmigte Dissertation

von

Dipl.-Chem. Alain-Michel Graf
geboren am 10. Juni 1980 in Hildesheim

Hannover, 2010

Referent: Prof. Dr. Thomas Scheper

Korreferent: Prof. Dr. Bernd Hitzmann

Tag der Promotion: 14.07.2010

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig verfasst habe und die benutzten Hilfsmittel sowie eventuell zu Hilfsleistungen herangezogene Institutionen vollständig angegeben habe. Ferner versichere ich, dass die Dissertation nicht bereits als Diplomarbeit oder andere Prüfungsleistung verwendet worden ist.

Hannover, Juli 2010

Alain Graf

Danksagung

Die vorliegende Dissertation wurde im Zeitraum von Mai 2006 bis April 2009 am Institut für Technische Chemie der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover unter der Leitung von Herrn Professor Dr. Thomas Scheper angefertigt. Ich möchte mich bei ihm herzlich für die freundliche Unterstützung, das stets angenehme Arbeitsklima und die gebotenen Möglichkeiten bedanken.

Professor Dr. Bernd Hitzmann danke ich für die Übernahme des Korreferats und für Ideen und Lösungen bei der Bestimmung enzymatischer Reaktionskinetiken.

Dem Niedersächsischen Ministerium für Wissenschaft und Kultur danke ich für die Finanzierung des Projekts im Rahmen des Forschungsverbunds Agrar- und Ernährungswissenschaften Niedersachsen (FAEN). In diesem Zusammenhang sei auch den Projektpartnern im FAEN für die hervorragende Kommunikation und Vernetzung gedankt.

Den Industriepartnern Emsland-Stärke GmbH und Sartorius Stedim Biotech GmbH danke ich für die konstruktive Zusammenarbeit im Rahmen des Projekts. Insbesondere Dr. Martin Lotz und Dr. Andre Pastor möchte ich für die umfangreiche Versorgung mit Material und Know-how danken.

Dr. Sascha Beutel möchte ich für anregende Diskussionen und interessante Perspektiven sowie für das Korrekturlesen dieser Arbeit danken. Mit Dir kann man über alles sprechen, egal ob in Deutsch oder Englisch.

Martina Weiß, Thorleif Hentrop und den Mitarbeitern der Feinmechanikwerkstatt möchte ich für ihre unermüdliche Hilfe und für die vielen guten Ideen danken.

Großer Dank gilt all denjenigen, die durch ihre wissenschaftlichen Untersuchungen zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben: Christian Benecke, Iliyana Pepelanova, Isabelle Schönbeck, Jenny Götting, Andreas Prediger, Claudia Räke und Maren Drewitz.

Allen Mitgliedern des TCI danke ich herzlich für die einmalige Arbeitsatmosphäre, die große Hilfsbereitschaft und den tollen Zusammenhalt. Viele Aktionen nach Feierabend werden unvergessen bleiben. Danke für die Freundschaften, die entstanden sind und über den Uni-Alltag hinausgingen.

Ein dickes Dankeschön insbesondere an Anne Glindkamp und Arne Bluma, den beiden anderen A's des A-Teams. Mit euch hat einfach jeder Plan funktioniert – ich habe es geliebt.

Meinen Freunden danke ich für ihr offenes Ohr, die unermüdliche Motivation und die vielen Stunden Ablenkung und Freude außerhalb des Elfenbeinturms.

Meiner Familie, insbesondere meinen Großeltern, meinen Eltern und meiner Schwester, möchte ich von ganzem Herzen für ihr Vertrauen, ihre Unterstützung und ihre Liebe danken.

Mein ganz besonderer Dank gilt Nina Severin für ihre unendliche Liebe und Geduld. Du warst immer für mich da, hast an mich geglaubt, mir Kraft gegeben und mir in brenzligen Situationen heldenhaft den Rücken frei gehalten.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Kurzzusammenfassung.....	VI
Abstract.....	VII
1 Einleitung und Zielsetzung.....	1
2 Theoretischer Hintergrund.....	4
2.1 Nutritive Bedeutung und industrielle Wertschöpfung der Kartoffelinhaltstoffe	4
2.1.1 Kartoffelfruchtwasser – Nebenprodukt der industriellen Stärkegewinnung als Ressource der Proteingewinnung	5
2.1.2 Zusammensetzung des Kartoffelproteins.....	7
2.1.3 Nutritive Bedeutung des Kartoffelproteins.....	8
2.1.4 Vermarktungspotentiale von Kartoffelproteinen	10
2.2 Gewinnung, Applikation und Vermarktung bioaktiver Peptide	11
2.2.1 Wirkungen in biologischen Systemen	11
2.2.1.1 Inhibierende Wirkung auf das Angiotensin-Converting-Enzyme	12
2.2.1.2 Antioxidative Wirkung	14
2.2.1.3 Antimikrobielle Wirkung.....	14
2.2.2 Anwendungspotentiale bioaktiver Peptide	15
2.3 Prozesstechnische Methoden zur Proteingewinnung aus KFW	17
2.3.1 Stand der Technik	18
2.3.2 Membranadsorbertechnologie	19
3 Experimenteller Teil I: Gewinnung und Charakterisierung von Proteinfraktionen aus KFW	22

3.1	Fraktionierung von Patatin und Proteaseinhibitoren aus Kartoffelfruchtwasser mit SartobindDirect-Wickelmodulen.....	22
3.1.1	Prozesstechnischer Aufbau und Betriebsweise der Fraktionierungsanlage	23
3.1.2	Fraktionierung mit Q500- und S500-Modulen	25
3.1.2.1	Bewertung der Online-Prozessdaten.....	26
3.1.2.2	Bestimmung der dynamischen Bindungskapazitäten	28
3.1.2.3	Bewertung der Moduldrücke und der Trübungsverläufe.....	30
3.1.2.4	Zusammenfassung und Bewertung der Modultypen	31
3.1.3	Fraktionierung mit Q1000- und S1000-Modulen	31
3.1.3.1	Bewertung der Vlies-Polymerspacermodule Q/S1000V250	32
3.1.3.2	Bewertung des Extruderpolymer- Moduls Q1000E250	33
3.2	Aufreinigung der Produkte durch Ultra- und Diafiltration	35
3.3	Konfektionierung und Charakterisierung der Produkte	37
3.3.1	Konfektionierung durch Sprüh- und Gefriertrocknung	37
3.3.2	Bestimmung der Proteinausbeuten	39
3.3.3	Qualitative Charakterisierung über SDS-Gelelektrophorese	41
3.3.4	Quantitative Bestimmung der Proteinreinheit	42
3.3.5	Bestimmung der Produktaktivitäten	42
3.3.6	Bewertung der Trocknungsmethoden	44
3.4	Nutritive und toxikologische Bewertung der Produkte	45
3.4.1	Biologische Wertigkeit der Kartoffelproteinfraktionen.....	45
3.4.2	Überwachung toxischer Glykoalkaloide in Fraktionen und KP	47
3.5	Bestimmung und Inhibierung der enzymatischen Verbräunung	48
3.5.1	Bestimmung der PPO-Aktivität	49
3.5.1.1	PPO-Aktivitätsassay I.....	49
3.5.1.2	PPO- Aktivitätsassay II.....	49
3.5.2	Strategien zur Hemmung von Polyphenoloxidasen.....	50
3.6	Zusammenfassung und Bilanzierung	52

4 Experimenteller Teil II: Etablierung und Charakterisierung der enzymatischen Patatinhydrolyse.....	54
4.1 Hydrolysebedingungen	54
4.2 Bestimmung des Hydrolysefortschritts.....	57
4.2.1 Bradford-Assay zur Abschätzung des Proteinabbaus.....	57
4.2.2 OPA-Test zur Bestimmung des Hydrolysegrades	58
4.3 Untersuchung der Hydrolysate durch RP-HPLC.....	62
4.3.1 RP-HPLC-Peptidanalytik.....	62
4.3.2 Bewertung der Peptid-Fingerprints im Verlauf der Hydrolyse	63
4.3.3 Peptid-Fingerprints der Hydrolyseprodukte	65
4.3.4 Untersuchung der freien Aminosäuren.....	66
4.4 Fraktionierung von Patatinhydrolysaten	68
4.4.1 Aufarbeitung und Fraktionierung der Hydrolysate.....	68
4.4.2 Bewertung der SEC-FPLC-Trennleistung.....	70
4.5 Zusammenfassung.....	71
4.6 Biologische Untersuchungen	72
4.6.1 Bestimmung der antioxidativen Kapazität.....	72
4.6.1.1 TEAC-Assay	72
4.6.1.2 ORAC-Assay	73
4.6.2 In vitro-Testung der inhibierenden Wirkung auf das Angiotensin- Converting-Enzyme	76
4.6.2.1 ACE-Inhibition der Proteine und Gesamthydrolysate	77
4.6.2.2 ACE-Inhibition fraktionierter Hydrolysate.....	79
4.6.3 Antimikrobielle Tests I: Agardiffusions-Assay	80
4.6.4 Antimikrobielle Tests II: Broth-Mikroverdünnungsassay.....	82
4.6.4.1 Wirkung auf <i>E. coli</i> K12.....	83
4.6.4.2 Wirkung auf <i>Bacillus subtilis</i> und <i>Kluyveromyces marxianus</i>	84
4.6.5 Zusammenfassung	85

4.7	Massenspektrometrische Identifizierung der Abbauprodukte	87
4.7.1	MALDI-MS-Analyse des peptischen Patatinhydrolysats	87
4.7.2	Sequenzbestimmung von Peptiden mit Tandem-Massen-spektrometrie....	90
5	Fazit und Ausblick	97
6	Anhang	99
6.1	Material	99
6.1.1	Geräteliste	99
6.1.2	Chemikalienliste	101
6.2	Downstream-Methoden.....	103
6.2.1	Prozesstechnische Fraktionierung der Kartoffelproteine.....	103
6.2.1.1	Einzelbetrieb	103
6.2.1.2	Parallelbetrieb	104
6.2.1.3	Tandembetrieb	104
6.2.2	FPLC-Aufreinigung	105
6.3	Enzymatische Hydrolysesysteme	105
6.4	RP-HPLC Analytik	106
6.4.1	RP-HPLC-Peptidanalytik.....	106
6.4.2	RP-HPLC-OPA-Aminosäureanalytik.....	108
6.4.2.1	Probenvorbereitung: Totalhydrolyse	108
6.4.2.2	Probenvorbereitung: freie Aminosäuren.....	108
6.4.2.3	RP-HPLC Analytik	108
6.5	Bioanalytische Assays.....	109
6.5.1	Bradford-Assay	109
6.5.2	Lowry-Assay	109
6.5.3	Lipidacylhydrolase-(LAH)-Assay	110
6.5.4	Proteaseinhibitor-Assay	110
6.5.5	PPO-Assay I.....	111
6.5.6	PPO-Assay II	111
6.5.7	OPA-Assay	112

6.5.8	ACE-Assay	113
6.5.9	TEAC-Assay	114
6.5.10	ORAC-Assay	115
6.5.11	Plattendiffusionstest.....	116
6.6	Abkürzungsverzeichnis	117
6.7	Curriculum Vitae.....	119
6.7.1	Publikationen	121
7	Literatur.....	122

Kurzzusammenfassung

Entwicklung und Anwendung prozesstechnischer und analytischer Systeme zur Wertschöpfung bioaktiver Inhaltsstoffe aus Kartoffeln

Alain-Michel Graf

Bei der industriellen Stärkeproduktion fällt ein Prozessnebenstrom an, sogenanntes Kartoffelfruchtwasser, das ernährungsphysiologisch wertvolle Proteine enthält. Industriell wird diese Proteinfraction durch Hitzeagulation gewonnen und liefert ein denaturiertes Produkt, das für die menschliche Ernährung wenig geeignet ist und überwiegend als geringwertiges Tierfuttermittel vermarktet wird.

Mit Hilfe neuartiger Membranadsorber-Prozessierungseinheiten wurden die zwei Hauptproteinfraktionen des Kartoffelfruchtwassers, Patatin und Proteaseinhibitoren, im Technikumsmaßstab fraktioniert und in nativer bioaktiver Form gewonnen. Die Membranadsorber-Technologie basiert auf den Prinzipien der Ionenaustausch-Chromatographie und ermöglicht die direkte Prozessierung von Kartoffelfruchtwasser unter milden Reaktionsbedingungen ohne kostenintensive Vorbehandlungsschritte. Die Produkteluate wurden durch Ultra- und Diafiltration aufkonzentriert bzw. entsalzt und durch Sprüh- und Gefriertrocknung konfektioniert. Verschiedene analytische Methoden, wie SDS-PAGE, RP-HPLC und enzymatische Assays, wurden etabliert und durchgeführt, um die Produktqualität bezüglich Zusammensetzung, Bioaktivität und Abreicherung von Störkomponenten zu charakterisieren. Vermarktungspotentiale der hochwertigen Produkte ergeben sich in den Bereichen der Sport- und Babynahrung, der Nahrungsergänzungsmittel sowie der Pharmazeutika.

Im zweiten Abschnitt wurden Hydrolysesysteme mit gastrointestinalen, technischen und pflanzlichen Enzymen entwickelt. Der Pool an dargestellten Peptiden wurde durch SEC-FPLC aufgereinigt und mögliche antioxidative, antimikrobielle und ACE-inhibitorische Wirkungen getestet. Die Peptide wurden weiterhin mit MALDI-MS und HPLC-ESI-MS/MS analysiert und charakterisiert.

Schlagerörter: Kartoffelprotein, Membranadsorber-Chromatographie, Patatin, Proteaseinhibitoren, bioaktive Peptide, enzymatische Hydrolyse

Abstract

Development and application of processing and analytical systems for the recovery of bioactive ingredients from potatoes

Alain-Michel Graf

During the industrial production of starch from potatoes, a process stream with nutritionally valuable proteins, so called potato fruit juice, occurs as a by-product. Industrial recovery of this fraction is accomplished by heat coagulation and results in denatured low-quality product, which is not suitable for human consumption and therefore placed on market as low-value animal feed.

Employing the novel membrane adsorber processing units, two major protein fractions of potato fruit juice, patatin and a group of potato protease inhibitors, were isolated in technical scale and obtained in native, bioactive form. The membrane adsorber technology is based on the principles of ion exchange chromatography and enables a direct way for processing potato fruit juice under gentle conditions without cost-intensive pre-treatment steps. The product eluates were concentrated and desalted by ultra- and diafiltration and converted by spray drying and lyophilisation. Several analytical methods including SDS-PAGE and RP-HPLC as well as enzymatic assays have been established and performed to characterise the quality of the protein fractions in regard to composition, bioactivity and depletion of interfering compounds. A commercialization as high valuable ingredients for nutraceuticals, athlete- and baby-food, dietary and pharmaceutical products is conceivable.

In the second part, strategies have been mapped out to hydrolyse the patatin fraction with gastrointestinal proteases as well as with technical and plant proteases. The pool of obtained peptides was downstreamed by SEC-FPLC and tested to evaluate bioactivity regarding antioxidative, antimicrobiological and ACE-inhibitory effects. The peptides were further analysed and characterised by MALDI-MS and HPLC-ESI-MS/MS.

Keywords: potato protein, membrane adsorber chromatography, patatin, protease inhibitors, bioactive peptides, enzymatic hydrolysis

1 Einleitung und Zielsetzung

Im Bundesland Niedersachsen stellen der Anbau und die Verarbeitung nachwachsender Rohstoffe aus intensiver landwirtschaftlicher Nutzung eine tragende Säule der Ökonomie dar. Im Zuge der EU-Erweiterung und der Globalisierung der Märkte hat sich jedoch im vergangenen Jahrzehnt ein struktureller Wandel vollzogen, der den Wettbewerb um Rohstoffe und den Produktabsatz verschärft. Zahlreiche Unternehmen des Lebensmittelsektors richten daher ihr Portfolio an den veränderten Bedarfs- und Produktstrukturen neu aus. Die Biotechnologie stellt in dieser Situation eine Schlüsseltechnologie dar, um aus bisher nicht genutzten Ressourcen innovative Produkte zu generieren und diese marktorientiert weiter zu entwickeln.

Die Kartoffel zählt zu den wichtigsten niedersächsischen Rohstoffen aus landwirtschaftlicher Produktion. Die Ernte beträgt allein in Niedersachsen etwa 5,2 Mio. t pro Jahr und machte damit 46 % der Gesamternte in Deutschland (2008) aus [1]. Rund 30 % der Ernte entfällt auf Stärkekartoffeln, aus denen industriell Stärke gewonnen wird. Als Nebenstrom fällt Kartoffelfruchtwasser (KFW) an, das mit 2-3 % [w/v] einen hohen Anteil an ernährungsphysiologisch interessanten Proteinen besitzt. Nach aktuellem Forschungsstand werden die Kartoffelproteine in drei Klassen eingeordnet und bestehen aus dem Hauptspeicherprotein Patatin, aus Proteaseinhibitoren sowie aus Polyphenoloxidasen, Stärkesynthasen und einer Reihe höhermolekularer Proteine [2,3]. Bis heute wird diese Proteinfracht industriell bei der Kartoffelstärkegewinnung nur in denaturierter, nicht bioaktiver Form abgetrennt. Die Produkte sind von minderer Qualität und werden als Tierfuttermittel verkauft.

Die Integration neuartiger prozesstechnischer Methoden in bestehende Produktionsabläufe eröffnet die Möglichkeit, die Proteinfracht in bioaktiver Form zu isolieren und so die Wertschöpfungskette nachhaltig zu erweitern, indem anfallende Reststoffströme wie KFW zur Erzeugung von Hochwertprodukten genutzt werden. In den vergangenen Jahren ist beim Konsumenten ein eindeutiger Trend hin zu gesundheitsbewusster Ernährung zu beobachten. Neuartige Proteinpräparate lassen sich im Nahrungsmittelsektor gewinnbringend vermarkten. Ein Beispiel hierfür sind die Anwendung der im Kartoffelfruchtwasser enthaltenen Proteaseinhibitoren als Appetitzügler. Doch damit ist das Potential bei weitem nicht erschöpft. Lebensmittel mit spezifischem, gesundheitsförderndem Zusatznutzen, auch funktionelle Lebensmittel

oder Functional Food genannt, spielen in unserem Nahrungsmittelangebot eine immer größere Rolle.

Durch biotechnologische Verfahren werden gezielt Produkte erzeugt, die bioaktive und gesundheitlich aktive Substanzen enthalten, deren spezifische Wirkung in ernährungswissenschaftlichen Studien bestätigt werden kann/muss. Bereits heute sind probiotische Milchprodukte oder cholesterinsenkende Margarine in jedem Supermarktregal zu finden. Aus Proteinen können durch enzymatische Hydrolyse funktionelle bioaktive Peptide freigesetzt werden. Durch Einbeziehung des nachgewiesenen gesundheitlichen Zusatznutzens in die Vermarktung können Produkte gezielt im Wachstumsmarkt Functional Food oder in medizinisch-pharmazeutischen Bereichen platziert werden [4].

Im Rahmen dieser Arbeit sollen mit Hilfe eines prozesstechnischen Verfahrens native Kartoffelproteinfraktionen aus Kartoffelfruchtwasser gewonnen werden. In Kooperation mit dem Industrieunternehmen Emsland-Stärke GmbH (Emlichheim/Deutschland) wurde am Institut für Technische Chemie ein membranbasierter Downstream-Prozess vom Labor- bis zum Technikumsmaßstab etabliert [5,6,7]. Mit Hilfe der so genannten Membranadsorbertechnologie, einem innovativen Verfahren zur spezifischen Separation von Biomolekülen aus komplexen Lösungen, lassen sich bioaktive Kartoffelproteinfraktionen aus Kartoffelfruchtwasser isolieren. Die isolierten Kartoffelproteinfraktionen werden bis zur Nahrungsmittelqualität aufgereinigt, durch Trocknungsverfahren schonend konfektioniert und anschließend bioanalytisch charakterisiert. Die Akkumulation möglicher Verunreinigungen, z. B. toxischer Glykoalkaloide bzw. qualitätsmindernder Polyphenoloxidasen, soll durch Analysesysteme überwacht werden.

Im Weiteren wird der methodische Abbau von Kartoffelproteinen zu Peptiden untersucht. Peptide können synthetisch oder durch gezielten enzymatischen Verdau aus Proteinen erzeugt werden und lassen sich in den Bereichen der Sport-, Baby- und Seniorenernährung gewinnbringend vermarkten. Sie können schneller und vollständiger als Proteine zu körpereigenen Proteinen metabolisiert werden und somit den Muskel- und Zellaufbau bzw. das Wachstum und die Erneuerung von Körperzellen fördern. Des Weiteren wurde in verschiedenen Studien von funktionellen bioaktiven Peptiden berichtet, die aus Milchprodukten, aber auch aus Kartoffelprotein, freigesetzt werden können [31-44]. Ziel ist es, enzymatische Hydrolysesysteme zu etablieren und die

aufgereinigten Abbauprodukte eingehend bioanalytisch zu charakterisieren. Durch entsprechende Testsysteme sollen potentielle bioaktive Wirkungen der Peptide untersucht werden.

2 Theoretischer Hintergrund

2.1 Nutritive Bedeutung und industrielle Wertschöpfung der Kartoffelinhaltstoffe

Mit einer jährlichen Ernte von mehr als 314 Mio. t (Jahr 2008) zählt die Kartoffel (*solanum tuberosum*) zu den wichtigsten Anbaupflanzen weltweit [8]. Die Kartoffel besteht zu etwa 70-80 % aus Wasser und enthält je nach Sorte 15-20 % Stärke (s. Abbildung 1). Der hohe nutritive Wert der Kartoffel basiert nicht nur auf der hohen Energiedichte der Kohlenhydrate; vor allem die minoren Bestandteile wie hochwertiges Protein, hohe Vitamin- (B₁, B₂, C) und Mineralstoffgehalte (Kalium und Magnesium) sowie Ballaststoffen, Aminosäuren und Polyphenole tragen maßgeblich bei.

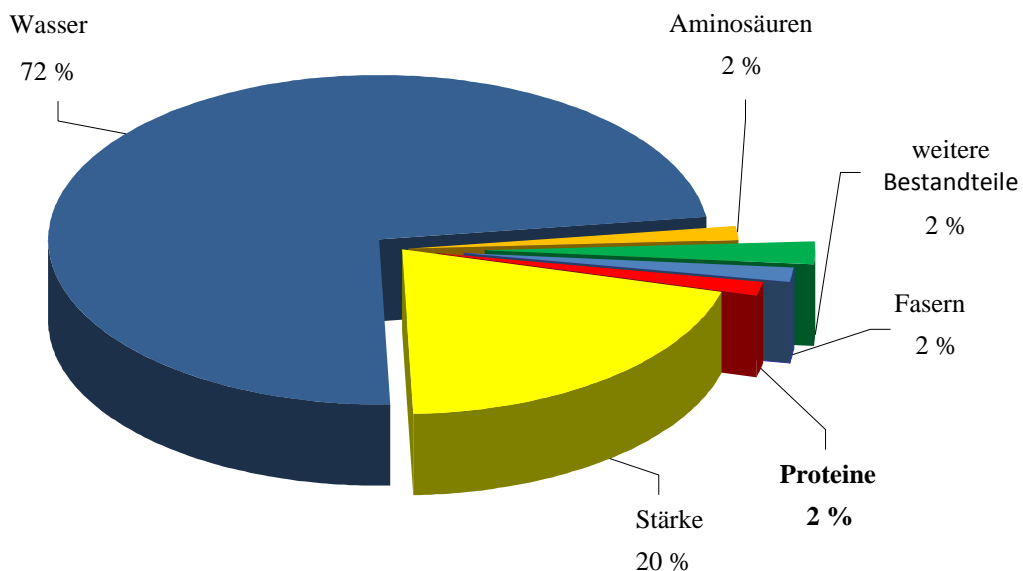


Abbildung 1: Bestandteile und Zusammensetzung der Kartoffel

Neben dem Verzehr als Grundnahrungsmittel (ca. 60 % der Ernte in Deutschland) wird die Kartoffel als Tierfuttermittel (1,2 %) und Saatgut (6 %) eingesetzt und in industriellen Prozessen (34 %) verarbeitet [9]. Für die industrielle Stärkegewinnung in Deutschland stellt die Kartoffel vor Weizen und Mais den wichtigsten Rohstoff dar. Der

Hauptanteil der Stärke und deren Produkte werden im Bereich der Lebensmittelindustrie in Form von stärkebasierten Zuckerstoffen, Verdickungs-, Stabilisierungs- und Bindemitteln verwendet. Aber auch in der Textil-, Papier- und Klebstoffindustrie wird Stärke aufgrund der Eigenschaften als modifizierbares Polymer vielfältig eingesetzt.

2.1.1 Kartoffelfruchtwasser – Nebenprodukt der industriellen Stärkegewinnung als Ressource der Proteingewinnung

Bei der industriellen Stärkeproduktion fällt Kartoffelfruchtwasser (KFW) in großen Mengen als Nebenstrom nach dem Separieren der Stärke an. KFW besteht größtenteils aus Wasser, enthält darüber hinaus jedoch nahezu alle ernährungsphysiologisch wertvollen minoren Bestandteile (s. Abbildung 1).

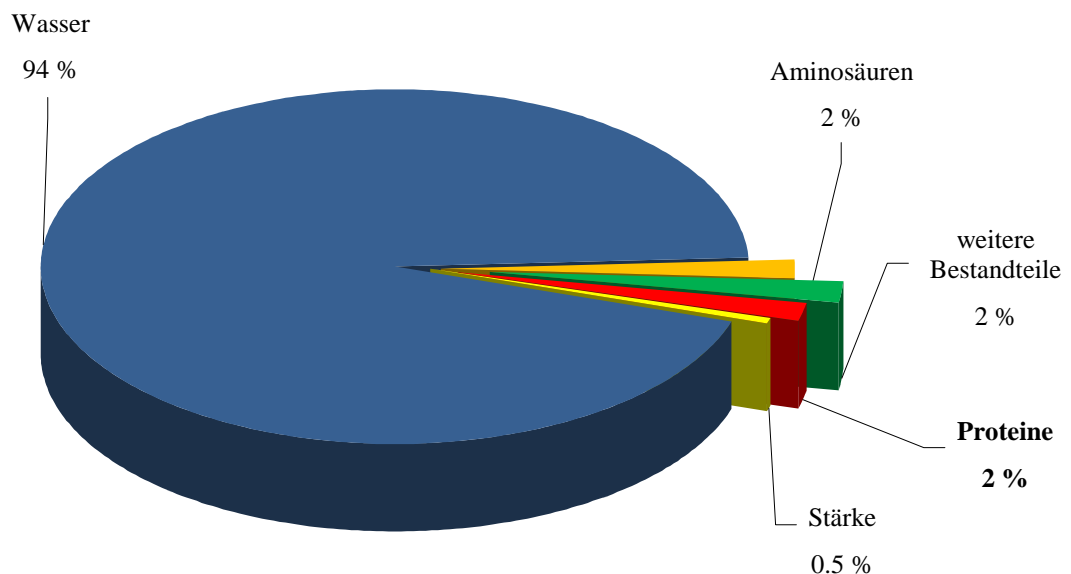


Abbildung 2: Bestandteile und Zusammensetzung des KFW

Mit einem Trockenmasseanteil von 26,8 % bzw. einer Konzentration von 22,2 g/L bildet das Kartoffelprotein neben Wasser den Hauptbestandteil im KFW (s. Tabelle 1). Berücksichtigt man die Gesamtmenge an industriell anfallendem KFW, so wird das Potential des Neben- bzw. Reststoffstroms als Proteinrohstoffquelle für den Lebensmittelsektor, inklusive Functional Food, und im Bereich der Nahrungsergänzungsmittel deutlich.

Tabelle 1: Inhaltsstoffe des KFW [3]

Komponente	Konzentration im KFW (min-max) [g/L]	Trockenmasse [%]
Proteine	13,4 (8,5-22,2)	26,8
Peptide	2,2 (1,5-3,1)	4,4
Aminosäuren und Amide	4,8 (3,3-7,8)	9,6
andere N-haltige Komponenten	0,9	1,8
Kohlenhydrate	7,9 (3,0-24,9)	15,8
Lipide	1,1	2,2
Zitronensäure	5,0 (2,0-12,0)	10,0
Ascorbinsäure	0,3 (0,1-0,6)	0,6
andere organische Säuren	1,3 (0,7-5,4)	2,6
Chlorogensäure	0,2 (0,1-0,5)	0,4
Kaffeesäure	0,07 (0,03-0,3)	0,1
Kalium	5,6 (3,9-7,3)	11,2
Phosphor	0,5 (0,2-0,9)	1,0
andere	5,0	10,1

Allerdings müssen Störkomponenten im KFW beachtet werden, da sie den Wert der Produkte und damit den wirtschaftliche Nutzen erheblich einschränken können. Die enzymatische Reaktion der Polyphenole mit enthaltenen Polyphenoloxidasen kann zu unerwünschter Verbräunung führen, die sowohl die sensorischen als auch die nutritiven Eigenschaften des Kartoffelproteins negativ beeinflussen.

Eine weitere Problematik bei der Verwertung des Rohstoffs KFW stellen toxische Inhaltsstoffe der Kartoffel, sogenannten Glykoalkaloide, dar, die sich in den Produkten anreichern können. Glykoalkaloide sind aus einem Steroid-Alkaloid-Gerüst aufgebaut, an das Tri- bzw. Tetrasaccharide glykosyliert sind [10]. Zu den wichtigsten Vertretern zählen α -Solanin und α -Chaconin, die mit etwa 95 % näherungsweise den Gesamtglykoalkaloid-Gehalt in der Kartoffel ausmachen. In der geschälten Kartoffel befinden sich etwa 12-110 ppm, in der Schale der Kartoffel dagegen bis zu 1.068 ppm [11]. Bei Menschen führt eine orale Dosis von 1-5 mg/kg Körpergewicht zu geringfügigen bis schweren Toxizitätserscheinungen, 3-6 mg/kg Körpergewicht können bereits letal wirken [12]. Eine Überwachung mit geeigneter Analytik und eine Abreicherung im finalen Produkt sind daher unerlässlich.

2.1.2 Zusammensetzung des Kartoffelproteins

Die löslichen Proteine im KFW lassen sich in drei große Gruppen unterteilen (s. Tabelle 2). Mit etwa 40-60 % der Proteinfraucht ist das Hauptspeicherprotein der Kartoffel, das majore Kartoffelprotein Patatin, enthalten. Patatin gehört zur Gruppe der N-glykosidisch verknüpften Glykoproteine und weist weder besonders hydrophile noch hydrophobe Cluster auf. Abhängig vom Glykosylierungsmuster und der Heterogenität der Primärstruktur existieren verschiedene Isoformen, die sich in Molekulargewicht (40-44 kDa) und isoelektrischen Punkten (pI 4,5-5,2) unterscheiden [13,14,15]. Dennoch konnten Park et al. eine enge Strukturhomologie dieser Isoformen nachweisen [16]. Patatin zeichnet sich durch enzymatische Acyltransferase- und Lipidacylhydrolase-(LAH)-Aktivität aus [13]. Letztere ist in der Abwehr gegen den Angriff von Insekten und Pathogenen involviert [17,18].

Tabelle 2: Übersicht der löslichen Kartoffelproteine im KFW

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

¹⁾ Dimer: ~ 80 kDa

²⁾ Monomer: 10,2 kDa

³⁾ inhibiert Metallo-Carboxypeptidasen

Eine heterogene Gruppe hitzestabiler, cysteinreicher Proteine, denen eine inhibierende Wirkung auf Serin- und Cysteinproteasen gemein ist, werden zu den minoren Kartoffelproteinen der Proteaseinhibitoren (PI) zusammengefasst. Sie machen bis zu 51 % des löslichen Kartoffelproteins aus und unterscheiden sich in Molekülmasse (3-23 kDa), Aminosäuresequenz und Inhibitoraktivität [2]. PI spielen eine wichtige Rolle in den Abwehrmechanismen der Kartoffelpflanze gegen Schädlinge und pathogene Mikroorganismen. Die PI des KFW lassen sich in sieben Unterklassen einteilen.

Im übrigen Proteinanteil von 10-12 % sind alle Proteine zusammengefasst, die nicht unter die erst genannten Gruppen fallen. Dazu gehören höher molekulare Proteine wie Lectine [19] und Phenoloxidasen, ebenso wie Proteinkinasen und Phosphorylasen [3,13,20].

2.1.3 Nutritive Bedeutung des Kartoffelproteins

In vielerlei Hinsicht sind pflanzliche Proteine den tierischen vorzuziehen. Es bietet sich nicht nur die Möglichkeit, über die Zertifizierung als veganen Zusatzstoff neue Absatzmärkte zu erschließen, auch die geringeren Kosten der Rohmaterialien und insbesondere der hohe Wert des pflanzlichen Proteins sind weitere Argumente für die Gewinnung und Vermarktung.

Ein Maß für die ernährungsphysiologische Bedeutung eines Proteins ist die sogenannte biologische Wertigkeit. Diese gibt an, inwiefern das Aminosäurespektrum eines Lebensmittels dem Bedarf an essentiellen Aminosäuren qualitativ und quantitativ entspricht. Die biologische Wertigkeit eines Proteins wird in Relation zum Referenzprotein Hühner-Vollei, dessen Wert als 100 definiert ist, angegeben. Die Wertigkeit des Kartoffelproteins stützt sich auf hohe Gehalte der essenziellen Aminosäuren Leucin, Lysin, Valin und Phenylalanin und liegt mit 76 im oberen Bereich pflanzlicher Lebensmittel (Tabelle 3). Im Vergleich zu Getreide zeichnet sich Kartoffelprotein durch einen hohen Gehalt an Lysin und eher geringe Gehalte an schwefelhaltigen Aminosäuren aus. Dem geringen Methionin-Gehalten in Kartoffelprotein wurde *in vivo* (Ratte) eine hypolipidämische Wirkung zugeschrieben [21,22].

Tabelle 3: Biologische Wertigkeit, Amino Acid Score (AAS), Proteinverdaulichkeit (PV) und PDAAS für ausgewählte Lebensmittelproteine [23,24,25]

Lebensmittelprotein	Biologische Wertigkeit des Proteins	AAS [%]	PV [%]	PDAAS
Kartoffel	76	100 ¹⁾	n. b.	-
Hühnerei	100	121	98	118
Weizen	55	47	91	42
Rindfleisch	80	94	98	92
Kuhmilch	72	127	95	121
Soja	81	96	95	91
Mais	72	n. b.	n. b.	-
Reis	72	n. b.	n. b.	-
Schweinefleisch	85	n. b.	n. b.	-
Pflanzliche Proteinmischung	55-75	n. b.	n. b.	-

¹⁾ Kartoffelprotein F7020 der Emsland-Stärke GmbH

Eine differenziertere Beurteilung der ernährungsphysiologischen Bedeutung eines Proteins ist mit dem von der FAO/WHO (Food and Agriculture Organization, World Health Organization) empfohlenen Konzept des Protein Digestibility Corrected Amino Acid Score (PDCAAS) möglich. Es wird nicht nur die Zusammensetzung des Proteins an essentiellen Aminosäuren bewertet, ausgedrückt als Amino Acid Score (AAS), sondern ebenso die fäkale Proteinverdaulichkeit (PV) berücksichtigt. Letztere ist ein Maß dafür, inwieweit essentielle Aminosäuren physiologisch verfügbar werden. Der PDCAAS berechnet sich aus dem Gehalt der limitierenden Aminosäure in dem zu untersuchenden Protein im Vergleich zu einem Referenzprotein, multipliziert mit PV [26]. Die limitierende essentielle Aminosäure im Kartoffelgesamtprotein (F7020, Emsland-Stärke GmbH) ist Tryptophan. Deren Gehalt im Kartoffelprotein entspricht jedoch dem des Referenzproteins, so dass sich für das Kartoffelprotein ein Wert von 100 % ergibt. Basierend auf dem AAS stellt es folglich ein hochwertiges Protein dar. PV muss für jedes Protein in entsprechenden in vivo Versuchen separat bestimmt werden. Für Kartoffelproteine liegen hierzu bislang keine Studien vor. Es ist durchaus wahrscheinlich, dass sowohl toxische Glykoalkaloide als auch einzelne Fraktionen des Kartoffelproteins die nutritive Qualität negativ beeinflussen. So ist davon auszugehen, dass die PI-Fraktion die proteolytische Aktivität der Verdauungsenzyme hemmt und die Verdaulichkeit einschränkt. Des Weiteren ist eine sättigungsstimulierende Wirkung des Proteaseinhibitor-II (PI-II) bekannt. Dieser regt die Freigabe des Darmpeptids

Cholecystokinin an, das als hormoneller Botenstoff die Einstellung des Sättigungsempfindens im Gehirn induziert, [27,28].

2.1.4 Vermarktungspotentiale von Kartoffelproteinen

Proteine finden als Lebensmittelzusätze, als Sportler- und Kindernahrung sowie als funktionelle Inhaltsstoffe und Nahrungsergänzungsmittel ein vielfältiges Einsatzspektrum. Für eine erfolgreiche Vermarktung der Kartoffelproteine sind die funktionellen und nutritiven Eigenschaften von entscheidender Bedeutung. Auf die möglichen und etablierten Gewinnungsmethoden wird in Kapitel 2.3 (S. 17) gesondert eingegangen.

Denaturiert gewonnenes Kartoffelprotein zeichnet sich durch eine günstige ernährungsphysiologische Wertigkeit aus. Durch drastische Reaktionsbedingungen werden antinutritive Komponenten wie PI und toxische Glykoalkaloide weitestgehend inaktiviert. Denaturierte Proteine besitzen jedoch vergleichsweise schlechte funktionelle Eigenschaften und sind daher schwieriger in Lebensmittelmatrizes einzuarbeiten. Das Kartoffelgesamtprotein F7020 (Emsland-Stärke GmbH, Emlichheim/Deutschland) beispielsweise besitzt eine geringe Emulgierkapazität und ist nur zu 2-5 % löslich. Daher ist das Verwertungspotential im Nahrungsmittelsektor stark eingeschränkt. Es wird bisher hauptsächlich als günstiger Tierfuttermittelzusatz vermarktet [29].

Umgekehrt verhält es sich bei nativem Kartoffelgesamtprotein. Gute funktionelle Eigenschaften stehen antinutritiven Komponenten (PI, Glykoalkaloide) gegenüber, die in technisch aufwendigen und kostenintensiven Verfahren abgereichert bzw. inaktiviert werden müssen.

Alternative Ansätze verfolgen die Strategie, natives Kartoffelprotein fraktioniert zu gewinnen und für die Hauptfraktionen Patatin und PI verschiedene Anwendungsgebiete gesondert zu erschließen. Das Unternehmen Solanic, ein Ableger des in der Branche führenden Kartoffelstärkekonzerns Avebe U. A. (Veendam/Niederlande), vermarktet PI-II als Appetitzügler sowie als Pharmaceutical zum Schutz vor Hautirritationen und der Behandlung bei Dermatitis sowie der allgemeinen Wundheilung. Natives Patatin wiederum zeichnet sich durch hohe physiologische Wertigkeit aus und ist aufgrund seiner funktionellen Eigenschaften (hohe Löslichkeit und Emulgierwirkung, geschmacksneutral) lebensmitteltechnologisch vielseitig einsetzbar. Es wird als Bestandteil von Kartoffelproteinmischungen, deren Zusammensetzung den

Anforderungen der spezifischen Applikationen angepasst wird, als Lebensmittelzusatzstoff vermarktet [30].

2.2 Gewinnung, Applikation und Vermarktung bioaktiver Peptide

Viele pflanzliche und tierische Proteine enthalten innerhalb der Aminosäuresequenz wertvolle Peptidabschnitte, in der Regel bestehend aus 2-20 Aminosäuren. Als Teil des Präkursor-Proteins entfalten sie keine besondere physiologische Wirksamkeit. Erst durch enzymatische Proteolyse, z.B. während der Verdauung, der Lebensmittelverarbeitung oder durch gezielte Hydrolyse, werden die Peptide in bioaktiver Form freigesetzt und in physiologisch relevanten Konzentrationen resorbiert. Bioaktiven Peptiden wird ein gesundheitsfördernder Nutzen zugesprochen, da sie verschiedene Körperfunktionen beeinflussen und regulieren können. Beispiele hierfür sind die Verstärkung der Mineraladsorption, antimikrobielle Eigenschaften oder auch Effekte auf das Immun-, Nerven bzw. Kardiovaskularsystem. Bislang wurde eine Vielzahl solcher Peptide aus den Hydrolysaten von Milchprotein isoliert und charakterisiert. Bereits während der Lebensmittelherstellung entstehen sie in verschiedenen Milchprodukten wie z.B. Käse, Joghurt, Quark oder Molke [31,32]. Aber auch aus pflanzlichen Proteinhydrolysaten (Reis, Soja, Getreide), aus Fischprotein oder Muskelproteinen von Nutztieren (Huhn, Schwein) konnten biologisch aktive Peptide gewonnen werden [33,34,35,36,37,38,39,40].

2.2.1 Wirkungen in biologischen Systemen

Bioaktive Peptide können abhängig von ihrer Aminosäuresequenz verschiedene Aufgaben im Organismus wahrnehmen. Häufig weisen sie dabei multifunktionelle Eigenschaften auf und initiieren mehr als eine der nachfolgend aufgeführten Wirkungen [40]. Die ersten bioaktiven Peptide wurden 1950 von Mellander charakterisiert [41]. Die aus dem Milchprotein Casein isolierten Caseinophosphopeptide (CPP) bilden mit verschiedenen Mineralen (z. B. Calcium, Magnesium, Eisen, Zink) lösliche Organophosphatsalz-Komplexe, die leichter resorbiert werden können und somit die Bioverfügbarkeit der Minerale deutlich verbessern [42]. Opioid bzw. anti-opioid

wirkende Peptide wurden aus Milchprotein und Weizengluten dargestellt. Diese sind an Opioidrezeptoren wirksam und können einen Effekt auf den Gastrointestinaltrakt und das Nervensystem haben. Des Weiteren lassen sich immunmodulierende Peptide aus Milch-, Soja- und Reisproteinen gewinnen [43,44]. Auch über antithrombische und antivirale Wirkungen ist berichtet worden, auch wenn der wissenschaftliche Beleg hier noch nicht verlässlich ist [45]. Drei weitere wichtige Anwendungsgebiete für Peptide basieren auf antihypertensiven, antioxidativen und antimikrobiellen Wirkungen, auf die im Folgenden detaillierter eingegangen wird.

2.2.1.1 Inhibierende Wirkung auf das Angiotensin-Converting-Enzyme

Mit einer mittleren Prävalenz von über 20 % zählt die arterielle Hypertonie in Industrieländern zu den am häufigsten vorkommenden Erkrankungen. In Deutschland leiden schätzungsweise ca. 25–30 Mio. Menschen an einem erhöhten Blutdruck. Aufgrund des Zusammenhangs mit kardiovaskulärer Morbidität und Mortalität stellt die arterielle Hypertonie einen der Hauptrisikofaktoren für Herzinfarkt und den wichtigsten Risikofaktor für Schlaganfall dar. Von besonderer Bedeutung ist daher die medikamentöse antihypertensive Therapie. Im Wesentlichen stehen fünf Arzneimittelgruppen – Diuretika, β -Rezeptoren-Blocker, Calciumantagonisten, Angiotensin-II-Rezeptoren-Blocker und Angiotensin-Converting-Enzyme-Inhibitoren – für die medikamentöse Behandlung der Hypertonie zur Verfügung [46]. Bioaktive Peptide gehören zur letzteren Klasse und wirken inhibitorisch auf das Angiotensin-Converting-Enzyme (ACE) [47].

Jüngste Forschungsergebnisse haben gezeigt, dass beim enzymatischen Verdau von Milchproteinen (Casein, Molkeprotein), Gelatine, Blutplasma, Fisch und verschiedenen pflanzlichen Proteinen Peptide mit ACE-inhibitorischer Wirkung erzeugt werden [48,49]. Die blutdrucksenkende Wirkung konnte für einzelne Peptide sowohl in Tieren als auch in Humanstudien nachgewiesen werden [50,51,52]. In Tabelle 4 sind einige aus bovinem Casein gewonnene ACE-inhibierende Peptide dargestellt. Vergleicht man die Aminosäuresequenzen der Peptide untereinander, so ist augenscheinlich, dass häufig die Motive Pro-Pro, Ala-Pro oder Ala-Hyp (Hydroxyprolin) am C-terminalen Ende vorkommen. Aus diesem Grund sind möglicherweise besonders prolinreiche Regionen in Proteinen als potentielle ACE-hemmende Peptide interessant [45]. Patatin (z. B. Aminosäuresequenz Q2MY50) hat eine solche prolinreiche Region von Aminosäure 166-172 sowie 13 weitere Prolinabschnitte. Für hydrolysiertes Kartoffelprotein-Isolat

liegen bereits Forschungsergebnisse vor, die eine ACE-inhibitorische Aktivität in vitro belegen und Kartoffelprotein als aussichtsreiche Quelle zur Gewinnung bioaktiver Peptide sehen [53].

Tabelle 4: Aus bovinem Casein gewonnene ACE-inhibierende Peptide [54]

Protein	Fragment	Aminosäuresequenz	IC ₅₀ ¹⁾ ($\mu\text{mol/L}$)	EH ²⁾	PS ³⁾	Referenz
α_{S1} -Casein	f (23-34)	FFVAPFPEVEVFGK	77	+	-	Maruyama & Suzuki, 1982; Maruyama <i>et al.</i> 1985
	f (23-37)	FFVAP	6	+	-	Maruyama <i>et al.</i> 1985
	f (24-27)	FVAP	10	-	+	Maruyama <i>et al.</i> 1987a
	f (25-27)	VAP	2	-	+	Maruyama <i>et al.</i> 1987a
	f (27-30)	PFPE	> 1000	-	+	Maruyama <i>et al.</i> 1987a
	f (28-34)	FPEVFGK	140	+	-	Maruyama <i>et al.</i> 1987a
	f (32-34)	FGK	160	-	+	Maruyama <i>et al.</i> 1987a
	f (104-109)	YKVPQL	22	+	-	Maeno <i>et al.</i> 1998
	f (142-147)	LAYFYFYP	65	+	-	Pihlanto-Leppälä <i>et al.</i> 1998
	f (143-148)	AYFYPE	106 mg/L	+	-	Yamamoto <i>et al.</i> 1994
	f (157-164)	DAYPSGAW	98	+	-	Pihlanto-Leppälä <i>et al.</i> 1998
	f (194-199)	TTMPLW	16	+	-	Maruyama <i>et al.</i> 1987b
	f (197-199)	PLW	36	-	+	Maruyama <i>et al.</i> 1987b
	f (198-199)	LW	50	-	+	Maruyama <i>et al.</i> 1987b
	β -Casein	f (57-64)	SLVLPVPE	39	+	-
f (60-66)		YFPFGPIP	500	-	+	Meisel & Schlimme, 1994
f (74-76)		IPP	5	+	-	Nakamura <i>et al.</i> 1995
f (84-86)		VPP	9	+	-	Nakamura <i>et al.</i> 1995
f (108-113)		EMPFPK	423	+	-	Pihlanto-Leppälä <i>et al.</i> 1998
f (169-174)		KVLPVP	5	-	+	Maeno <i>et al.</i> 1996
f (169-175)		KVLPVPQ	1000	+	-	Maeno <i>et al.</i> 1996
f (177-179)		AVP	340	-	+	Maruyama <i>et al.</i> 1987a
f (177-181)		AVPYP	80	-	+	Maruyama <i>et al.</i> 1987a
f (177-183)		AVPVPQR	15	+	-	Maruyama <i>et al.</i> 1987a
f (179-181)		PYP	220	-	+	Maruyama <i>et al.</i> 1987a
f (181-183)		PQR	> 400	+	-	Maruyama <i>et al.</i> 1987a
f (193-198)		YQQPVL	280	+	-	Pihlanto-Leppälä <i>et al.</i> 1998
f (193-202)		YQQPVLGPVR	300	-	+	Meisel & Schlimme, 1994
κ -Casein		f (25-34)	YIPIQYVLSR	n. b.	-	+
	f (35-41)	YPSYGLNY	n. b.	-	+	Chiba & Yoshikawa, 1991
	f (58-59)	YP	720	+	+	Yamamoto <i>et al.</i> 1994
	f (108-110)	IPP	5	+	-	Nakamura <i>et al.</i> 1995

¹⁾ Benötigte Peptidkonzentration, um ACE um 50 % zu inhibieren

²⁾ durch enzymatische Hydrolyse darstellbar

³⁾ durch Peptidsynthese darstellbar

2.2.1.2 Antioxidative Wirkung

In aeroben Organismen wird etwa 1 % des aufgenommenen Sauerstoffs durch Atmung in reaktive Sauerstoffspezies (in Mitochondrien) und freie Radikale (in Mikrosomen) umgewandelt. Diese hochreaktiven Moleküle reagieren sofort mit körpereigenen Substanzen, schädigen Zellen und Gewebe und induzieren die Inaktivierung einiger Enzyme und die Akkumulation lipidischer Peroxide. Zahlreiche natürliche Substanzen wie Proteine, Proteinhydrolysate und Peptide sowie pflanzliche Polyphenole, Flavonoide, Vitamin C und E können als direkte Radikalfänger, Sauerstoffquencher oder Chelatoren von Metallionen fungieren und die enzymatische und nicht-enzymatische Lipidperoxidation hemmen. In verschiedenen Forschungsarbeiten wurden durch Proteinhydrolyse antioxidativ wirksame Peptide aus tierischen und pflanzlichen Rohstoffen wie Milch, Soja, Ei, Getreide und Kartoffeln dargestellt [55,56,57,58,59,60,61,62]. Es wird angenommen, dass Antioxidantien vor verschiedenen degenerativen Krankheiten wie Alzheimer, Krebs, Arteriosklerose und Diabetes schützen können [63,64,65].

2.2.1.3 Antimikrobielle Wirkung

Zahlreiche kationische Peptide mit antimikrobiellen Eigenschaften konnten in Fisch-, Milch- und Getreideproteinhydrolysaten nachgewiesen werden. Die Wirkung beruht auf einer Interaktion der meist kationischen Peptide mit der negativ geladenen Phospholipidmembran der Bakterien, die die Zellyse der Bakterien zur Folge hat. Neben den weit verbreiteten kationischen Peptiden wurde mittlerweile eine Vielzahl von Peptiden mit bakterizider Wirkung entdeckt, die sich anderen Klassen zuordnen lassen. Tabelle 5 stellt einige Beispiele dieser nicht kationischen Peptide zusammen [66]. Aufgrund der Diversität in Aufbau, Struktur und Wirkungsweise ist es schwer vorherzusagen, ob aus einem Protein mit einer bestimmten Sequenz antimikrobielle Wirkstoffe gewonnen werden können. Als Präkursor scheinen jedoch Proteine besonders vielversprechend, die eine Abwehrfunktion im Organismus, z.B. in Pflanzen haben [67]. Eines der wirkungsvollsten antimikrobiellen Peptide, das in der Literatur beschrieben ist, leitet sich von einem Fragment des Molkeproteins Lactoferrin ab. Durch enzymatische Lactoferrinhydrolyse mit Pepsin lässt sich Lactoferricin darstellen [68]. Weitere Molkeproteine wie α -Lactalbumin und β -Lactalbumin scheinen ebenfalls geeignete Präkursor-Proteine zur Gewinnung antibakterieller Peptide.

Tabelle 5: Beispiele nicht-kationischer Peptide [66]

Klassifizierung/ Beispielpeptide	Peptid- vorkommen	Antimikrobielle Aktivität	Referenz
Anionische Peptide			
Enkelytin	bovin, human	Bakterien	Salzet, 2001; Salzet und Tasiemski, 2001
Peptid B	bovin, human	Bakterien	Salzet, 2001; Salzet und Tasiemski, 2001
Asparaginsäurereiche Peptide			
H-GDDDDDD-OH	ovine	Bakterien	Brogden <i>et al.</i> , 1996
Dermcidin	human	Bakterien	Schittek <i>et al.</i> , 2001
Maximin H5	Amphibien	Bakterien ²⁾	Lai <i>et al.</i> , 2002
Aromatische Dipeptide			
N-β-Ala-5-S-GSH-DHF ¹⁾		Bakterien, Pilze	Leem, 1996
p-Hydroxycinnamaldehyd		Bakterien, Pilze	Leem <i>et al.</i> , 1999
Peptide gewonnen aus O₂-bindenden Proteinen			
aus Hemocyanin	Garnele	Bakterien	Destoumieux-Garzon <i>et al.</i> , 2001
aus Hemoglobin	Zecke	Bakterien	Fogaca <i>et al.</i> , 1999
Lactoferricin	Human, bovin	Bakterien, Viren	Andersen <i>et al.</i> , 2001; Plate <i>et al.</i> , 2006 [92]

¹⁾ N-β-Alanyl-5-S-Glutathionyl-3,4-Dihydroxyphenylalanin

²⁾ nur gram-positive Bakterien

2.2.2 Anwendungspotentiale bioaktiver Peptide

Berücksichtigt man die gesundheitsfördernden Eigenschaften, so haben fermentierte Lebensmittel und andere Nahrungsmittel mit bioaktiven Peptiden einen vielfältigen Anwendungsbereich. Obwohl weitere Grundlagenforschung zur spezifischen physiologischen Wirksamkeit *in vivo* nötig erscheint, werden bereits zahlreiche Produkte mit bioaktiven Peptiden vermarktet. Tabelle 6 gibt eine Zusammenfassung einiger kommerziell erhältlicher Produkte, die bioaktive Peptide aus Milchproteinen mit gesundheitsförderndem Anspruch bzw. Funktion enthalten.

Die pharmazeutische und die Lebensmittelindustrie bemühen sich derzeit intensiv darum, diesen Wachstumsmarkt durch Produkte in den Bereichen Functional Food, Kosmetik, Nutraceuticals und Pharmaceuticals wertschöpfend zu erschließen. Besondere Chancen liegen vor allem in der gestiegenen Nachfrage der Verbraucher nach „natürlichen“ Inhaltsstoffen anstelle vermeintlich schädlicher chemischer Zusätze in Lebensmitteln oder Pharmazeutika [40].

Antioxidative Peptide könnten beispielsweise eine biologische Alternative zu „künstlichen“ Konservierungsstoffen in Lebensmitteln sein. Neuartige Peptide mit antimikrobiellem Effekt könnten in Lebensmitteln zur Konservierung oder pharmakologisch als natürliche Antibiotika Ersatz bzw. Ergänzung zu chemischen Antibiotika sein [66].

Tabelle 6: Kommerziell erhältliche Lebensmittel und Zusatzstoffe mit gesundheitsförderndem bzw. funktionellem Anspruch basierend auf bioaktiven Peptiden

Markenname	Produkttyp	Funktionelle bioaktive Peptide	Gesundheitsfördernder Anspruch/Funktion	Hersteller
Calpis	Sauermilch	Val-Pro-Pro, Ile-Pro-Pro, aus β -Casein und κ -Casein	Blutdruckreduktion	Calpis Co., Japan
Evolus	Fermentiertes Milchgetränk, mit Calc. angereichert	Val-Pro-Pro, Ile-Pro-Pro, aus β -Casein und κ -Casein	Blutdruckreduktion	Valio Oy, Finnland
BioZate	Hydrolysiertes Molkeprotein-Isolat	β -Lactoglobulin-Fragmente	Blutdruckreduktion	Davisco, USA
BioPURE-GMP	Molkeprotein-Isolat	κ -Casein f (106-168) (Glykomakropeptid)	Prävention bei Zahnkaries, Einfluss auf Blutgerinnung, Schutz vor Bakterien und Viren	Davisco, USA
PRODIET F200/Lactium	Aromatisiertes Milchgetränk, Süßwaren, Kapseln	α_{s1} -Casein f (91-100)	Minderung von Anstrengungseffekten	Ingredia, Frankreich
Festivo	Fermentierte fettarmer Hartkäse	α_{s1} -Casein f (1-9), f (1-6), f (1-7)	–	MTT Agrifood Research, Finnland
Cystein Peptide	Inhaltsstoff/Hydrolysat	Peptid aus Milchprotein	Hilfe zur Energiesteigerung und bei Schlafstörungen	DMV International, Niederlande
C12	Inhaltsstoff/Hydrolysat	Peptid aus Casein	Blutdruckreduktion	DMV International, Niederlande
Capolac	Inhaltsstoff	Caseinphosphopeptid	Hilft bei Mineralabsorption	Arla Foods Ingredients, Schweden
Peptopro	Inhaltsstoff/Hydrolysat	Peptid aus Casein	Steigerung der Leistung beim Sport und der Muskelerholung,	DSM Food Specialties, Niederlande
Vivinal Alpha	Inhaltsstoff/Hydrolysat	Peptid aus Molke	Hilfe zur Entspannung und beim Schlaf	Borculo Domo Ingredients, Niederlande

Haupteinsatzgebiete von biologisch aktiven Peptiden liegen in der Therapie von Zivilisationskrankheiten und von Risikofaktoren, zu denen unter anderem kardiovaskuläre Komplikationen, Krebs, Übergewicht und Osteoporose zählen. Diskutiert wird der Einsatz von CPP als Zusatzstoff in Functional Foods zur Prävention von Osteoporose und Zahnkaries. Verschiedene Studien zeigen, dass CPPs nicht nur die Calciumresorption verbessern, sondern auch die Knochenremineralisierung stimulieren. Die Aufnahme antioxidativer Peptide über die Nahrung oder über Nahrungsergänzungsmittel kann sinnvoll sein, da Antioxidantien im menschlichen Körper eine protektive Wirkung gegen reaktive Sauerstoffspezies und freie Radikale entfalten.

Bioaktive Verbindungen mit antihypertensiven Effekten können alternativ oder ergänzend zur klassischen Therapie einer Hypertonie eingesetzt werden, um Folgeerkrankungen wie z.B. Arteriosklerose zu verhindern. Wegen der Bedeutung der Ernährung bei Prävention und Behandlung von Bluthochdruck besteht ein großes wirtschaftliches Interesse, Nahrungsmittel mit antihypertonischer Wirkung zu entwickeln. Zu den wirksamsten Peptiden zählen die Tripeptide Valyl-prolyl-prolin (Val-Pro-Pro) und Isoleucyl-prolyl-prolin (Ile-Pro-Pro), die im vermarkteten Sauermilchprodukt Calpis[®] enthalten sind und in Placebo-kontrollierten Humanstudien den Blutdruck hypertensiver Patienten (bei einer Äquivalenttagesdosis von 2,6 mg bioaktiven Peptiden) signifikant senkten [69].

2.3 Prozesstechnische Methoden zur Proteingewinnung aus KFW

Die Etablierung eines ökonomischen Prozesses zur industriellen Wertschöpfung der Kartoffelproteine im KFW stellte in den letzten Jahrzehnten eine große Herausforderung an die Technik dar. Die schlechte Filtrierbarkeit des faserhaltigen KFWs, der hohe Mineraliengehalt sowie nicht unwesentliche Gehalte an toxischen Glykoalkaloiden, Polyphenolen, organischen Säuren, Kohlenhydraten und Aminosäuren machen KFW zu einem prozesstechnisch anspruchsvollen Medium. Darüber hinaus können sich toxische und störende Begleitstoffe des KFW im Produkt anreichern und die Aufarbeitung sehr aufwendig machen.

2.3.1 Stand der Technik

Bereits ab den 1970er Jahren wurden einfache Verfahren untersucht, mit deren Hilfe sich das Kartoffelgesamtprotein aus dem KFW entfernen lässt. Hierzu zu zählen sind die so genannte Dampf-induzierte Hitzeokoagulation und die Säurefällung [70,71,72,73,74,75]. Antinutritive Bestandteile werden unter diesen Reaktionsbedingungen weitestgehend reduziert bzw. inaktiviert. Die geringen Kosten verbunden mit vergleichsweise niedrigem Investitionsaufwand favorisieren diese Trennmethode bis dato bei der industriellen Wertschöpfung des Kartoffelproteins. Ein gravierender Nachteil besteht jedoch darin, dass die Proteine in denaturierter Form isoliert werden. Damit verbunden sind im Allgemeinen eine geringe Stickstofflöslichkeit und ein nahezu vollständiger Verlust der funktionellen Eigenschaften, so dass das Anwendungspotential in Lebensmitteln stark limitiert ist [76,77,78]. Lediglich mit Zitronensäure, Eisenchloridlösung bzw. organischen Lösemitteln konnten Knorr et al und Koningsvelt et al. Proteinpräzipitate mit relativ guten funktionellen Eigenschaften und hohem Aschegehalt erzeugen [75,79]. Neben adsorptiven Fällungen mit Bentoniten oder Carboxymethylcellulose wurden verschiedene Entwässerungstechniken als alternative Aufarbeitungsstrategien vorgeschlagen [80,81]. Durch Dekantieren und Zentrifugation in Kombination mit filtrativen Techniken (Ultrafiltration, Umkehrosmose) lässt sich natives Proteinkonzentrat mit günstigeren physikalisch-chemischen Eigenschaften abtrennen [78,82,83,84]. Obwohl im Labormaßstab vielversprechende Ansätze realisiert werden konnten, erschwerte die Beschaffenheit des KFW im größeren Maßstab den Trennprozess. Insbesondere das Problem des Membranfoulings erhöhte den Kostenaufwand erheblich. Darüber hinaus beeinflussen die enzymatische Verbräunung der Polyphenole durch Polyphenoloxidasen sowie die Anreicherung gesundheitsschädlicher Glykoalkaloide die sensorischen und nutritiven Eigenschaften der isolierten Proteine negativ. Daher richtet sich der Fokus verschiedener Forschergruppen in jüngster Zeit darauf, (a) spezifische hochwertige Fraktionen aus der Proteinmatrix zu isolieren und (b) dabei niedermolekulare Bestandteile, insbesondere Störkomponenten mit antinutritiven Eigenschaften, zu entfernen. Als Methoden der Wahl haben sich vor allem chromatographische Verfahren durchgesetzt. Ein großtechnischer Ansatz wurde 1999 von Strætkvern et al. vorgestellt. Mittels der so genannten Expanded Bed Adsorption (EBA) ließ sich eine bioaktive Patatinfraction

von Fasern, Mineralien und Pigmenten aus dem KFW abtrennen und in Lebensmittelqualität isolieren.

2.3.2 Membranadsorbertechnologie

Die Integration der Membrantechnik in chromatographische Verfahren führte in den vergangenen Jahren zur Entwicklung neuartiger Prozessierungseinheiten, so genannter Membranadsorber (MA). In MA-Modulen werden modifizierte makroporöse Celluloseacetat-Membranen verwendet, die z. B. nach dem Prinzip der Ionenaustausch-Chromatographie trennen. Die Membranen zeichnen sich dadurch aus, dass die Porenninnenoberflächen mit funktionellen kationischen oder anionischen Austauschergruppen versehen wurden [85]. In Tabelle 7 sind Beispiele für funktionelle Ionenaustauschergruppen dargestellt.

Tabelle 7: Beispiele für funktionelle Gruppen an Ionenaustauschermembranen [86]

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

Die MA-Technologie verbindet die Vorteile konventioneller Ionenaustausch-Chromatographie-Säulen hinsichtlich Trennleistung und Kapazität mit denen der Membrantechnik [86,87]:

- hoher Durchsatz bei geringer Prozesszeit (keine Diffusionslimitierung),
- unkompliziertes Scale-up,
- vergleichsweise geringe Herstellungskosten,
- milde Reaktionsbedingungen,
- einfache Handhabung,
- geringer Energieaufwand.

MA binden selektiv geladene Moleküle und können somit bei der Aufreinigung von Proteinen, Endotoxinen und Viren aus komplexen Medien eingesetzt werden [88,89]. Die Einsatzgebiete reichen von der Aufarbeitung von Fermentationsbrühen [90] bis zur

Isolierung von Proteinen aus nachwachsenden Rohstoffen. Als Beispiele hierfür sind Untersuchungen zur Prozessierung von Molke und Molkeprodukten zu nennen [20,91,92,93].

Eine Weiterentwicklung der klassischen MA stellen die neuartigen, tangential angeströmten MA in Wickelmodulform, die so genannten SartobindDirect-Module (Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen/Deutschland), dar. Der Aufbau eines Sartobind Direct-Wickelmoduls ist in Abbildung 3 schematisch dargestellt.

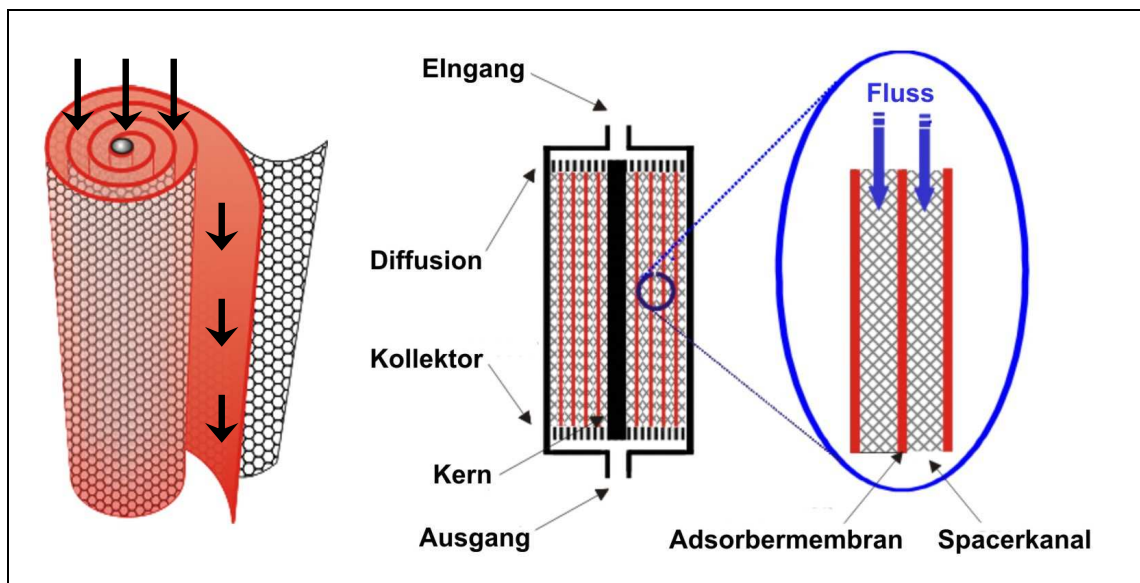


Abbildung 3: Schematischer Aufbau eines MA-Wickelmoduls

Im Gegensatz zu herkömmlichen MA-Modulen, bei denen das Medium die Membranlagen frontal im Dead-end-Modus durchströmt, wird bei den SartobindDirect-Wickelmodulen der Mediumstrom mehrfach tangential an den Membranen entlanggeleitet. Durchlässige Polymerspacer trennen die Membranlagen und ermöglichen so ein ungehindertes Beladen der Module mit Medium bei vergleichsweise hohen Flussraten und geringen Gegendrücken. Weitere Vorteile dieser Bauart liegen in der Vermeidung von Verblockungen und der damit verbundenen Möglichkeit der Rezirkulierung des Mediums. Dabei wechselwirken die zu adsorbierenden Proteine mit den funktionellen Gruppen der Membranoberfläche und binden aufgrund unterschiedlicher Nettoladungen selektiv an die Ionenaustauschergruppen. Ungeladene Proteine und größere Partikel hingegen, wie z. B. unlösliche Stärke oder Fasern, passieren das Modul ungehindert, so dass eine Vorbehandlung des KFWs durch Mikrofiltration entfällt.

Nach der erfolgten Beladung können die Wertstoffe durch eine geeignete Elutionsstrategie wieder von den Bindungsplätzen auf der Membran abgelöst werden. Es ist in diesem Elutionsschritt z.B. möglich, die adsorbierten Komponenten mittels eines Salz- oder pH-Gradienten fraktioniert zu eluieren. Das sequentielle Arbeiten mit Beladungs- und Elutionsschritt erlaubt zudem die Verwendung kleinerer Volumina bei der Elution, so dass das Zielprodukt im Eluat sogar aufkonzentriert werden kann, was zu einer sinnvollen Verringerung der Prozessvolumina führt. Der Elutionsschritt bewirkt gleichzeitig eine Regeneration der Membranadsorber für den nächsten Beladungszyklus. Eine vollständige Reinigung wird durch einen Spülvorgang mit Natronlauge erreicht.

Weitere Vorteile liegen im einfachen Scale-Up der Module. Zum Einen lassen sich die nach Art einer Küchenrolle aufgewickelten Membranflächen einfach vergrößern, zum Anderen lassen sich mehrere Module in Reihe oder auch parallel schalten. Auch kontinuierliches Arbeiten wird durch den Einsatz entsprechender paralleler Module in Form einer Tandemanlage möglich, wobei die Einzelmodule im Wechsel beladen oder eluiert werden, so dass keine Prozesstotezeiten auftreten.

3 Experimenteller Teil I:

Gewinnung und Charakterisierung von Proteinfractionen aus KFW

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Gewinnung bioaktiver, nativer Kartoffelproteinfractionen über die Membranadsorber-Technologie untersucht. Als Rohstoff diente Kartoffelfruchtwasser der Firma Emsland-Stärke GmbH, Emlichheim/Deutschland, das als Nebenstrom im Stärkegewinnungsprozess anfiel. Allgemein lässt sich das Verfahren in drei Prozessschritte gliedern: In der ersten Prozessstufe wurden Membranadsorber in Wickelmodulform mit starken Anionen-(Q-Typ)- bzw. Kationen-(S-Typ)-Austauschermembranen zur Fraktionierung der Kartoffelproteine eingesetzt. Hierzu wurden zunächst kleine Module getestet, die sich hinsichtlich des verbauten Polymerspacerstyps unterschieden. Danach wurde ein Scale-Up mit größeren Modulen untersucht. Die jeweiligen Q- und S-Fractionen wurden im nächsten Schritt getrennt voneinander durch Ultrafiltration aufkonzentriert und durch Diafiltration entsalzt. Die aufgereinigten Protein-Lösungen wurden abschließend durch Sprühtrocknung und Gefriertrocknung konfektioniert. Abschließend wurden die erhaltenen Produkte bioanalytisch charakterisiert.

3.1 Fraktionierung von Patatin und Proteaseinhibitoren aus Kartoffelfruchtwasser mit SartobindDirect-Wickelmodulen

Die Versuche zur Fraktionierung des KFW mit SartobindDirect-Wickelmodulen wurden an einer automatisierten Technikumsanlage am Institut für Technische Chemie (TCI) der Leibniz Universität Hannover durchgeführt. Der Aufbau und die Prozessführung basieren auf Arbeiten von R. Steinhof mit klassischen MA [7]. Daher wurde zunächst eine prozesstechnische Optimierung der Anlage vorgenommen, die im Folgenden erläutert wird.

3.1.1 Prozesstechnischer Aufbau und Betriebsweise der Fraktionierungsanlage

Die modifizierte Fraktionierungsanlage ist in Abbildung 4 schematisch dargestellt. Sie besteht aus einem Pumpkreislauf (gelbe Pfeile), in dem das Medium (KFW) während der Beladung rezirkuliert werden kann. Dabei ist es möglich, über eine programmierbare Ventil- und Pumpensteuerung entweder beide Module gleichzeitig oder nur eines separat zu durchströmen. An den Kreislauf gekoppelt ist ein lineares Pumpsystem (grüne Pfeile), mit dem die MA einzeln oder kombiniert mit Spül- oder Elutionsmedien durchströmt werden können. Der computergesteuerte Betrieb der Anlage wird online über nachgeschaltete Analysegeräte überwacht und Messdaten wie UV-Absorption, Leitfähigkeit, Druck und Durchflussgeschwindigkeit aufgezeichnet. Ergänzend konnten dem Prozess Proben entnommen und offline analysiert werden.

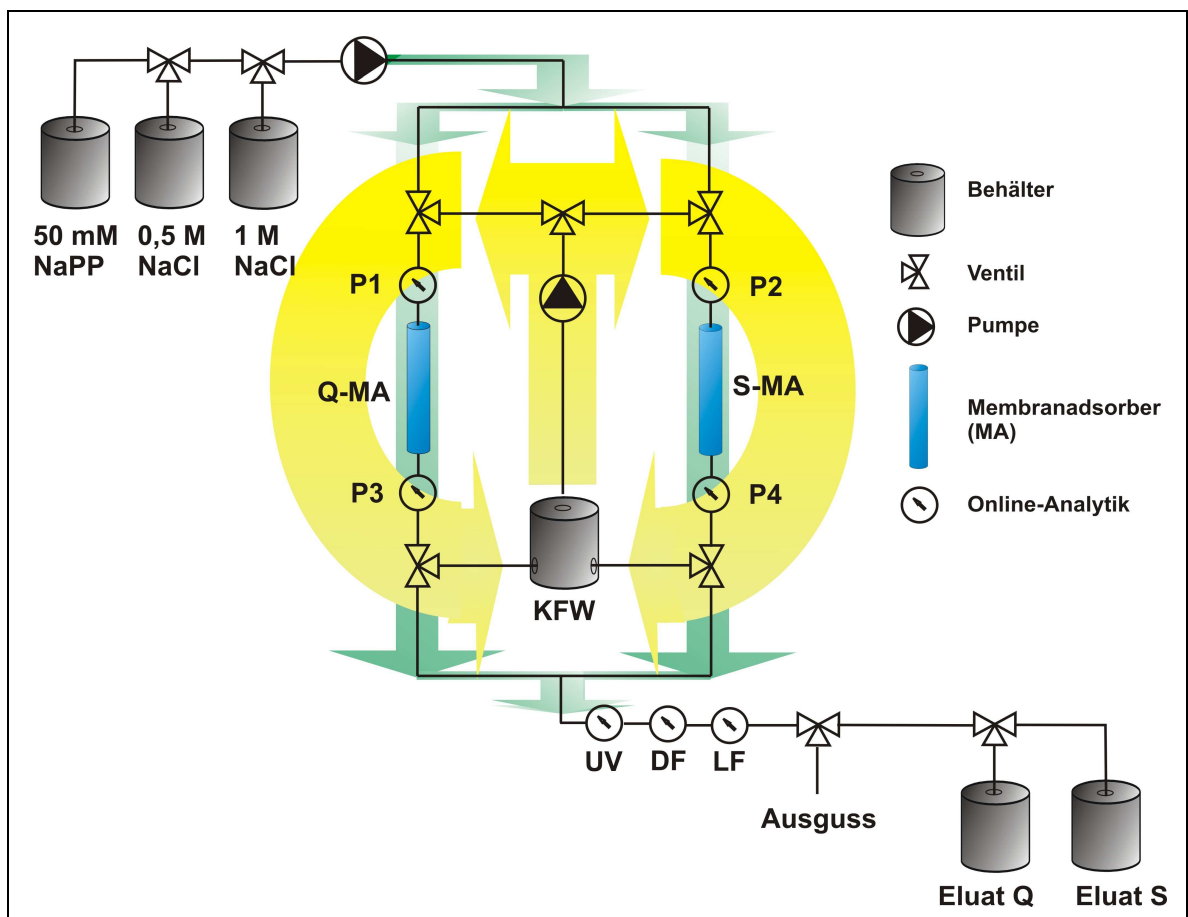


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Technikumsanlage zur Isolierung von Kartoffelproteinen aus Kartoffelfruchtwasser mit SartobindDirect-Wickelmodulen

Im Einzelbetrieb wurde nur eine der Fraktionen (Q oder S) aus KFW isoliert. Beim Parallelbetrieb wurden beide Fraktionen abgetrennt. Q- und S-Module wurden gemeinsam beladen und gewaschen sowie nacheinander eluiert, regeneriert und äquilibriert. Durch die Modifikationen im Aufbau der Anlage, inklusive der Optimierung von Steuerung und Prozessführung, ist zusätzlich kontinuierliches sequenzielles Arbeiten im Sinne einer Tandemanlage möglich. Dabei werden die parallel angeordneten Einzelmodule im Wechsel beladen bzw. eluiert, so dass Totzeiten bei der Fraktionierung vermieden werden. Auf die Zeitbilanz wird in Kapitel 3.6 gesondert eingegangen.

Der Fraktionierungsprozess wurde bei Raumtemperatur durchgeführt und lässt sich in fünf Fraktionierungsschritte einteilen:

- (1) Beladen der MA
- (2) Waschen der MA
- (3) Elution (a) des Q-Moduls bzw. (b) des S-Moduls
- (4) Regeneration (a) des Q-Moduls bzw. (b) des S-Moduls
- (5) Äquilibrieren der MA

Optional: Reinigung mit 0,1 M Natronlauge

Die Parameter der Fraktionierungsschritte wurden auf Grundlage der Arbeiten von R. Steinhof und F. Menzel an die modifizierte Technikumsanlage angepasst und optimiert [5,7]. Detaillierte Angaben zur Abfolge der Fraktionierungsschritte und zu den Abbruchbedingungen sind dem Anhang 6.2.1 (S. 103) zu entnehmen. Zur Fraktionierung der Kartoffelproteine wurden von der Firma Sartorius Stedim Biotech GmbH (Göttingen/Deutschland) verschiedene SartobindDirect-Wickelmodulen des Q- und S-Typs bereitgestellt, die sich hinsichtlich der Dimension, der Membranfläche und des verwendeten Polymerspacer-Typs unterscheiden. Tabelle 8 gibt eine Übersicht über die Eigenschaften der verschiedenen Modultypen.

Es wurde zwischen kleinen Modulen mit einem Totvolumen von etwa 500 mL (Q500, S500) und großen Modulen mit einem Totvolumen von 1.000 mL (Q1000, S1000) unterschieden. Die Membranspacer der Module bestehen aus Vliespolymer (V) oder Extruderpolymer (E) und erzeugen Spacerkanäle von 250 μm oder 500 μm Durchmesser. Abhängig von der Größe der Spacerkanäle und des verwendeten Polymerspacers variieren die erhaltenen Membranflächen. Größere Spacerkanäle führen

dazu, dass sich weniger Membranlagen im Modul aufwickeln lassen, woraus eine geringere Membranfläche resultiert. Bei gleicher Spacerkanalgröße (250 μm) wiesen Module mit Vliespolymerspacer verglichen mit Extruderpolymerspacer etwa 10 % mehr Membranfläche auf. In den folgenden Versuchen wurde die Eignung der unterschiedlichen Modultypen zur Prozessierung von KFW untersucht.

Tabelle 8: Modultypen der verwendeten SartobindDirect-Wickelmodule

Bezeichnung	Ionenaustauscher- Typ	Polymerspacer- Typ	Spacerkanal [μm]	Membranfläche [m^2]
Q500V250	Q	V	250	1,482
S500V250	S	V	250	1,543
Q500E250	Q	E	250	1,336
S500E250	S	E	250	1,353
Q500E500	Q	E	500	0,904
S500E500	S	E	500	0,933
Q1000V250	Q	V	250	4,090
S1000V250	S	V	250	3,940
Q1000E250	Q	E	250	3,475

3.1.2 Fraktionierung mit Q500- und S500-Modulen

Zunächst wurde mittels der kleinen 500 mL-Module (Q500, S500) mit 0,9-1,5 m^2 Membranfläche getestet, wie sich die Wahl der verbauten Polymerspacer (Vlies-, Extruderpolymer) auf das Elutionsprofil und die Fraktionierungsleistung der Membranadsorbermodule auswirkt. Die Module wurden in 5 aufeinander folgenden Zyklen ohne Reinigungsschritt eingesetzt. Die Beladung mit 15 L verdünntem KFW (1:5 mit VE-Wasser verdünnt) erfolgte rezirkulativ 15 min bei einem Volumenstrom (\dot{V}) von 6 L/min. KFW wurde dabei im Überschuss eingesetzt, um die maximale Bindungskapazität der Module für die Proteine auszuschöpfen. Danach wurden die Module bei $\dot{V} = 2$ L/min mit 20 mM NaPP gewaschen, mit 0,5 M NaCl eluiert, mit 1 M NaCl regeneriert und schließlich mit 20 mM NaPP äquilibriert. Die Messung der UV-Absorption bei 280 nm erlaubte die Detektion der Proteine. Die Leitfähigkeitsmessung diente der Überwachung des Salzgradienten während der Elution.

3.1.2.1 Bewertung der Online-Prozessdaten

In Abbildung 5 sind exemplarisch die UV- und Leitfähigkeitschromatogramme für die Zyklen 1, 3 und 5 der Fraktionierung mit der E500-Modulreihe dargestellt. Für die anderen Modultypen wurden analoge UV-Profile erhalten.

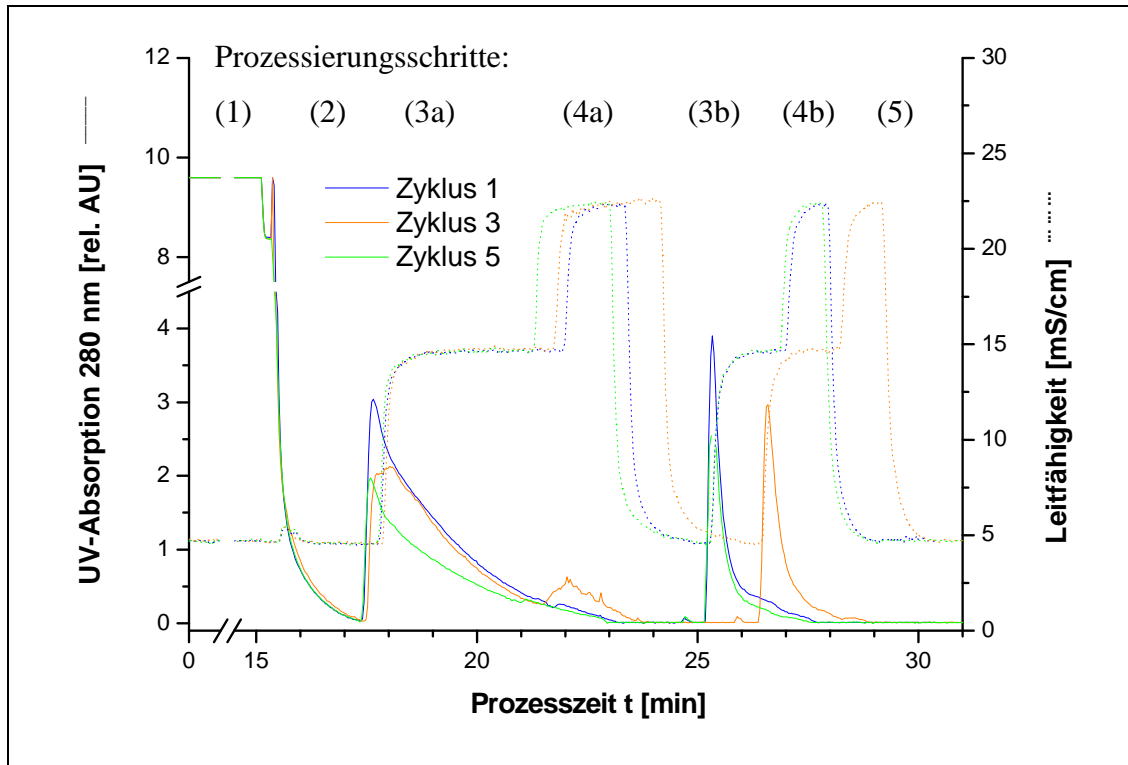


Abbildung 5: Prozessdiagramme der Zyklen 1, 3 und 5 mit Q/S500E500-Modulen; (1) Beladen, (2) Waschen, (3a) Elution des Q-Moduls, (3b) Elution des S-Moduls (4a) Regeneration des Q-Moduls, (4b) Regeneration des S-Moduls, (5) Äquilibrieren

Bei der Beladung mit verdünntem KFW (1) konnte keine Veränderung der UV-Absorptionswerte festgestellt werden. Der UV-Messbereich wurde wegen hoher Proteingehalte und der Trübung des KFW deutlich überschritten. Im anschließenden Waschschritt (2) sank die UV-Absorption gleichförmig mit steigender Zykluszahl. Der Anstieg der Leitfähigkeitswerte auf 15 mS/cm bzw. 25 mS/cm veranschaulicht die danach separat erfolgten Elutions- und Regenerationsschritte des Q-Moduls (3a, 3b) bzw. des S-Moduls (4a, 4b). Deutlich erkennbar ist die stetige Abnahme der Peakintegrale pro Zyklus verbunden mit einer relativen Zunahme des UV-Peaktailings. Abschließend wurden beide Module für den nächsten Zyklus äquilibriert (5), zu erkennen an der Abnahme des Leitfähigkeitswertes auf 5 mS/cm.

In Tabelle 9 sind die entsprechenden Prozessschrittvolumina der verschiedenen Modultypen zusammengefasst.

Tabelle 9: Prozessschritt volumina der Modultypen Q/S500 V250, Q/S500 E250 und Q/S500 E500 in fünf aufeinanderfolgender Zyklen

Modultyp	Zyklus	Prozessschritt volumina [L]				
		Waschen Q+S	Elution Q	Regener. Q	Elution S	Regener. S
Q/S500 V250	Z1	6,2	9,7	3,8	2,5	3,2
	Z2	5,6	8,6	3,4	2,4	3,4
	Z3	5,9	6,1	3,2	1,8	2,6
	Z4	6,0	6,4	2,7	1,9	2,4
	Z5	5,8	6,2	2,9	2,1	2,5
	<i>Mittelwert $m \pm s$</i>		$5,9 \pm 0,2$	$7,4 \pm 1,5$	$3,2 \pm 0,4$	$2,1 \pm 0,3$
Q/S500 E250	Z1	8,0	10,1	3,9	4,0	3,1
	Z2	7,9	9,7	4,2	3,6	3,3
	Z3	7,9	6,7	3,2	3,1	2,5
	Z4	7,6	6,4	2,9	3,3	2,7
	Z5	7,8	6,3	2,6	2,9	2,6
	<i>Mittelwert $m \pm s$</i>		$7,8 \pm 0,1$	$7,8 \pm 1,7$	$3,4 \pm 0,6$	$3,4 \pm 0,4$
Q/S500 E500	Z1	3,2	7,8	3,2	2,4	3,5
	Z2	3,5	7,6	4,4	2,4	2,3
	Z3	3,4	6,9	5,3	2,7	2,5
	Z4	3,2	7,0	3,5	2,5	2,2
	Z5	3,2	6,5	4,1	2,4	2,4
	<i>Mittelwert $m \pm s$</i>	<i>$m \pm s$</i>	$3,3 \pm 0,1$	$7,2 \pm 0,5$	$4,1 \pm 0,7$	$2,5 \pm 0,1$

Die Volumina an Pufferlösung zum Waschen der Membranen verändern sich mit steigender Zyklenzahl nicht signifikant (Standardabweichung $s = 0,1-0,2$). Allerdings hat der Modultyp deutliche Auswirkung auf das Waschschrivolumen. Der E500-Typ liegt im Mittel bei 3,3 L, die E250-Module hingegen bei 7,8 L und die V250-Module bei 5,9 L. Die Unterschiede resultieren aus den Spacerkanaldurchmessern (E250 vs. E500) und Spacertypen (E250 vs. V250). Größere Kanaldurchmesser begünstigen einen schnellen Waschprozess. Partikel im KFW können sich weniger leicht zwischen den Membrananlagen festsetzen. Bei den Spacertypen hingegen kann an dieser Stelle nicht beurteilt werden, ob stärkere Wechselwirkungen zwischen KFW und Membran verantwortlich sind oder ob filtrative Effekte der Spacertypen einen größeren Einfluss ausüben.

Bei der Elution und Regeneration hat die Wahl des Modultyps eine untergeordnete Auswirkung auf die Prozessschritt volumina. Grundsätzlich steigt das benötigte Prozessschritt volumen mit verstärkten Peaktailing-Effekten und sinkt mit verringerter Proteinelution. Beide Effekte werden durch Membranverunreinigungen (Fouling)

hervorgerufen. Auffällig ist jedoch, dass mit steigender Zyklenzahl tendenziell geringere Prozessschrittvolumina nötig sind. Dies ist mit der qualitativen Beobachtung in Einklang zu bringen, dass die UV-Absorption und damit der eluierte Proteingehalt pro Zyklus abnehmen. Peaktailing-Effekte scheinen dadurch quantitativ überlagert zu werden.

3.1.2.2 Bestimmung der dynamischen Bindungskapazitäten

Die Produktivität der Membranmodule lässt sich über die dynamische Bindungskapazität prüfen und bewerten. Dazu wurde die Proteinfracht der Eluate aus Prozessierungsschritt (3) mit Hilfe des Proteinassays nach Lowry bestimmt und die Ergebnisse in Beziehung zur Membranfläche gesetzt. In den Abbildung 6 und Abbildung 7 sind die Ergebnisse der Membranadsorber-Wickelmodule des Q- bzw. S-Typs gezeigt.

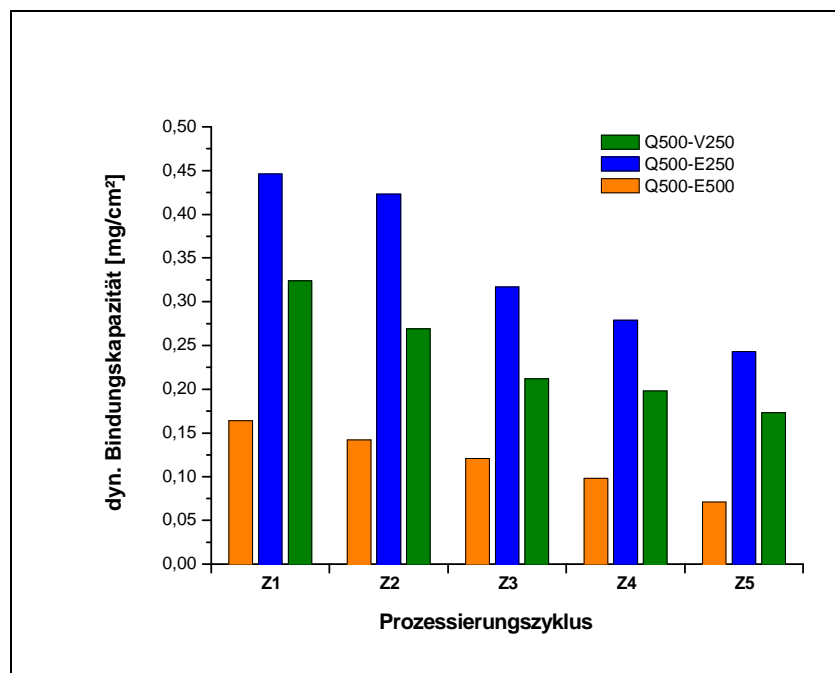


Abbildung 6: Dynamische Bindungskapazitäten von SartobindDirect-Wickelmodulen der Q500-Modulreihe

Beim Q-Membrantyp konnte mit dem E250-Modul eine maximale Bindungskapazität von $0,44 \text{ mg/cm}^2$ im ersten Zyklus erzielt werden. In fünf Zyklen lag sie durchschnittlich bei $0,34 \text{ mg/cm}^2$ und damit um über 40 % höher als beim V250-Modul mit $0,24 \text{ mg/cm}^2$. Auffällig ist die geringe durchschnittliche Bindungskapazität von $0,12 \text{ mg/cm}^2$ des E500-Moduls. Wegen des größeren Spacerkanaldurchmessers ist

offenbar die Wechselwirkung des Zielproteins mit den Linkermolekülen der Membranoberfläche eingeschränkt. Eine effektive Fraktionierung mit E-500-Modulen ist unter den Prozessparametern nicht möglich. Eine längere Beladungszeit oder geringere Beladungs-Volumenströme könnten die Trennleistung verbessern. Allerdings würde sich dadurch auch die Fraktionierungszeit deutlich erhöhen.

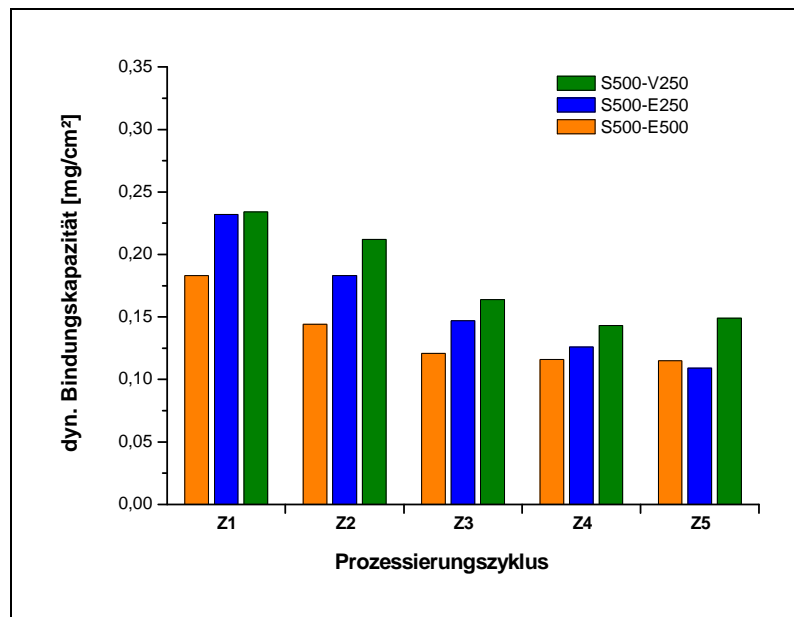


Abbildung 7: Dynamische Bindungskapazitäten von SartobindDirect-Wickelmodulen der S500-Modulreihe

Beim S-Membrantyp erreichte das V250-Modul mit $0,23 \text{ mg/cm}^2$ im ersten Zyklus die höchste Bindungskapazität. Die durchschnittlichen Bindungskapazitäten lagen bei $0,18 \text{ mg/cm}^2$ (V250-Modul), $0,16 \text{ mg/cm}^2$ (E250-Modul) bzw. $0,14 \text{ mg/cm}^2$ (E500-Modul). Der Spacerkanaltyp hat bei der Fraktionierung der S-Fraktion eine vergleichsweise geringe Auswirkung auf die Trennleistung. Bei der Fraktionierung mit Q500- und S500-Modulen kann eine deutliche Abnahme der Bindungskapazität von bis zu 20 % pro Fraktionierungszyklus festgestellt werden. Dies stützt die Bewertung der online-UV-Messdaten und der Prozessschrittvolumina und bestätigt Leistungseinbußen bei der Separation der Proteine aus KFW. Die Ursache hierfür könnte sein, dass sich auf der Membran unlösliche Partikel oder Stärkerückstände aus dem KFW anlagern und so zu Membranfouling führen. Die Bildung einer Foulingschicht beeinträchtigt den konvektiven Stofftransport zur Membran und zugleich die Diffusion der Zielmoleküle in die Membran. Um dies zu überprüfen, wurden der Druckabfall und die Trübung des KFW während der Beladung untersucht.

3.1.2.3 Bewertung der Moduldrücke und der Trübungsverläufe

Aus der Differenz des Drucks an Moduleingang und -ausgang errechnet sich der Druckabfall. Der Anstieg dieses Kontrollparameters während der Beladung kann darauf hinweisen, dass Verblockungen im Modul den konvektiven Stofftransport behindern. Die Auswertung der online-Manometerdaten ergaben, abhängig vom Modultyp, durchschnittliche Druckabfälle von 0,35 bar (E250, E500) bzw. 0,65 bar (V250). Es ließen sich jedoch weder kennzeichnende Anstiege nach mehreren Zyklen ermitteln, noch Tendenzen beim Druckabfall während der Beladung erkennen, die eindeutige Rückschlüsse auf Membranfouling zuließen. Es konnte wegen der hohen Durchflussgeschwindigkeit und des geringen Modulgedrucks jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass Druckveränderungen auftraten, die außerhalb der Messgenauigkeit lagen. Daher wurde ergänzend die filtrative Wirkung der Membranadsorber über Messungen der relativen nephelometrischen Trübungsabnahme im KFW untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 8 gezeigt.

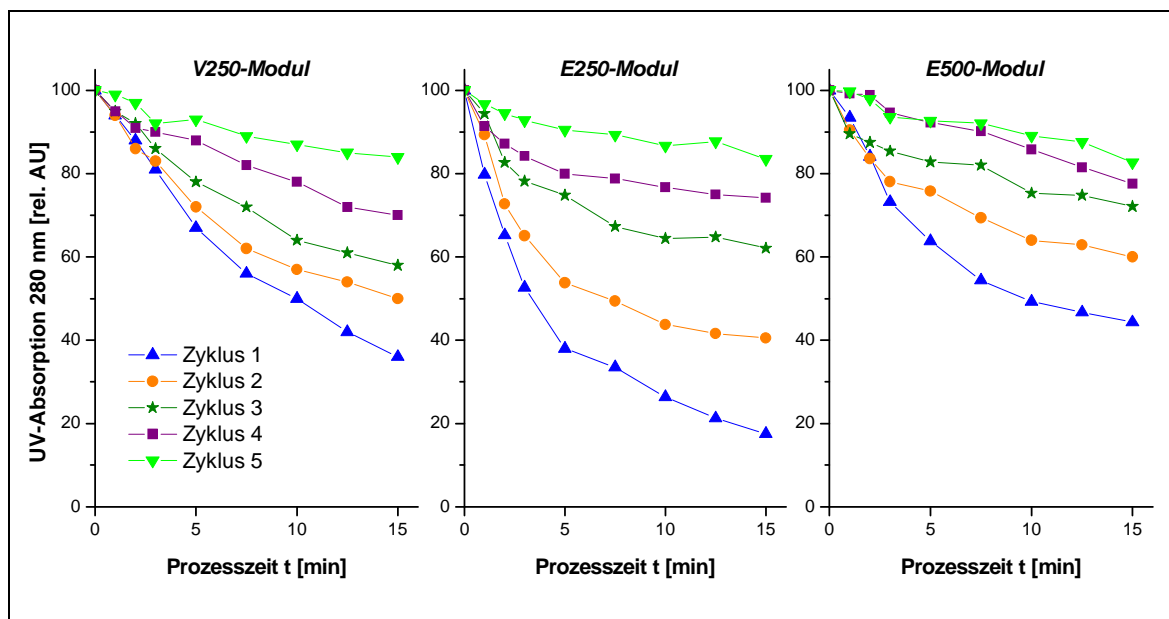


Abbildung 8: Nephelometrische Trübung des KFW während der Beladung in 5 Fraktionierungszyklen: Fraktionierung mit V250-Modulen (links), E250-Modulen (mitte) und E500-Modulen (rechts)

Die graphische Darstellung der Trübungswerte bestätigt, dass während des ersten Zyklus ein Großteil der für die Trübung verantwortlichen Schwebstoffe im Modul filtrativ zurückgehalten wurde. In den darauf folgenden Zyklen sinkt dieser Effekt, obwohl entsprechende Wasch- und Regenerationsschritte die ursprüngliche Modulbedingung wiederherstellen sollten. Dies kann als Indiz dafür gewertet werden,

dass sich in den Modulen bis zu einem gewissen Grad Verunreinigungen anlagern, die gleichermaßen die Bindungskapazitäten und die Produktivität verringern.

Vergleicht man die Modultypen untereinander, so zeigt der E500-Modultyp einen geringeren filtrativen Effekt. Dies resultiert aus den vergrößerten Spacerkanälen und der konstruktionsbedingten, reduzierten Anzahl an Membranlagen. Deutliche Unterschiede zwischen V250- und E250-Modulen konnten nicht festgestellt werden. Tendenziell scheinen Spacer aus Vlies gegenüber Extruderpolymer weniger Partikel zurückzuhalten.

3.1.2.4 Zusammenfassung und Bewertung der Modultypen

Die Wahl der verwendeten Modultypen wirkt sich auf die Leistungsfähigkeit der Fraktionierung von Kartoffelproteinen aus. Module mit größeren Spacerkanälen lassen sich mit geringeren Prozessschrittvolumina waschen und äquilibrieren. Allerdings schränkt die verminderte Bindungskapazität die Leistungsfähigkeit ein. Möglicherweise könnten verlängerte Beladungszeiten die Bindung der Zielmoleküle verbessern. Die höchsten durchschnittlichen Bindungskapazitäten erzielte das Q500E250-Modul mit $0,34 \text{ mg/cm}^2$ und das Q500V250-Modul mit $0,18 \text{ mg/cm}^2$. Bei allen Modulen sanken die Bindungskapazitäten und die Produktivität mit steigender Zyklenzahl um bis zu 20 % pro Zyklus. Über Trübungswertmessungen konnte gezeigt werden, dass Membranfouling durch Verunreinigungen im KFW ursächlich ist.

3.1.3 Fraktionierung mit Q1000- und S1000-Modulen

Mittels großer SartobindDirect-Wickelmodule mit verdoppeltem Totvolumen (1.000 mL) und dreifacher Membranfläche ($3,5\text{-}4 \text{ m}^2$) wurde das Scale-Up untersucht. Aus den Testungen verschiedener Q/S500-Modultypen ging hervor, dass Vlies- und Extruderpolymer-Module mit Spacerkanälen von $250 \mu\text{m}$ am leistungsfähigsten sind. Das Scale-Up wurde daher mit entsprechenden Vlies-Polymerspacermodulen des Q- und S-Typs (Q1000V250, S1000V250) untersucht. Zusätzlich kam ein Extruder-Polymerspacermodul des Q-Typs (Q1000E250) zum Einsatz. Das korrespondierende S-Modul konnte nicht bereitgestellt werden. Die Beladungsparameter und die zu prozessierende Menge an KFW wurden dem vergrößerten Modulvolumen angepasst.

3.1.3.1 Bewertung der Vlies-Polymerspacermodule Q/S1000V250

Die UV-Prozessdiagramme, die Trübungswerte und die ermittelten Bindungskapazitäten der Vliespolymer-V250-Module für zwei Zyklen sind in Abbildung 9 dargestellt.

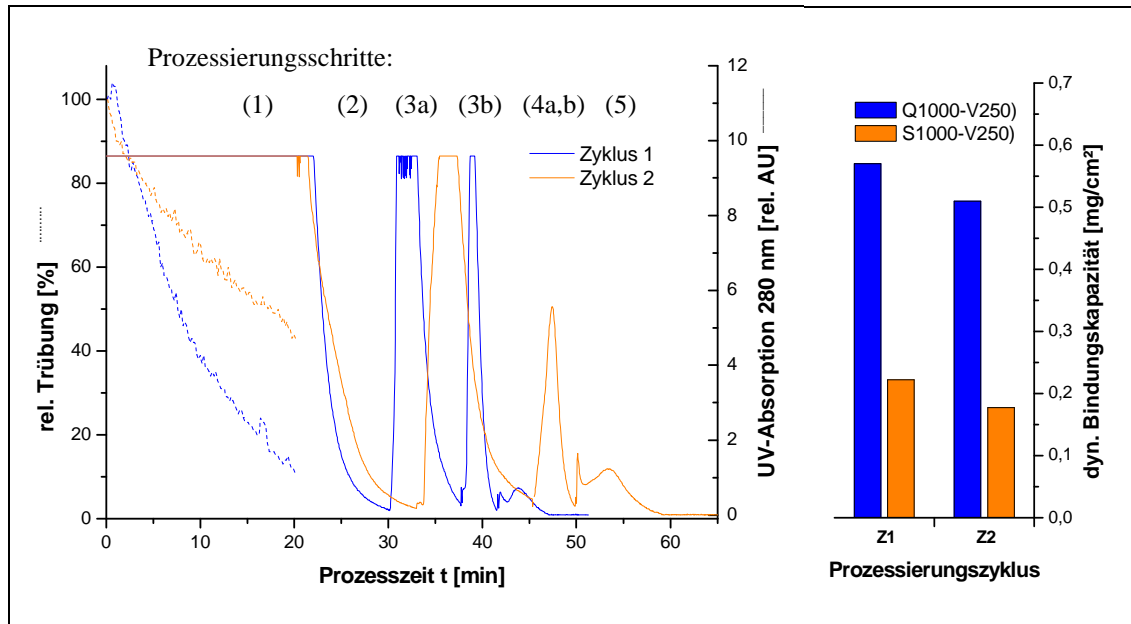


Abbildung 9: Prozessdiagramm (links) und dynamische Bindungskapazitäten (rechts) der Zyklen 1 und 2 mit Q/S1000V250-Modulen; (1) Beladen, (2) Waschen, (3a) Elution Q, (3b) Elution S (4a) Regeneration Q, (4b) Regeneration S, (5) Äquilibrieren

Während der Beladung im ersten Zyklus sanken die Trübungswerte rasch unter 20 %. Die filtrative Wirkung der Module war bereits im zweiten Zyklus weniger ausgeprägt (Abnahme auf 45 %). Dies deutet auf beträchtliche Verblockungen in den Modulen hin. Die gemessenen Druckabfälle bestätigen dies. Die Moduldrücke stiegen am Moduleingang von 1,3 bar im ersten auf 2,9 bar im zweiten Zyklus deutlich an, während keine Erhöhung des Ausgangsdrucks messbar war. Im dritten Zyklus wurde der maximale Betriebsdruck von 3 bar dauerhaft überschritten, so dass keine weiteren Prozessierungszyklen durchgeführt werden konnten und sich die Module nicht reinigen ließen. Die UV-Absorptionsverläufe unterstreichen die abnehmende Leistungsfähigkeit der Vliespolymer-Module. Im ersten Zyklus war nur ein geringes Volumen zum Waschen der Membranen (Prozessierungsschritt (3)) nötig und es wurden scharfe Elutionspeaks erhalten. Im zweiten Zyklus hingegen waren die Peaks stark verbreitert und die entsprechenden Volumina erhöht.

Tabelle 10: Prozessschrittvolumina der Q/S1000V250-Module

Modultyp	Zyklus	Prozessschrittvolumen [L]			
		Waschen Q+S	Elution Q	Elution S	Regener. Q+S
Q/S1000V250	Z1	19,0	14,5	6,7	11,0
	Z2	24,2	20,9	8,0	16,9

Die ermittelten Bindungskapazitäten lagen bei durchschnittlich $0,54 \text{ mg/cm}^2$ (Q-Typ) und $0,20 \text{ mg/cm}^2$ (S-Typ). Die Abnahme im zweiten Zyklus betrug 20 % bzw. 12 %. Wegen der Überschreitung des Betriebsdrucks im dritten Zyklus konnten keine weiteren Fraktionierungszyklen durchgeführt werden, so dass sich der Einfluss der Zyklenzahl auf die Produktivitätseinbußen abschließend nicht bewerten ließ.

Es kann konstatiert werden, dass beim Scale-Up der Vlies-Polymerspacermodule zwar Bindungskapazitäten in gleicher Größenordnung erzielt werden konnten. Die Verunreinigungen führen jedoch zu drastischen Anstiegen des Vordrucks und schließlich zur vollständigen Verblockung, so dass eine weitere Verwendung nicht möglich ist.

3.1.3.2 Bewertung des Extruderpolymer- Moduls Q1000E250

Das Extruderpolymer-E250-Modul des Q-Typs wurde in zwei aufeinander folgenden Fraktionierungen zu je vier Zyklen getestet. Zwischen den Fraktionierungen wurden die Module nach dem Reinigungsprotokoll bei $\dot{V} = 6 \text{ L/min}$ mit 0,1 M Natronlauge gespült.

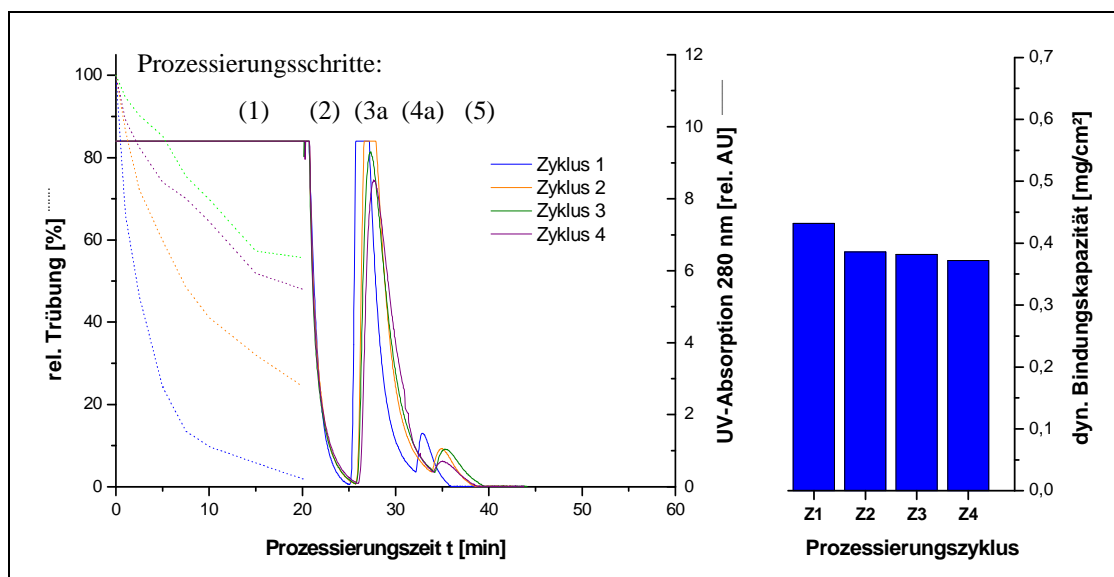


Abbildung 10: Prozessierung 1: Prozessdiagramme (links) und dynamische Bindungskapazitäten (rechts) der Zyklen 1-4 mit einem Q1000E250-Modul; (1) Beladen, (2) Waschen, (3a) Elution Q, (4a) Regeneration Q, (5) Äquilibration

Aus den Verläufen der Trübungswerte während der Beladung wird analog zur Testung des entsprechenden Q500E250-Moduls deutlich, dass die filtrative Eigenschaft mit jedem Fraktionierungszyklus abnimmt und sich Verunreinigungen anlagern (s. Abbildung 11, links).

Der Vergleich der UV-Chromatogramme zeigt passend dazu, dass das Peaktailing der Elution mit jedem Zyklus zunimmt. Die mittleren Waschvolumina betragen $10,7 \pm 1,1$ L. Die Elutionsvolumina lagen bei $13,8 \pm 1,5$ L und die Regenerationsvolumina bei $8,1 \pm 1,7$ L. Die offenkundige Partikelrückhaltung geht jedoch nicht mit einer verringerten Durchflussrate oder einem erhöhten Vordruck einher. Es konnte im Verlauf der Fraktionierungen keine Druckdifferenzen zwischen Moduleingang und Modulausgang gemessen werden. Die ermittelten Bindungskapazitäten lagen im Mittel bei $0,39 \pm 0,03$ mg/cm² und damit in gleicher Größenordnung wie bei Q500E250-Modulen. Die Leistungseinbußen bzgl. der Bindungskapazitäten betragen unter 10 %. Es konnte somit gezeigt werden, dass ein Scale-Up auf Q1000E250-Module erfolgreich mit kongruenten Ergebnissen durchgeführt werden kann.

Nachdem das Modul nach vier Zyklen intensiv gereinigt worden war, konnten die Ergebnisse in der zweiten Fraktionierung reproduziert werden (Abbildung 11).

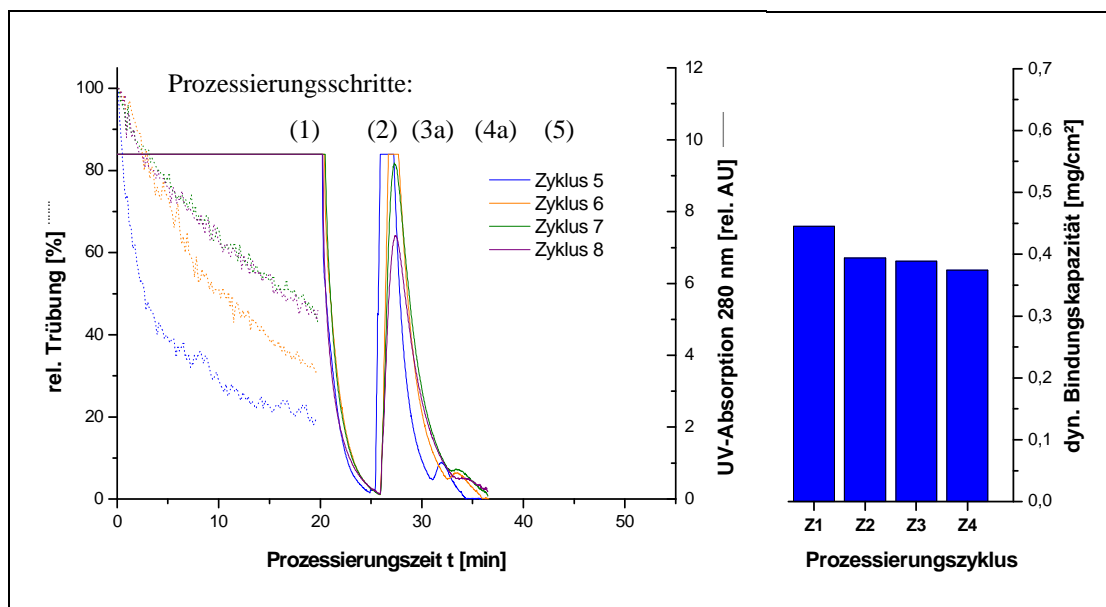


Abbildung 11: Prozessierung 2: Prozessdiagramm (links) und dynamische Bindungskapazitäten (rechts) der Zyklen 5-8 mit einem Q1000E250-Modul; (1) Beladen, (2) Waschen, (3a) Elution Q, (4a) Regeneration Q, (5) Äquilibrierung

Dies belegen die Verläufe der UV-Chromatogramme und die ermittelten Bindungskapazitäten mit durchschnittlich $0,40 \pm 0,03 \text{ mg/cm}^2$. Es lässt sich schlussfolgern, dass die Verunreinigungen nahezu vollständig durch den Reinigungsschritt entfernt werden konnten und das Elutionsverhalten nicht negativ beeinflusst wurde.

3.2 Aufreinigung der Produkte durch Ultra- und Diafiltration

Die gewonnenen Q- und S-Proteineluat (0,5 M NaCl-Salzgehalt) aus der Membranadsorber-Fraktionierung wurden mit Hilfe einer Ultra- bzw. Diafiltrationsanlage im Crossflow-Betrieb aufgereinigt, s. Abbildung 12.

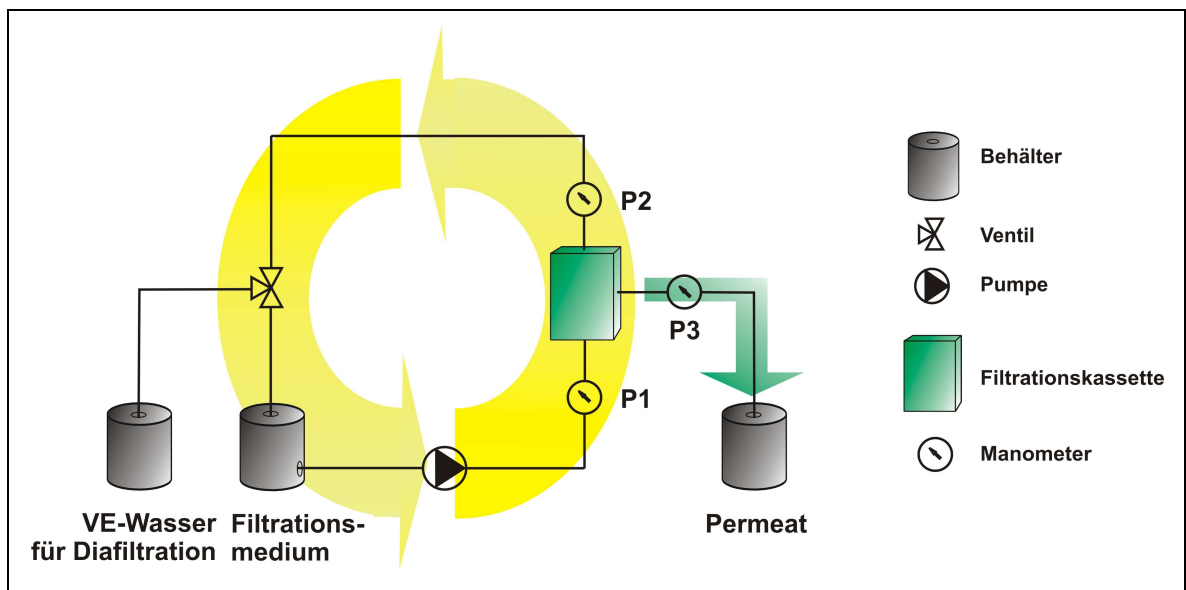


Abbildung 12: Skizze der Crossflow-Ultra-/Diafiltrationsanlage (gelbe Pfeile: Zirkulation des Retentatstroms; grüner Pfeil: Permeatstrom)

Zum Einsatz kamen Sartobind Hydrosart Membranfiltrationskassetten, die sich durch geringe Fouling-Neigung bei der Aufreinigung von Proteinlösungen auszeichnen. Die Porengröße wurde mit einem MWCO von 10 kDa so gewählt, dass Patatin (40-44 kDa) bzw. die Proteaseinhibitor-Fraktion (18-20 kDa) die Membranen nicht passieren konnte und im Kreislauf des Retentatstroms verblieben. Während der Ultrafiltration wurde das zu bearbeitende Prozessvolumen auf 1 L reduziert. Über den Permeatstrom wurden fortwährend niedermolekulare Bestandteile und insbesondere Prozesswasser abgeführt.

Dadurch ließen sich die Proteinlösungen aufkonzentrieren und gleichzeitig unerwünschte Verunreinigungen wie Salze und Proteinfragmente abtrennen. Anschließend wurden die erhaltenen Proteinlösungen mittels Diafiltration entsalzt. Den Retentaten der Ultrafiltration wurde in diesem Schritt kontinuierlich VE-Wasser zugeführt und gleichzeitig über den Permeatstrom die Salzfracht ausgewaschen, ohne die Proteinkonzentration zu verringern. Die Aufreinigung wurde bei einem Eingangsdruck $p_1 = 2,8$ bar und einem konstanten Flux von $60 \text{ L}/(\text{m}^2 \text{ h})$ durchgeführt. Die Diafiltration wurde bei einer Leitfähigkeit der Lösung unter $0,5 \text{ mS}/\text{cm}$ beendet. Dieser Wert kennzeichnet eine allgemeine Grenze, bei der im Lebensmittelbereich von einem salzfreien Produkt ausgegangen werden kann.

Die Proteinverluste während der Ultra-/Diafiltration (UF/DF) setzen sich aus dem ausgetragenen Anteil niedermolekularer Proteine im Permeatstrom und dem Anteil an denaturiertem Protein, das zum Membranfouling beitragen kann, zusammen. Über die Veränderung der Proteinfracht (Proteinbestimmung nach Lowry) im UF/DF-Retentat ließen sich Proteinverluste quantifizieren. Sie betragen $8,3 \pm 0,8 \%$ im Q-Retentat bzw. $4,2 \pm 0,7 \%$ im S-Retentat. Die niedrigere Proteinausbeute von $91,7 \pm 0,8 \%$ im Q-Retentat liegt vermutlich in der geringeren Proteinstabilität des Patatins begründet. Unter den gegebenen Prozessbedingungen können lokal Temperaturen von über $40 \text{ }^\circ\text{C}$ auftreten. Untersuchungen zur hitzeinduzierten Konformationsänderung von Patatin von Pots et al. zeigten, dass bereits bei Temperaturen um $45 \text{ }^\circ\text{C}$ die Tertiärstabilisierung verringert ist und sich die α -Helikalstruktur des Proteins entfaltet [15]. Die thermische Denaturierung geht einher mit Aggregationseffekten, die eine Deckschichtbildung an der Membranoberfläche fördern und damit den Proteinverlust erklären können [94]. Begünstigt wird die Denaturierung darüber hinaus durch nicht zu vernachlässigende Scherkräfte, die an der Membranoberfläche auftreten. Höhere Ausbeuten sollten demnach möglich sein, wenn sich die beschriebenen Effekte prozesstechnisch, beispielsweise durch Verringerung des Zyklisierungsvolumenstroms, minimieren ließen. In der Praxis resultierte jedoch aus entsprechenden Versuchen ein zu geringer Transmembrandruck. Dies führte zu deutlich verminderter Filtrationsleistung und langen Prozesszeiten, die nicht in Relation zur möglichen Ausbeutesteigerung stehen.

3.3 Konfektionierung und Charakterisierung der Produkte

Thermisch labile Stoffe, u. a. Proteine, erfordern spezielle Konfektionierungstechniken, bei denen das Produkt schonenden Trocknungsbedingungen ausgesetzt ist. Im Folgenden wurden geeignete Verfahren getestet und die gewonnenen Produkte bezüglich Ausbeute, Proteinreinheit und enzymatischer Aktivität charakterisiert.

3.3.1 Konfektionierung durch Sprüh- und Gefriertrocknung

Die Effektivität einer Trocknung steigt grundsätzlich mit der Temperatur bzw. dem Energieeintrag in das System und dem Partialdruckgefälle zwischen umgebendem Gasraum und dem Gasraum direkt im oder über dem Trocknungsgut. Durch einen zügigen Abtransport des freigesetzten Wasserdampfes kann man ein hohes Partialdruckgefälle erreichen. Bei direkten Trocknungsverfahren wie der Sprühtrocknung erfolgen der Wärmetransfer auf das Gut und der Abtransport des Wasserdampfes direkt durch den Kontakt mit heißem Trocknungsgas [95,96]. Die Proteinlösung wird kontinuierlich über eine Düse in Tröpfchengrößen von ca. 2-400 μm in eine Trocknungskammer versprüht und durch erwärmtes Trocknungsgas im Gleich- oder Gegenstrom getrocknet. Die große relative Oberfläche der Flüssigkeitströpfchen bewirkt einen effektiven, schnellen Wärme- und Stoffaustausch zwischen den beiden Phasen (Suspension und Heißluft) [97]. In einem nachgeschalteten Zyklon werden die trockenen Partikel vom Gas separiert und aufgefangen. Vor allem temperaturempfindliche native Proteine profitieren von den kurzen Trocknungszeiten dieser Technik. Nur max. 5-30 s sind die Proben den Maximaltemperaturen der Eingangstemperatur (80 °C) ausgesetzt, während sie die restliche Zeit durch Verdunstungskälte vor höheren Temperaturen geschützt werden [98]. Abbildung 13 stellt den Aufbau des Geräts sowie die Luftströmungen während des Trocknungsprozesses schematisch dar.

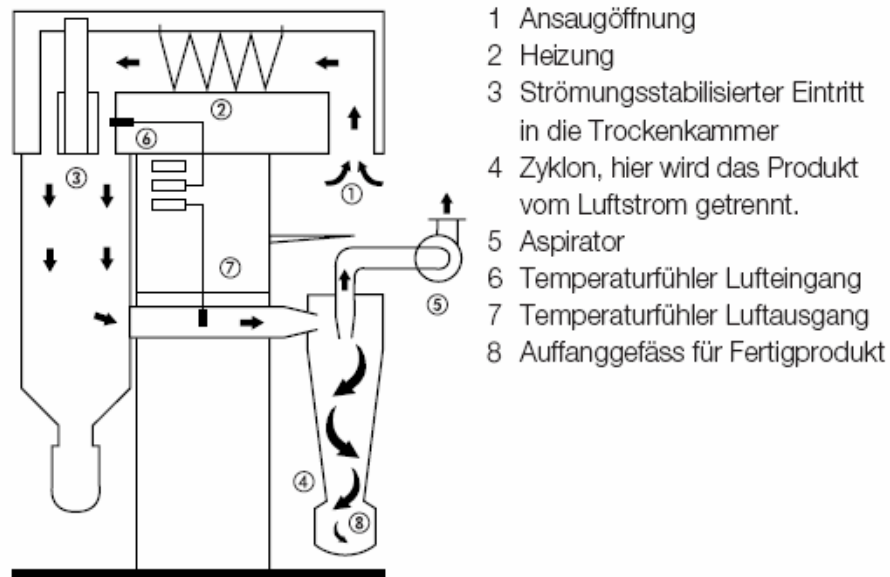


Abbildung 13: Schema des Geräteaufbaus mit Darstellung der Luftströmung während des Trocknungsprozesses (Pfeile) [99]

Indirekte Trocknungsverfahren wie die Gefriertrocknung übertragen Wärme über eine Kontaktfläche auf das Gut. Das Verfahren der Gefriertrocknung (Lyophilisierung) gliedert sich in drei Schritte: Zunächst wird die Proteinlösung eingefroren. Danach folgt die Haupttrocknung, in der das Lösemittel unter Vakuum aus den gefrorenen Proben sublimativ entfernt wird. Der Lösemitteldampf wird aus dem Probenraum durch Resublimation an einem Kondensator abgeleitet. Bei der abschließenden Nachtrocknung werden letzte Lösemittelanteile bei Temperaturen oberhalb von 0 °C durch Verdunstung im Vakuum abgezogen. Mittels Gefriertrocknung hergestellte Produkte zeichnen sich durch eine geringe Dichte und hohe Porosität aus. Aufgrund der schonenden Trocknung bei niedrigen Temperaturen eignet sich das Verfahren besonders zur Trocknung empfindlicher Proteine.

Lange Trocknungszeiten von mehreren Tagen verbunden mit der batch-Betriebsweise können sich jedoch nachteilig auswirken und die Lyophilisierung zu einem zeit- und kostenintensiven Verfahren machen. [100].

Zur Konfektionierung der Proteine aus den gewonnenen Q- bzw. S-UF/DF-Retentate (Q-Ret, S-Ret) erscheinen prinzipiell beide Proteintrocknungsverfahren geeignet. Ausschlaggebend sind Kriterien wie Temperaturempfindlichkeit der Produkte, Produktausbeuten sowie die Trocknungszeit. Im Folgenden wurde die Eignung der Gefriertrocknung (GT) und der Sprühtrocknung (ST) untersucht und die Leistungsfähigkeit der Techniken miteinander verglichen. Dabei bildeten

Trocknungszeit, Proteinreinheiten und –aktivitäten sowie die Proteinausbeute entscheidende Parameter. Die Lyophilisierung wurde an der Gefriertrocknungsanlage Alpha 1-2 LD plus der Firma Christ (Osterode am Harz/Deutschland) getestet. Die Sprühtrocknung wurde mit einem Mini-Spray-Dryer B-191 (Fa. Büchi, Essen/Deutschland) durchgeführt. Eine schonende Sprühtrocknung der Produkte macht es erforderlich, Verweilzeit und Temperatur der Proteine in der Trockenkammer auf ein Minimum zu begrenzen und gleichzeitig die Abscheidung des Produkts sowie die Trocknungsgeschwindigkeit zu maximieren. In entsprechenden Vortests erwies sich folgende Einstellung der Parameter als optimal:

- Sprühleistung: 0,32 L/h (20 % Pumpenleistung)
- Sprühflow: 400 L/h
- Eingangstemperatur: 80 °C
- Aspiratorleistung: 100%

3.3.2 Bestimmung der Proteinausbeuten

Aus den Differenzen der Proteinfrachten zwischen UF/DF-Retentat (Q-Ret, S-Ret) und getrocknetem Produkt wurden die entsprechenden Proteinausbeuten ermittelt. Die Proteinbestimmung erfolgte mittels des modifizierten Proteinassays nach Lowry [101] (s. Anhang). Die Ergebnisse der Trocknung je vier verschiedener Retentate sind in Tabelle 11 dargestellt.

Tabelle 11: Produktausbeuten der getrockneten Q-Fraktion

Q-Ret	Q-Produkt der Sprühtrocknung		Q-Produkt der Gefriertrocknung	
Proteinfracht	Proteinfracht	Proteinausbeute	Proteinfracht	Proteinausbeute
[g]	[g]	[%]	[g]	[%]
0,72	0,24	34,5	0,72	99,6
0,77	0,22	29,7	0,59	77,9
0,78	0,28	36,4	0,58	73,2
0,76	0,26	34,3	0,62	81,0

Tabelle 12: Produktausbeuten der getrockneten S-Fraktion

S-Ret	S-Produkt der Sprühtrocknung		S-Produkt der Gefriertrocknung	
Proteinfracht	Proteinfracht	Proteinausbeute	Proteinfracht	Proteinausbeute
[g]	[g]	[%]	[g]	[%]
0,77	0,24	31,4	0,76	99,5
0,83	0,32	38,2	0,66	79,0
1,35	0,46	34,3	1,19	87,7
0,82	0,33	39,4	0,66	79,5

Mit der Gefriertrocknung konnten hohe Proteinausbeuten von durchschnittlich $82,9 \pm 11,6$ % für Q-Produkte bzw. $86,4 \pm 9,6$ % für S-Produkte erzielt werden. Vergleichsweise geringe Proteinausbeuten lieferte dagegen im Mittel die Sprühtrocknung mit lediglich $33,7 \pm 2,8$ % (Q-Produkte) bzw. $35,8 \pm 3,6$ % (S-Produkte). Die hohen Proteinverluste lassen sich plausibel mit der Dimension und der Funktionsweise des Sprühtrockners erklären. Zum einen lagert sich beim Versprühen zwangsläufig Protein an der Innenwand der Trockenkammer an. Zum anderen wird das Produkt im Zyklon nicht vollständig von der Trockenluft getrennt, so dass ein gewisser Anteil über den Aspirator ausgetragen wird. Hier könnten nachgeschaltete Luftfilter die Produktausbeuten deutlich erhöhen. Eine weitere Möglichkeit wäre, die Abscheidung im Zyklon indirekt über die Morphologie des Produkts zu verbessern. Durch höhere Proteinkonzentrationen im Trocknungsmedium lassen sich größere und schwerere Partikel erzeugen, die besser getrennt werden und damit die Produktivität erhöhen sollten. Diese Annahme wurde in Versuchen mit höher konzentrierten Q- und S-Retentaten belegt. Aus Abbildung 14 geht hervor, dass sich Proteinausbeuten bei Proteinkonzentrationen im Trocknungsmedium (Q-Ret, S-Ret) von 5-10 g/L auf einen Grenzwert von 73 % steigern lassen.

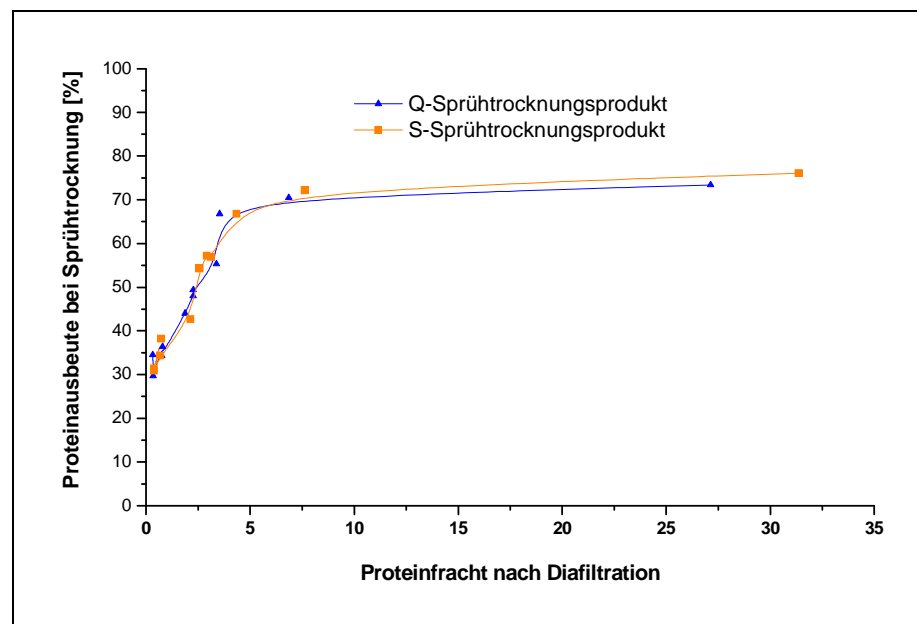


Abbildung 14: Zusammenhang zwischen der Proteinfracht in den Retentaten (Q-Ret, S-Ret) und der Proteinausbeute nach Sprühtrocknung

3.3.3 Qualitative Charakterisierung über SDS-Gelelektrophorese

Die Ergebnisse der qualitativen Charakterisierung mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) sind in Abbildung 15 dargestellt. In den Produkten der Q-Fraktion nach Gefrier- und Sprühtrocknung (Spur 3 & 5) ist eine starke Bande mit einem Molekulargewicht von etwa 40-45 kDa zu erkennen. Diese Masse stimmt mit der des erwarteten Patatins überein. Die Produkte der S-Fraktion nach Gefrier- und Sprühtrocknung (Spur 2 & 4) zeigen eine breite Bande bei 20 kDa, die auf die verschiedenen Proteaseinhibitoren der Kartoffel hinweisen. Es sind keine Unterschiede im SDS-Gel zwischen den Trocknungsprodukten der Spüh- und Gefriertrocknung festzustellen. Bei der schwachen Bande im Bereich um 15 kDa scheint es sich um eine Verunreinigung zu handeln. Alternativ könnte es auf ein Fragment eines Proteaseinhibitors hindeuten, das aus der Abspaltung einer PI-Untereinheit hervorgegangen war. In den analysierten Proben waren keine weiteren Proteinverunreinigungen auszumachen. Daher kann näherungsweise davon ausgegangen werden, dass der Proteinanteil allein auf die Produkte Patatin bzw. die Proteaseinhibitoren entfällt.

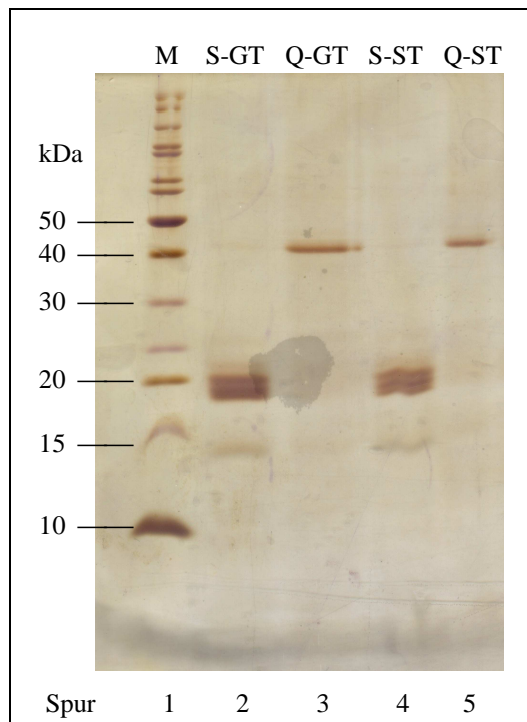


Abbildung 15: SDS-PAGE sprüh- (ST) und gefriergetrockneter (GT) Q- und S-Produkte mit anschließender Silberfärbung. Spur 1: Referenz-Proteine (M, Fermentas Molekularmarker)

3.3.4 Quantitative Bestimmung der Proteinreinheit

Der Proteinanteil einer konfektionierten Fraktion wurde durch den modifizierten Lowry-Assay (s. Anhang 6.5.2, S: 109) quantifiziert. Über das Verhältnis zur Gesamtauswaage lassen sich die Proteinreinheiten der getrockneten Produkte errechnen. Der prozentuale Wert gibt Aufschluss darüber, wie hoch der Massenanteil des Zielproteins bzw. wie gering der Anteil an Verunreinigungen (z. B. Stärke, Asche, Salze, Aminosäuren) ist. Die Ergebnisse verschiedener Trocknungsprodukte sind in Tabelle 13 zusammengefasst.

Tabelle 13: Prozentuale Proteinreinheiten von Sprüh- und Gefriertrocknungsprodukten

Proteinreinheit [%]			
Q-Produkt der Sprühtrocknung	Q-Produkt der Gefriertrocknung	S-Produkt der Sprühtrocknung	S-Produkt der Gefriertrocknung
87	78	82	92
87	80	64	68
82	83	77	89
91	87	75	80

Die Werte liegen für sprühgetrocknete Q-Produkte im Mittel bei $86,9 \pm 3,7$ % und für lyophilisierte Q-Produkte in gleicher Größenordnung bei $82,0 \pm 3,8$ %. Analog verhält es sich bei den getrockneten S-Produkten mit $74,7 \pm 7,6$ % bzw. $82,2, \pm 10,6$ %. Unter Berücksichtigung der Standardabweichungen zeigt sich, dass die Trocknungsmethode keinen signifikanten Einfluss auf die Proteinreinheiten hatte.

3.3.5 Bestimmung der Produktaktivitäten

Der Einfluss der Trocknungsmethode auf den Erhalt der enzymatischen Aktivität wurde durch Aktivitätsassays getestet und quantifiziert. [6] Die spezifische Aktivität eines Enzyms wird angegeben in U/mg, wobei ein Unit U die Menge an Substrat in μmol wiedergibt, die innerhalb von 1 min durch das Enzym bei Standardbedingungen (25°C , 1,013 bar) umgesetzt wird.

Das Kartoffelprotein Patatin zeichnet sich durch eine Acyltransferase- und eine Lipidacylhydrolase-Aktivität aus. Zur Aktivitätsbestimmung der Patatin-haltigen Q-Fraktion wurde ein Lipidacylhydrolase-(LAH)-Test angewandt. Die LAH-Aktivität von Patatin kann über die Hydrolyse des chromogenen Substrats p-Nitrophenylcaprat

bestimmt werden. Bei der Umsetzung des Substrats wird p-Nitrophenolat gebildet, dessen Zunahme der Absorption durch photometrische Messung bei einer Wellenlänge von 400 nm detektiert werden kann.

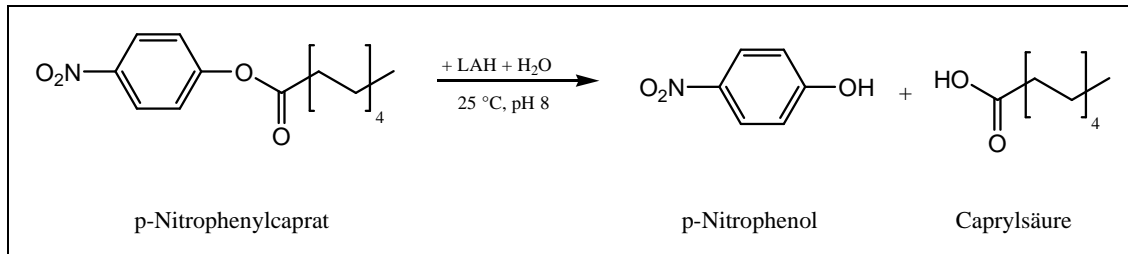


Abbildung 16: LAH-(Lipidacylhrolase)-Test zur Aktivitätsbestimmung von Patatin

Für die Bestimmung der Proteaseinhibitoraktivität wurde das Inhibitionsvermögen gegenüber Trypsin untersucht und standardisiert. Die Serinprotease Trypsin (E.C. 3.4.21.4) ist in der Lage, die Esterbindung des Substrats N_α-p-Tosyl-L-Argininmethylester zu spalten. Die Zunahme am Produkt N_α-p-Tosyl-L-Arginin kann durch photometrische Absorptionszunahme bei 247 nm detektiert werden. Proteaseinhibitoren üben eine hemmende Wirkung auf die Aktivität von Trypsin aus und vermindern die Produktzunahme, so dass mit zunehmender Inhibitoraktivität der Proteaseinhibitoren die Hydrolysegeschwindigkeit sinkt. Der entwickelte Enzymtest wurde zunächst mit einem kommerziell erhältlichen Sojabohnen-Trypsininhibitor (STI, Kunitz-Inhibitor) kalibriert. Der STI wurde im molaren Anteil von 0-100 %, bezogen auf die Molarität des Trypsins, zugesetzt. Im getesteten Konzentrationsbereich ist ein linearer Zusammenhang zur Inhibierung gegeben. Die Inhibition unbekannter Proben kann somit in prozentualen STI-Äquivalentaktivitäten ausgedrückt werden.

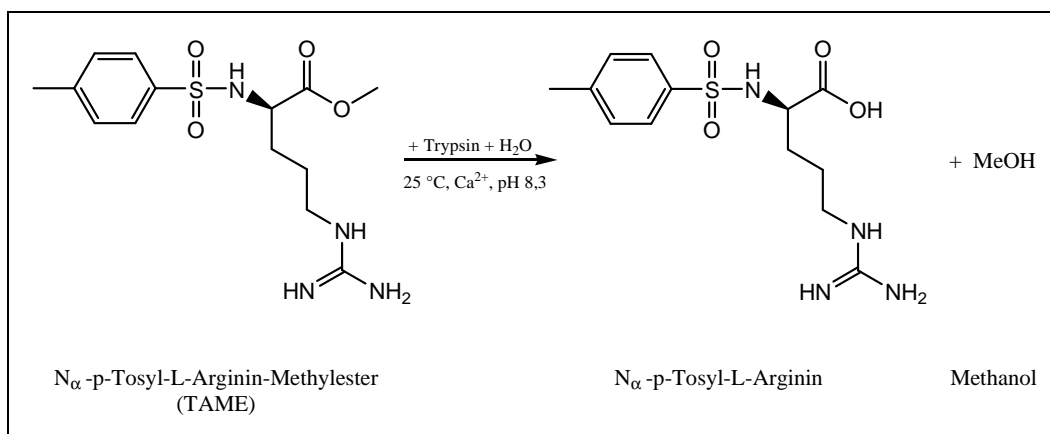


Abbildung 17: Test zur Aktivitätsbestimmung der Protease-Inhibitoren

Die Werte der enzymatischen Aktivitäten der konfektionierten Patatin- und PI-Fraktionen sind in Tabelle 14 dargestellt. Die Inhibitor-Aktivitätsunterschiede der konfektionierten S-Produkte unterscheiden sich nicht signifikant. Sie liegen in gleicher Größenordnung und betragen $17,0 \pm 2,0$ % bei lyophilisierten S-Produkten bzw. $14,6 \pm 1,6$ % beim Sprühtrocknungsprodukt. Dagegen ist die LAH-Aktivität sprühgetrockneter Q-Produkte ($2,98 \pm 0,49$ U/mg) ca. 27 % geringer als die der Lyophilisate ($4,08 \pm 0,47$ U/mg). Der deutliche Aktivitätsverlust bei der Sprühtrocknung resultiert aus der geringen thermischen Stabilität des Patatins.

Tabelle 14: Enzymatische Aktivitäten konfektionierter Patatin- und PI-Fraktionen

LAH-Aktivität [U/mg]		STI-Äquivalentaktivität [STI-%]	
Q-Produkt der Sprühtrocknung	Q-Produkt der Gefriertrocknung	S-Produkt der Sprühtrocknung	S-Produkt der Gefriertrocknung
2,70	3,77	16,6	19,4
3,27	4,53	14,2	16,0
2,45	3,60	12,7	14,9
3,50	4,43	14,8	17,6

3.3.6 Bewertung der Trocknungsmethoden

Die ermittelten Kriterien bei der Konfektionierung von Proteinretentaten mit Sprühtrocknung (ST) und Gefriertrocknung (GT) sind in Tabelle 15 zusammengefasst und sollen der Bewertung und Bilanzierung der Trocknungsmethoden dienen. Insgesamt spricht für die Sprühtrocknung ein 30-fach geringerer Zeitaufwand gegenüber der Gefriertrocknung. Damit verbunden ist ein Energieersparnis von etwa 70 %. Auf die Proteinreinheiten hat die Wahl der Trocknung keine nennenswerte Auswirkung. Bei der Trocknung höher konzentrierter Retentate ($c > 5$ g/L) relativieren sich zudem die Ausbeuteverluste, so dass in diesem Fall die Sprühtrocknung der Gefriertrocknung hinsichtlich Produktivität überlegen ist. Die Vorteile der Gefriertrocknung kommen zum tragen, sobald gering konzentrierte Retentate ($c < 1$ g/L) konfektioniert werden oder maximale LAH-Aktivitäten im Patatin erforderlich sind. Hier muss die Wirtschaftlichkeit im Einzelfall gegen die Qualitätsanforderung an das Produkt abgewägt werden.

Tabelle 15: Bilanzierung der Trocknungsmethoden anhand der ermittelten Kriterien

Kriterium	GT	ST	GT	ST
	Q-Ret		S-Ret	
Trocknungszeit [h/L]	72	2,5	72	2,5
Energieverbrauch [kWh]	24	7,3	24	7,3
Proteinausbeute [%]				
c < 1 g/L im Retentat	82,9 ± 11,6	33,7 ± 2,8	86,4 ± 9,6	35,8 ± 3,6
c < 5 g/L im Retentat		~ 73		~ 73
Enzymaktivität	4,08 ± 0,47 U/mg	2,89 ± 0,49 U/mg	17,0 ± 2,0 STI-%	14,6 ± 1,6 STI-%
Proteinreinheit [%]	82,0 ± 3,8	86,9 ± 3,7	82,2 ± 10,6	74,7 ± 7,6

3.4 Nutritive und toxikologische Bewertung der Produkte

3.4.1 Biologische Wertigkeit der Kartoffelproteinfraktionen

Zur Bewertung der biologischen Wertigkeit wurden die Aminosäurespektren der gewonnenen Kartoffelproteinfraktionen Patatin und Proteaseinhibitoren (PI) sowie des denaturierten Kartoffelgesamtproteins (KP, Emsland-Stärke GmbH) untersucht. Nach saurer Totalhydrolyse der Proteine mit 6 N HCL wurden die freigesetzten Aminosäuren über eine RP-HPLC mit OPA-Vorsäulenderivatisierung aufgetrennt, identifiziert und quantifiziert (s. Tabelle 16). Die essentielle Aminosäure Tryptophan (Trp) zerfiel unter den Reaktionsbedingungen und konnte daher nicht bestimmt werden. Außerdem lässt sich der Gehalt an Glutaminsäure (Glu) und Glutamin (Gln) bzw. Asparaginsäure (Asp) und Asparagin (Asn) nur in der Summe ausdrücken.

Patatin und PI besitzen hohe Gehalte an Leucin (Leu) sowie den aromatischen Aminosäuren Phenylalanin (Phe) und Tyrosin (Tyr). Die PI-Fraktion ist zudem reich an Valin (Val), während in Patatin mit einem hohen Massenanteil Alanin (Ala) vorkommt. Vergleicht man die Aminosäuregehalte der Fraktionen mit der Zusammensetzung eines Referenzproteins, das von der FAO/WHO für die Ernährung von Kleinkindern vorgeschlagen wurde, so kann für jede Aminosäure der Amino Acid Score (AAS) bestimmt werden (s. Tabelle 17). Patatin übersteigt die geforderten Werte bei den betrachteten Aminosäuren um das 1,5-2,5-fache, so dass von einer sehr guten biologischen Wertigkeit ausgegangen werden kann.

Tabelle 16: Aminosäurespektren nach saurer Totalhydrolyse und HPLC-Analyse im Vergleich zu Referenz-Aminosäurespektrum für Kleinkinder

Aminosäure (AS)	AS-Gehalt [mg/g Protein-N]			Referenzprotein Kleinkind [102]
	KP ¹⁾	Patatin ²⁾	PI ²⁾	
essentiell				
His	28,2	48,6	43,2	19
Ile	52,0	46,5	61,1	28
Leu	107,3	105,4	110,3	66
Val	70,9	56,9	101,5	35
Aromatische AS (Phe + Tyr)	108,1 (72,3 + 54,8)	106,8 (65,0 + 60,0)	120,1 (82,2 + 60,2)	63
Thr	56,6	66,4	52,6	34
nicht-essentiell				
Ala	44,5	104,0	31,9	
Arg	54,4	56,8	59,5	
Asp+Asn	149,0	131,2	170,8	
Glu+Gln	118,5	133,1	105,7	
Gly	52,2	50,0	64,6	
Ser	66,6	58,6	47,2	
Total	927,29	983,25	989,64	

1) Protein-N-Bestimmung nach Kjeldahl (N-Gehalt x 6,25)

2) Protein- N-Bestimmung nach Lowry

Tabelle 17: Berechnete AS-Scores des Kartoffelgesamtproteins sowie der Fraktionen

Aminosäure (AS)	AS-Score[%]		
	KP	Patatin	PI
essentiell			
His	148	256	227
Ile	186	166	218
Leu	163	159	167
Val	203	172	290
Aromatische AS (Phe+Tyr)	172	169	190
Thr	166	195	155

3.4.2 Überwachung toxischer Glykoalkaloide in Fraktionen und KP

Glykoalkaloide können aufgrund ihrer Toxizität und ihres bitteren Geschmacks ein erhebliches Problem bei der Nutzung prozessierter Proteinprodukte aus KFW darstellen. Aus Gründen der Lebensmittelsicherheit wurden die gewonnenen Produktfraktionen Patatin und Proteaseinhibitoren daher auf α -Solanin und α -Chaconin untersucht. Die HPLC-basierte quantitative Analyse gliederte sich in drei Schritte: Die Glykoalkaloide wurden zunächst aus den Kartoffelproteinen/-fraktionen essigsauer extrahiert und der erhaltene Extrakt durch Festphasenextraktion aufgereinigt. Die anschließende HPLC-Analytik erlaubt die Detektion bis zu einer Nachweisgrenze von 20 ppm α -Solanin bzw. α -Chaconin [6].

Zusätzlich zu den isolierten und konfektionierten Patatin- bzw. Proteaseinhibitor-Fraktionen wurden verschiedene industriell gewonnene denaturierte Kartoffelproteine der Emsland-Stärke GmbH analysiert, die sich in der Qualität bzw. der Klassifizierung und den Eigenschaften unterscheiden.

Tabelle 18: Glykoalkaloidgehalte in Kartoffelproteinfraktionen und industriell durch Säurekoagulation gewonnenem denaturiertem Kartoffelprotein

Protein/-fraktion	Klassifizierung /Eigenschaft	Glykoalkaloidgehalt [ppm] ³⁾	
		α -Chaconin	α -Solanin
Patatin-(Q)-Fraktion	-	< 20	< 20
Proteaseinhibitor-(S)-Fraktion	-	< 20	< 20
KP	TQ ⁴⁾ /-	388 ± 13	329 ± 17
KP ¹⁾	TQ/löslich	135 ± 7	492 ± 14
KP ²⁾	LQ ⁴⁾ /-	59 ± 6	39 ± 18
KP	LQ/neutralisiert	107 ± 3	46 ± 13

¹⁾ Interne Kennung (Emsland-Stärke): F7888

²⁾ Interne Kennung (Emsland-Stärke): F7020

³⁾ Dreifachbestimmung

⁴⁾ Bezeichnungen: TQ = Tierfutterqualität, LQ = Lebensmittelqualität

Die durch Säurekoagulation aus KFW abgetrennten Kartoffelproteine wiesen je nach Qualität und Klassifizierung Glykoalkaloidgehalte von 98-717 ppm auf. Die routinemäßig untersuchten Glykoalkaloidgehalte der Fraktionierungsprodukte aus dem Membranadsorberprozess unterlagen zwar den für Lebensmittel typischen Schwankungen. Sie überstiegen jedoch nie einen Gehalt von 100 ppm und bewegten sich in der Regel unterhalb des Detektionsminimums von 20 ppm. Der Großteil der

toxischen Glykoalkaloide wird offensichtlich nicht mit den Proteinen abgetrennt und reichert sich nicht in den fraktionierten Produkten an. Innerhalb der EU liegt der obere Grenzwert an Glykoalkaloiden für den sicheren Verzehr von Lebensmitteln bei 40 ppm. Das säurekoagulierte denaturierte Kartoffelprotein in Lebensmittelqualität erfüllt diese Anforderung nicht und erschwert somit den Einsatz in Lebensmitteln. Im Gegensatz zum industriell gewonnenen denaturierten Kartoffelproteinen stellen die Produkte der membran chromatographischen Trennung selbst als hochdosierte Proteinpräparate kein toxikologisches Problem dar. Die ermittelten Glykoalkaloidgehalte liegen deutlich unterhalb der Grenzwerte. Dies kennzeichnet einen wichtigen Qualitätsunterschied, den die membran chromatographische Trennung im Vergleich zur industriellen Kartoffelproteingewinnung durch Säurekoagulation mit sich bringt.

3.5 Bestimmung und Inhibierung der enzymatischen Verbräunung

Die zur Klasse der Oxidoreduktasen zählenden Polyphenoloxidasen Laccase (EC 1.10.3.2), Catecholoxidase (EC 1.10.3.1) und Tyrosinase (EC 1.14.18.1) sind für die enzymatische Bräunung pflanzlichen Materials verantwortlich [7] und werden bei verschiedenen Obst- und Gemüsesorten als Reaktion auf mechanische Beschädigung aktiv.

In Gegenwart von Sauerstoff katalysieren PPO die Oxidation von Phenolen zu reaktiven *ortho*-Chinonen, die wiederum spontan zu braunfarbenen Melanin-Pigmenten polymerisieren [103]. In der Nahrungsmittelindustrie stellt sich dies insbesondere bei der Vermarktung prozessierter Produkte als großes Problem dar. Die enzymatische Verbräunung kann sowohl die sensorischen als auch die nutritiven Eigenschaften negativ beeinflussen und somit die Haltbarkeit verkürzen bzw. den Marktwert verringern. Die im KFW enthaltenen Polyphenoloxidasen (PPO) stellen daher eine Verunreinigung dar, die die Qualität der fraktionierten und isolierten Proteinprodukte mindert. Insbesondere die Patatin-(Q)-Fraktion weist eine deutliche Beigebraunfärbung auf. Um den Anteil dieser Störkomponente in den Produktfraktionen überwachen zu können, wurden die nachfolgend beschriebenen Methoden zur Quantifizierung der PPO-Aktivität etabliert und angewandt.

3.5.1 Bestimmung der PPO-Aktivität

3.5.1.1 PPO-Aktivitätsassay I

Indirekt lässt sich die PPO-Aktivität einer unbekannt Probe anhand der Reaktion eines *ortho*-Dichinons mit zugesetzter Ascorbinsäure bestimmen. Ascorbinsäure reduziert *ortho*-Dichinone, die bei der enzymatischen Reaktion von Diphenolen (z. B. Chlorogensäure) mit PPO entstehen. Die Konzentrationsabnahme an Ascorbinsäure verhält sich proportional zur PPO-Enzymaktivität einer Probe und kann photometrisch bei 265 nm verfolgt werden [104]. Die Analyse von 12 Patatinproben aus verschiedenen Prozessierungen ergaben einen durchschnittlichen Wert von $0,089 \pm 0,030$ U/mg (mit $U = \mu\text{mol} / \text{min}$).

3.5.1.2 PPO- Aktivitätsassay II

Alternativ kann die PPO-Aktivität einer Probe direkt über den Grad der Verbräunung photometrisch ermittelt werden. Das bereits von Sisler und Evans sowie von Lee und Park verwendete *ortho*-Diphenol Catechol erwies sich als geeignet, bei der Umsetzung mit Kartoffelpolyphenoloxidasen als Substrat zu fungieren [104,105]. In Voruntersuchungen wurde eine zweckmäßige Catecholkonzentration von 20mM (2,11 g/L) ermittelt. Die Reaktion wurde photometrisch am Absorptionsmaximum (405 nm) unter Standardbedingungen bei 25 °C in einem gepufferten System bei pH 7 verfolgt. Aus der maximalen Anfangssteigung der Kurve wurde die PPO-Aktivität abgeleitet (s. Abbildung 48, S. 112). Hierbei wurde die Annahme getroffen, dass die Bildung der farblichen Produkte mit der Umsetzung des Substrats korreliert. Eine Unit wurde definiert als die PPO-Aktivität, bei der unter den gegebenen Bedingungen die Absorption um 0,001 rel.AU/min zunimmt [106,107]. Für die Aktivitätsmessungen wurden Dreifachbestimmungen durchgeführt. Aus dem Mittelwert der maximalen Anfangssteigungen wurde für die Polyphenoloxidasen der Patatinfraktion eine mittlere Aktivität von $492 \text{ U/mg} \pm 187 \text{ U/mg}$ berechnet. Die in der Literatur angegebenen Werte liegen in gleicher Größenordnung. Patil et al ermittelten für Kartoffelpolyphenoloxidasen Aktivitäten von 266-1.200 U/mg mit Catechol als Substrat [108]. Die Ergebnisse belegen eine PPO-Restaktivität der patatinhaltigen Fraktion. Daher wurden Strategien zur Hemmung der Verbräunungsreaktion in Kartoffelproteinfractionen untersucht.

3.5.2 Strategien zur Hemmung von Polyphenoloxidasen

Neben physikalischen Methoden wie Hitzebehandlung, die bisweilen unerwünschte Auswirkungen auf das Produkt haben, finden eine große Auswahl unterschiedlicher chemischer Substanzen in Lebensmitteln Anwendung, die enzymatische Verbräunung zu beeinflussen. Der Gebrauch ist jedoch auf nicht-toxische Zusätze eingeschränkt, die sich nicht negativ auf geschmackliche und sensorische Eigenschaften auswirken [109]. Chemische Zusätze setzen in der Regel daran an, die Entstehung reaktiver *ortho*-Chinone zu inhibieren bzw. intermediär gebildete Produkte abzufangen, so dass die weitere Polymerisation zu braunfarbenen Melaninen unterbunden wird. Dabei wirken sie nach mindestens einem der folgenden Mechanismen:

- (1) Sie wirken inhibitorisch auf PPO.
- (2) Sie entziehen den für die Oxidation der *ortho*-Phenole zu *ortho*-Chinonen notwendigen Sauerstoff.
- (3) Intermediär gebildete *ortho*-Chinone werden zurück zu weniger reaktiven *ortho*-Phenolen reduziert.
- (4) Intermediär gebildete *ortho*-Chinone werden komplexiert und farblose Addukte gebildet.

In industriellen Prozessen kommen für gewöhnlich reduzierende Substanzen zu Einsatz, wie Bisulfit, Ascorbinsäure, Aminosäuren und thiolhaltige Verbindungen [110]. Ascorbinsäure wird häufig in Nahrungsmitteln zugesetzt, hat jedoch nur eine temporär begrenzte Wirksamkeit. Effektiver ist der Zusatz von Sulfiten als Konservierungsstoffe. Es ist allerdings gesundheitlich nicht unbedenklich und kann zu unerwünschten Nebenwirkungen wie Übelkeit, Erbrechen, Durchfall und Kopfschmerzen führen [111,112]. Aus diesem Grund erscheint es sinnvoll Alternativen zu finden, die ein Wirkpotenzial besitzen, das dem des Natriumbisulfit entspricht. Im Folgenden wurde die inhibierende Wirksamkeit der Verbindungen Glutathion (GSH), Cystein (CYS) und Ascorbinsäure (ASC) auf Verbräunungsreaktionen getestet und mit der des Natriumbisulfits (NBS) verglichen. Als Testsystem wurde der PPO-Aktivitätsassays II mit einer PPO-haltigen Patatinfraction (738 U/mg) angewandt und die Verbräunungsreaktion im Zeitintervall von 20 min photometrisch beobachtet. Das Verhältnis von Testsubstanz- zu Patatinkonzentration wurde von 0,8-20 wt-% (Gewichtsprozent) variiert. Detaillierte Untersuchungen der zugrunde liegenden

Inhibitionskinetik wurden über spektroskopische Analysen zu Edukt- und Produktkonzentration und anhand fluoreszenzoptischer Messungen der Sauerstoffkonzentration durchgeführt. Die erhaltenen Daten ließen sich jedoch nicht hinreichend an dynamisch mathematische Modelle anpassen, deren Variablen über generische Algorithmen optimiert wurden. Daher beschränken sich die Aussagen auf Vergleiche der Wirkung der Testsubstanzen mit der des NBS.

Die Ergebnisse der Bestimmung der PPO-Restaktivitäten sind in Tabelle 19 erfasst.

Tabelle 19: Bestimmung der PPO-Restaktivitäten verschiedener Inhibitionssysteme

Inhibitor	PPO-Restaktivität [U/mg]	5 min Inkubation von Enzym mit Inhibitor	Verhältnis Patatinfraction/ Inhibitor [wt-%]
NBS	27 ± 8	-	1
NBS	0	-	6
CYS	231 ± 36	-	0,8
CYS	147 ± 49	-	4
CYS	62 ± 18	+	4
CYS	0	-	8
GSH	211 ± 28	-	10
GSH	79 ± 14	+	10
GSH	0	-	20
ASC	150 ± 68	-	6
ASC	0	-	12
CYS +ASC	0	-	2+6
GSH+ASC	0	-	5+6

Natriumbisulfit hemmt erwartungsgemäß die enzymatische Verbräunung am effektivsten. Bei einem Zusatz von 1 wt-% NBS sinkt die PPO-Restaktivität um 96 %, die volle Wirksamkeit entfaltet es bei 6 wt-%. Unter den thiolhaltigen Verbindungen liegt der Zusatz von Cystein in gleicher Größenordnung. Für eine vollständige Hemmung der Verbräunungsreaktion sind 8 wt-% nötig. Durch fünfminütige Präinkubation des Cystein mit der PPO-haltigen Patatinfraction ließ sich die Wirkung verglichen mit der nicht präinkubierten Testlösung um weitere 58 % erhöhen. Längere Inkubationszeiten verstärkten diesen Effekt jedoch nicht. Besonders effektiv hat sich die Kombination von 6 wt-% Ascorbinsäure mit Cystein bzw. Glutathion erwiesen. Bei Glutathion und Ascorbinsäure reduzierte sich die erforderliche Menge um die Hälfte, um über einen Zeitraum von 20 min eine effektive Inhibierung zu gewährleisten. Von Cystein wurden sogar nur 25 % der ursprünglichen Menge benötigt. Eine Kombination aus Glutathion und Cystein hingegen zeigte keinen verstärkenden Effekt.

Es kann festgehalten werden, dass die Kombination aus Cystein und Ascorbinsäure eine vielversprechende Alternative zu NBS darstellt, die Verbräunungsreaktion im Produkt zu hemmen. Zwar ist NBS die deutlich kostengünstigere Variante, Ascorbinsäure (Vitamin C) und die semi-essentielle Aminosäure Cystein stellen jedoch selbst physiologisch hochwertige Zusatzstoffe dar. Die Wertsteigerung des Gesamtprodukts könnte somit die erhöhten Kosten des Cysteins rechtfertigen.

3.6 Zusammenfassung und Bilanzierung

An einer automatisierten Technikumsanlage wurden mittels verschiedener Membranadsorber-Wickelmodule erfolgreich die Kartoffelproteine Patatin und PI fraktioniert. Die Beladung erfolgte mit proteinreichem KFW im Überschuss. Die Produktivität, d. h. die Produktgewinnung pro Zeitintervall, wurde daher über die maximalen Bindungskapazitäten ermittelt. Sie lagen bei der Fraktionierung in 5 Zyklen bei durchschnittlich 0,34 mg Patatin bzw. 0,18 mg PI pro cm² Membranfläche.

Durch Modifizierungen am Aufbau und der Prozessführung konnte die Fraktionierung in verschiedenen Modi betrieben werden. In Tabelle 20 sind relevante Parameter einer Prozessierung mit fünf Zyklen und anschließender Reinigung bilanziert. Im Vergleich zum Parallelbetrieb konnte durch den Tandembetrieb die Fraktionierungszeit mit kleinen Q/S500-Modulen um 38 % gesenkt werden. Bei gleicher Produktausbeute stieg somit die Produktivität von 12,9 g/h Produkt auf 21,0 g/h Produkt. Anhand der Testung von Q1000-Modulen konnte gezeigt werden, dass ein Scale-Up auf die doppelte Modulgröße die Produktivität im Einzelbetrieb um 76 % steigert. Wegen ausstehender Untersuchungen zu S1000-Modulen konnte die Produktivität abschließend nicht bilanziert werden.

Die Fraktionierungseluate wurden mit geringen Verlusten ultra- und diafiltriert. Nach anschließender Konfektionierung mit Sprühtrocknung oder Gefriertrocknung wurden die Produkte bioanalytisch charakterisiert und die Reinheit und Aktivität quantifiziert. Analysen zur Aminosäurezusammensetzung und zum Gylkoalkaloidgehalt bestätigten die toxikologische Unbedenklichkeit und die nutritive Qualität der Produkte. Unerwünschte Verbräunungen im Patatin konnten durch Zusätze von Ascorbinsäure und Cystein effektiv verhindert werden.

Tabelle 20: Bilanz der Fraktionierung mit SartobindDirect-Wickelmodulen in fünf Zyklen sowie anschließender Aufreinigung und Konfektionierung

Kriterium		Q/S500-Module		Q1000-Modul
		Q	S	Q
Ausbeuten der Fraktionierung [g]	Einzelbetrieb	24,7	13,1	69,6
	Parallelbetrieb	37,8		
	Tandembetrieb	37,8		
Fraktionierungszeit [h]	Einzelbetrieb	2,5		2,3
	Parallelbetrieb	2,9		-
	Tandembetrieb	1,8		-
Produktivität der Fraktionierung [g/h]	Einzelbetrieb	9,9	5,7	17,4
	Parallelbetrieb	12,9		-
	Tandembetrieb	21,0		-
Produktausbeuten [g]	Fraktionierung	24,7 (= 100 %)	13,1 (= 100 %)	69,6
	UF/DF-Aufreinigung	22,7 (92 %)	12,6 (96 %)	64,3
	Sprühtrocknung	16,5 (67 %)	9,1 (70 %)	46,7
Verbrauch [kg]	NaH ₂ PO ₄	0,09		0,08
	Na ₂ HPO ₄	0,13		0,12
	NaCl	3,33		4,39
	NaOH	0,08		0,08
	VE-Wasser	0,19 m ³		0,26 m ³

Neben dem Wasserverbrauch verursacht die benötigte Menge an NaCl einen nicht zu vernachlässigenden Kostenfaktor. Auch die Entsorgungsproblematik alkalischer und phosphathaltiger Abwässer sollte bei der weiteren Prozessoptimierung berücksichtigt werden. Das Einsparpotenzial ließe sich beispielsweise durch Wiederverwendung der Regenerations- und Reinigungslösungen weiter erhöhen.

4 Experimenteller Teil II:

Etablierung und Charakterisierung der enzymatischen Patatinhydrolyse

Zur Gewinnung bioaktiver Peptide aus Kartoffelprotein bietet sich insbesondere die Patatin-Fraktion an. Die PI-Fraktion ist ungeeignet, da sie inhibierend auf die proteolytische Aktivität verschiedener Proteasen wirkt und somit eine effektive Umsetzung verhindert. Die enzymatische Patatinhydrolyse wurde mit physiologischen, pflanzlichen und technischen Endoproteasen getestet. Physiologische Enzyme wie Pepsin, Trypsin und Chymotrypsin spielen eine entscheidende Rolle bei der Proteinhydrolyse im Verdauungssystem des Menschen. Das Screening der erzeugten Peptide *in vitro* liefert somit wichtige Informationen über mögliche Spaltprodukte mit biologischer Aktivität, die während des Verdaus im menschlichen Körper freigesetzt werden. Des Weiteren wurde der Einsatz der technischen Protease Alcalase und des pflanzlichen Papains geprüft, um prozesstechnische Ansätze zur Gewinnung vorverdauten Proteins bzw. bioaktiver Peptide aufzuzeigen.

Im Folgenden wird zunächst kurz auf diese Enzyme und die spezifischen Anforderungen an die Hydrolysebedingungen eingegangen, bevor verschiedene Methoden und Techniken aufgezeigt werden, mit denen sich die entstandenen Produkte aufreinigen und charakterisieren lassen.

4.1 Hydrolysebedingungen

Die beim enzymatischen Verdau von Patatin verwendeten Endoproteasen hydrolysieren Peptidbindungen unter moderaten pH- und Temperaturbedingungen. Screeningversuche zur Patatinhydrolyse im kleinen Maßstab wurden mittels eines thermostatisierten Rührschüttler in 2 mL-Reagierhütchen durchgeführt. Zur Produktion größerer Mengen an Hydrolysaten wurde ein Setup im 100 mL-Maßstab angewandt (s. Abbildung 18).

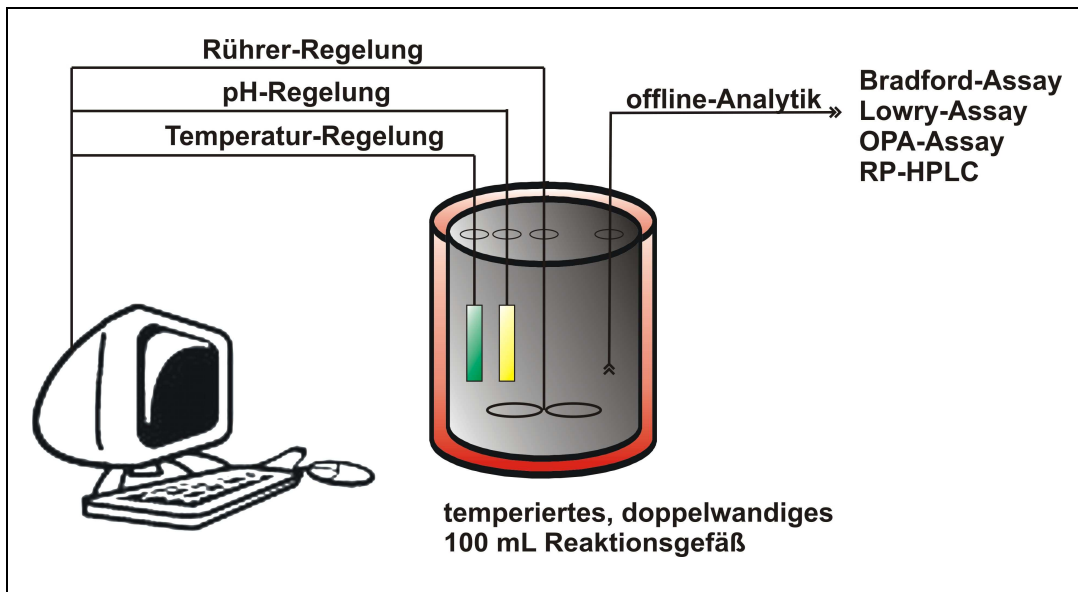


Abbildung 18: Setup der Patatinhydrolyse im 100 mL-Maßstab

Die optimalen Reaktionsbedingungen hinsichtlich Temperatur und Puffersystem leiten sich aus den physikalischen Eigenschaften der eingesetzten Enyme ab.

Pepsin ist eine saure Endopeptidase (E.C. 3.4.23.1) mit einer Molekülmasse von 34,6 kDa und einer Länge von 327 Aminosäuren (Pepsin vom Schwein). Gebildet wird es bei Wirbeltieren unter Einwirkung der Magensalzsäure aus Pepsinogen, das von den Hauptzellen (*Exocrinocyti principales*) der Magen-Fundusdrüsen als inaktive Vorstufe sezerniert wird. Zwei Aspartat-Reste im aktiven Zentrum fungieren als funktionelle Aminosäuren und katalysieren die Spaltung von Proteinen nach hydrophoben, aromatischen Resten in P1- und P1'-Position. Weiterhin ist beschrieben, dass Pepsin vorrangig an der Carboxylgruppe von Phenylalanin, Tryptophan, Tyrosin und Leucin spaltet [113,114]. Die höchste Aktivität besitzt Pepsin bei Temperaturen zwischen 37-42 °C und pH-Werten zwischen pH 1,5-3. Oberhalb von pH 8,5 wird das Enzym bei Raumtemperatur irreversibel inaktiviert [115,116]. Um pH-Konstanz im Bereich des Aktivitätsoptimums von Pepsin zu gewährleisten, wurde das Medium mit Phosphatpuffer bei pH 2 gepuffert.

Die Serinproteasen Trypsin (EC 3.4.21.4) und Chymotrypsin (EC 3.4.21.1) werden als inaktive Vorstufen (Trypsinogen bzw. Chymotrypsinogen) im Pankreas abgesondert und im Dünndarm durch Abspaltung eines Propeptids in ihre aktive Form überführt. Trotz der strukturellen Ähnlichkeit unterscheiden sie sich hinsichtlich der Substratspezifität. Während Trypsin bevorzugt nach Lysin und Arginin schneidet, spaltet Chymotrypsin Peptidbindungen insbesondere nach großen hydrophoben Seitenketten. Trypsin und

Chymotrypsin entfalten ihre optimale Wirkung bei pH 7,5-8,5 und 37°C, wobei sich die Aktivität und Stabilität von α -Chymotrypsin durch Calciumionen zusätzlich erhöhen lässt. Für den tryptischen Verdau wurde daher ein Phosphatpuffer bei pH 8 verwendet. Die Hydrolyse mit Chymotrypsin erforderte die Zugabe von Calciumchlorid, das bei der standardmäßigen Verwendung von Phosphatpuffer zu unlöslichen Calciumphosphat-Präzipitaten führte. Daher wurden alternative Puffersysteme ausgetestet. Als geeignet erwies sich Triethanolaminpuffer bei pH 7,8, der im Gegensatz zum ebenfalls in der Literatur beschriebenen Tris-Puffer nicht mit der nachfolgenden Analytik (OPA-Test, siehe 4.2) interferierte.

Die Hydrolysen wurden bei 37 °C mit 5 g/L Patatin als Substrat und physiologischen Konzentrationen an Pepsin (210 U/ml, 42 U/mg Patatin), Trypsin (690 U/ml, 138 U/mg Patatin) bzw. Chymotrypsin durchgeführt. Die Verdaus wurden nach 120 min durch Hitzeinaktivierung des Enzyms beendet.

Die Cysteinproteinase Papain (EC 3.4.22.2) wird aus dem Latexsaft des Papayabaumes (*Carica papaya*) gewonnen und hydrolysiert Proteine unspezifisch. Allerdings werden Peptidbindungen mit großen hydrophoben Seitenketten an P2-Position bevorzugt gespalten und Valin in P1-Position nicht akzeptiert. Das pH-Optimum liegt im neutralen Bereich, wobei Papain gegenüber chemischen (pH 3-7) und physikalischen Einflüssen (insbesondere Temperaturen bis 60°C) ungewöhnlich stabil ist [117]. Die Hydrolyse von 5 g/L Patatin wurde mit Papain (0,45 U/mL) in Phosphatpuffer bei pH 7 und 37 °C durchgeführt und nach 120 min durch Hitzeinaktivierung beendet. Zur Steigerung der Enzymaktivität wurden außerdem Cystein und EDTA zugesetzt.

Alcalase (synonym: Subtilisin Carlsberg) zählt zu den Subtilisinen (EC 3.4.21.62), einer Familie verschiedener Serin-Endoproteasen, deren wirtschaftliche Bedeutung anhand der industriellen Produktion von allein 900 t in der EU (2002) und dem verbreiteten Einsatz in der Waschmittelindustrie offenkundig wird. Alcalase wurde biotechnologisch aus dem rekombinanten Produktionsstamm *Bacillus licheniformis* gewonnen. Es zeichnet sich durch breite Substratspezifität aus, wobei bevorzugt an sauren und neutralen Aminosäuren gespalten wird. Alcalase besitzt eine hohe Enzymaktivität in einem weiten pH-Bereich (Optimum im neutralen bis leicht alkalischen Bereich). Daher konnte die Hydrolyse besonders einfach und kostengünstig in einem ungepufferten System mit deionisiertem Wasser durchgeführt werden, wodurch in der Aufarbeitung zusätzliche Entsalzungsschritte nicht erforderlich sind. Zur Bestimmung der geeigneten Enzym/Substrat-Konzentrationen wurden Hydrolysebedingungen mit unterschiedlichen

Substratkonzentrationen (0,05 - 5 g/L Patatin) und variierten Volumenkonzentrationen an Alcalase (0,01 - 1 %) getestet. Verdünnungseffekte bei geringen Substratkonzentrationen hatten keinen signifikanten Einfluss auf die Kinetik der enzymatischen Reaktion. Aus der Bestimmung des Hydrolysegrades DH (degree of hydrolysis) nach der OPA-Methode (Kap. 4.2) ging hervor, dass für maximale Hydrolysegrade im untersuchten Reaktionsintervall mehr als 20 mL Alcalase pro g Patatin notwendig sind (Abbildung 20). Jedoch sind bereits bei einer zehnfach geringeren Menge (2 mL/g Patatin) Hydrolysegrade von ca. 20 % möglich. Dies entspricht im Mittel der Hydrolyse auf die Größe von Pentapeptiden und genügt der Anforderung zur Gewinnung physiologisch resorbierbarer Peptide. Die Hydrolysen von 5 g/L Patatin wurden daher in einer wässrigen 1 %igen Alcalaselösung bei 37 °C durchgeführt und nach 120 min durch Hitzeinaktivierung beendet.

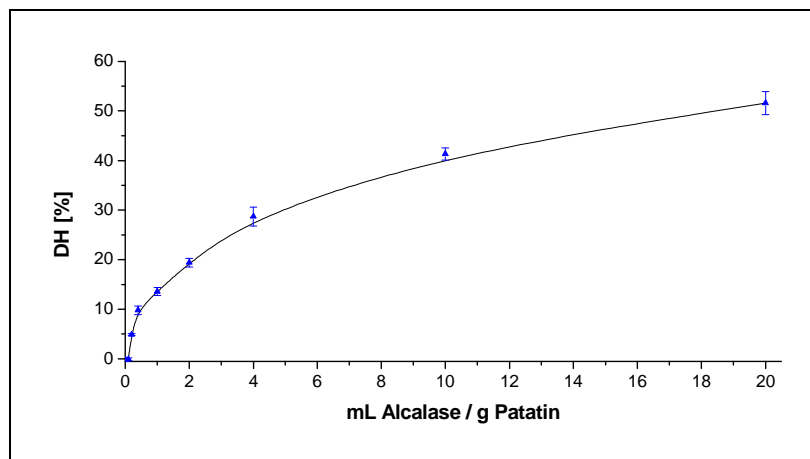


Abbildung 19: Anhängigkeit des Hydrolysegrades vom Verhältnis Alcalase zu Patatin

4.2 Bestimmung des Hydrolysefortschritts

4.2.1 Bradford-Assay zur Abschätzung des Proteinabbaus

Der Bradford-Proteinassay bietet sich als Methode an, um den Proteinabbau abzuschätzen und somit erste Hinweise bzgl. des Hydrolysefortschritts zu erhalten. Die Proteinkonzentration des Substrats Patatin wird gemessen, während kleinere Hydrolyseprodukte (Peptide unter 3 kDa) nicht erfasst werden. Die Abnahme der gemessenen Proteinkonzentration in einem bestimmten Zeitintervall korreliert also mit

der Proteinabbaurate [118]. Aus den Ergebnissen (Abbildung 20) geht hervor, dass beim Trypsin- und Chymotrypsinverdau keine (oder nur in geringem Maße) Fragmentierung des Patatins stattfindet, während beim Alcalaseverdau bereits nach wenigen Sekunden 90 % des Patatins in Fragmenten < 3 kDa vorliegt. Beim Pepsinverdau ist wegen der höheren Proteaseselektivität eine vergleichsweise langsamere Hydrolyse zu beobachten; es werden 80 % des Patatins in Fragmente < 3 kDa hydrolysiert. Der Papainverdau konnte nicht untersucht werden, da Patatin im Puffersystem bei pH 7 in Kombination mit EDTA, Phosphat- und Natriumionen zur Koagulation neigt und bei der Probenvorbereitung abgetrennt wurde.

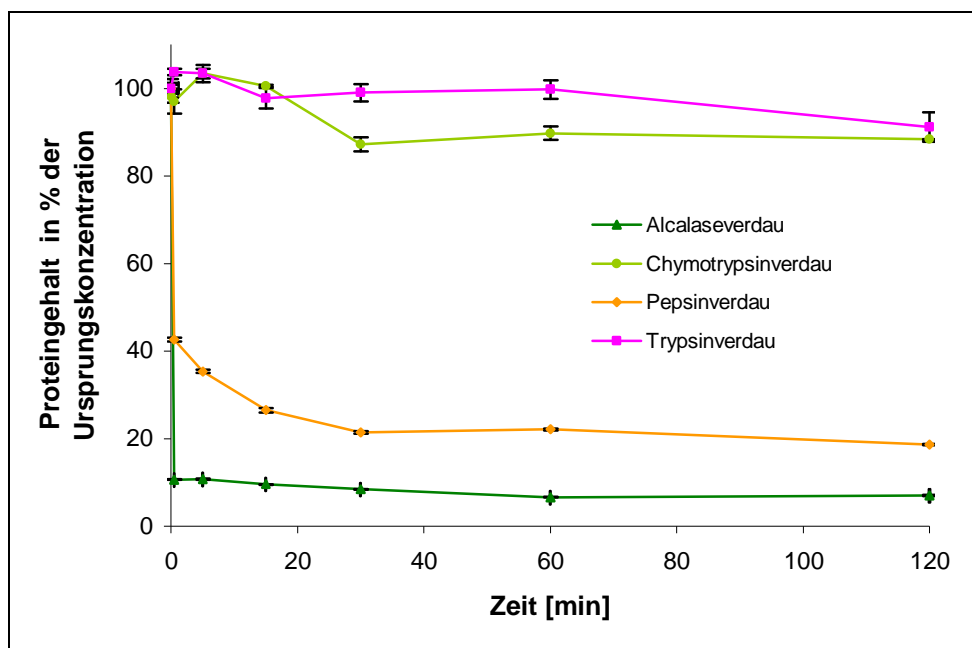


Abbildung 20: Proteingehalt während der Hydrolyse laut Bradford

Es gilt zu beachten, dass lediglich eine Aussage über die Qualität des Proteinverdaus gemacht werden kann, nämlich wieviel Protein im betrachteten Zeitraum in Peptide mit einer Größe kleiner 3 kDa gespalten worden ist. Um differenziertere Informationen über den Hydrolysefortschritt zu erhalten, wurde im Folgenden eine alternative Methode zur Beschreibung des Reaktionsfortschritts angewandt.

4.2.2 OPA-Test zur Bestimmung des Hydrolysegrades

Eine der wichtigsten Kennzahlen zur Beschreibung des Verlaufs eines Proteinverdaus ist der Hydrolysegrad DH (Degree of Hydrolysis). Per Definitionem ergibt er sich aus

der Anzahl der gespaltenen Peptidbindungen, den sog. Hydrolyse-Äquivalenten h , in Relation zur Gesamtzahl der Peptidbindungen eines gegebenen Peptides h_{tot} .

$$(1) \quad DH = h / h_{tot} * 100 \%$$

Zur Bestimmung des DH sind in der Literatur zahlreiche verschiedene Methoden beschrieben, die sich hinsichtlich der Anwendbarkeit und Praxistauglichkeit unterscheiden. Die osmometrische Kryoskopie ist zwar schnell durchführbar, lässt sich jedoch nicht in salzhaltigen oder viskosen Medien zuverlässig einsetzen. Die Korrelation über den Anteil des TCA-löslichen Stickstoffs ist limitiert auf Proteasen mit reiner Endoaktivität und liefert keine quantitativen Ergebnisse über die Anzahl der gespaltenen Peptidbindungen. Häufig findet die praktikable pH-Statierungsmethode Anwendung. Durch Titration mit einer Base wird der pH-Wert während der Hydrolyse konstant gehalten, wobei der Verbrauch proportional zum Hydrolysegrad ist. Diese Verfahrensweise ist allerdings auf pH-Werte oberhalb von 7 beschränkt, weshalb sie bei der Hydrolyse im sauren Medium (z.B. für die Hydrolyse mit Pepsin) nicht geeignet ist. Die spektrophotometrische TNBS-Methode basiert auf der Reaktion primärer Aminogruppen mit Trinitrobenzol-Sulfonsäure (TNBS). Nachteilig auf die Anwendbarkeit wirken sich jedoch der hohe Zeit- und Arbeitsaufwand aus. Darüber hinaus ist das TNBS-Reagenz instabil und toxisch.

Um eine schnelle und genaue Information über den Reaktionsfortschritts bzw. den Hydrolysegrad zu erhalten, wurde ein analoger Assay etabliert. Die aus der Spaltung der Protein-Peptidbindungen hervorgehenden Amino-Gruppen wurden mit *ortho*-Phthaldialdehyd (OPA) in Gegenwart einer SH-Verbindung derivatisiert und konnten bei einer Wellenlänge von 340 nm detektiert werden. Als SH-Verbindung wird üblicherweise beta-Mercaptoethanol oder alternativ das umweltverträglichere Dithiotreitol (DTT) eingesetzt. Durch Kalibrierung mit Standards der Aminosäure Serin wird eine indirekte Quantifizierung hydrolysierter Peptidbindungen und die Angabe des Hydrolysegrades ermöglicht. Die Korrelation mit der weniger präzisen, aber dennoch weit verbreiteten TNBS-Methode ist sehr gut. Ein großer Vorteil dieser Methode ist, dass Einzelbestimmungen in nur 2 min durchgeführt werden können, so dass eine direkte Beobachtung der Hydrolyse, ähnlich wie beim pH-stat, möglich ist. Werden die Proben während der Hydrolyse entnommen und inaktiviert, lässt sich eine große Anzahl

an Proben mit geringem Chemikalieneinsatz simultan auf Mikrotiterplatten auswerten [119].

Zur Bestimmung des DH über die OPA-Methode muss zunächst h_{tot} (Gesamtzahl der Peptidbindungen) und h (Hydrolyseäquivalente) berechnet werden. h_{tot} wird in äquivalenten Peptidbindungen pro Kilogramm Peptid/Protein angegeben.

$$(2) \quad h_{tot} = 1.000 \text{ [meq/g] Protein/mittlere Molmasse der Aminosäuren}$$

In der Regel liegt dieser Wert aufgrund der mittleren Molmasse der Aminosäuren von 125 g/mol bei etwa 8 meq/g. Auf Basis der aus Datenbanken zugänglichen Aminosäuresequenz (Q2MY59) wurde für Patatin ein exakter Wert von 8,4 meq/g berechnet. Über die Referenzabsorption des Serins wird h und anschließend über Formel (1) der Hydrolysegrad bestimmt. Die genauen Berechnungen sind im Anhang (s. Kapitel 6.5.3, S. 110) dargestellt.

Die Ergebnisse des OPA-Assays für die enzymatischen Hydrolysen von Patatin und damit die Hydrolyseverläufe sind in Abbildung 21 dargestellt. Sie erreichen beim Verdau mit Alcalase einen maximalen DH von $22,9 \pm 0,2 \%$, beim Pepsin-Verdau $9,3 \pm 0,2 \%$ und beim Papain-Verdau $5,8 \pm 0,1 \%$. Bereits nach 5 min sind die enzymatischen Peptidspaltungen zu 60-80 % abgeschlossen. Nach 120 min nähern sie sich einem klassischen Sättigungsverlauf. Eine erneute Zugabe an Enzym nach 120 min lieferte keinen weiteren Anstieg an freien Peptidbindungen, wohingegen eine wiederholte Substratgabe zu einer signifikanten Zunahme führte. Dies lässt darauf schließen, dass das Substrat nahezu vollständig umgesetzt wurde, wobei die Aktivität der Enzyme erhalten blieb.

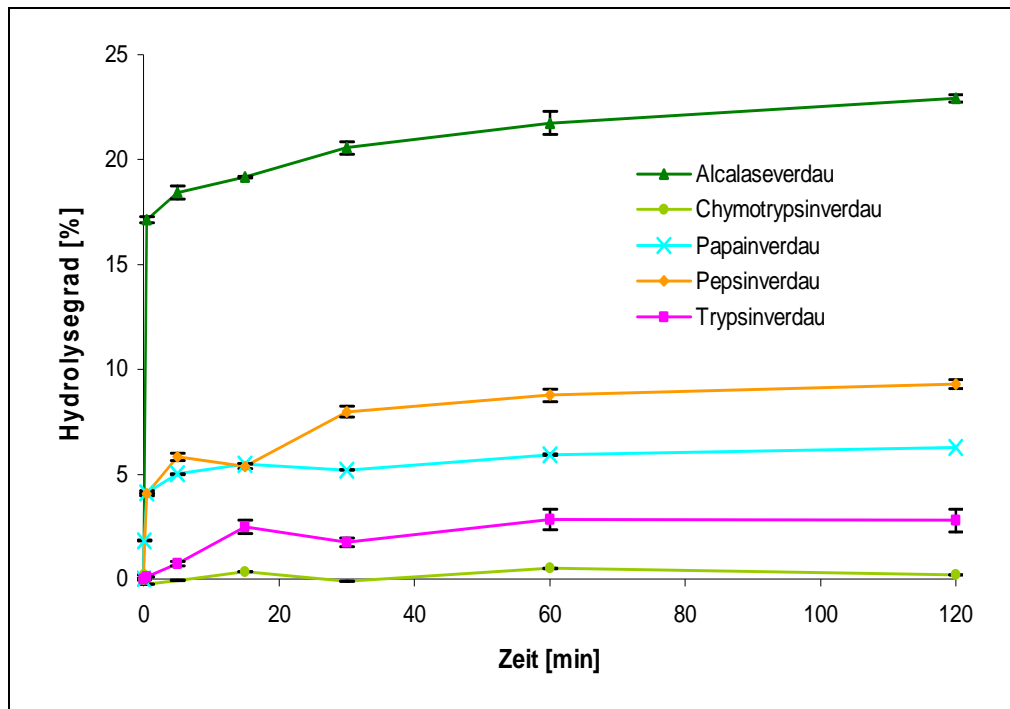


Abbildung 21: Verlauf des Hydrolysegrades beim Verdau von Patatin (OPA-Assay)

Der Trypsinverdau lieferte lediglich einen geringen DH von $2,8 \pm 0,5$ %; beim Chymotrypsin-Verdau konnte kein nennenswerter Substratumsatz ermittelt werden ($\text{DH} = 0,82 \pm 0,01$ %). Beide Enzyme gehören zu den Serinproteasen (EC 3.4.21), deren Aktivität möglicherweise durch Verunreinigungen an Proteaseinhibitoren im Patatin beeinträchtigt wurde. Gestärkt wird diese These dadurch, dass die meisten dieser Proteaseinhibitoren Chymotrypsin stärker als Trypsin inhibieren [6]. Ein ergänzender Erklärungsansatz liegt in der Hydrolysespezifität der Enzyme. Das Aminosäurespektrum von Patatin bietet Trypsin und Chymotrypsin wenige potentielle Peptidspaltstellen. Aus der theoretischen Berechnung der maximalen Hydrolysegrade wurde für Trypsin ein DH von 8,8 % und für Chymotrypsin ein DH von 9,1 % ermittelt, während sich mit Pepsin theoretisch bis zu 21 % hydrolysieren lassen. Von diesen Werten ausgehend, stimmen die Verhältnisse zwischen Pepsin und Trypsin überein. Mit dem OPA-Test konnte eine stabile, gut reproduzierbare Methode zur Überprüfung des Hydrolysegrades etabliert werden. Die Fehlertoleranzen bestätigen die Verlässlichkeit der Methode zur Verfolgung des Hydrolyseverlaufs. Patatin ließ sich gut mit den Proteasen Pepsin, Alcalase und Papain hydrolysieren. Die entstandenen Hydrolyseprodukte werden im Folgenden näher untersucht. Trypsin und Chymotrypsin erscheinen nach diesem Test für die Gewinnung von Peptiden nicht geeignet.

4.3 Untersuchung der Hydrolysate durch RP-HPLC

Um differenzierte Informationen über die Abbauprodukte der Hydrolyse zu gewinnen, wurde eine RP-HPLC-Methode entwickelt, mit der sogenannte Peptid-Fingerprints erstellt werden können. Diese liefern qualitative Erkenntnisse über die Peptid-Zusammensetzung während bzw. nach der Patatinydrolyse.

4.3.1 RP-HPLC-Peptidanalytik

Die zentrifugierten Protein-Hydrolysate wurden an einer speziell für Peptide entwickelten Trennsäule (C₁₂-JupiterProteo, Phenomenex GmbH, Aschaffenburg/Deutschland) analysiert. Als mobile Phase wurde ein Zwei-Komponenten-Gradientensystem aus wässrigem Eluenten (deion. H₂O mit 0.1 % [v/v] TFA) und organischem Eluenten (Acetonitril mit 0.1 % [v/v] TFA) verwendet. Die Parameter wie Gradientenrate und Flussrate wurden auf niedrige Basislinienabsorption, Peakhöhe und Auflösung hin mit einem Peptidstandard-Mix (Gly-Tyr, Val-Tyr-Val, Methionin-Enkephalin, Leucin-Enkephalin, Angiotensin II, Insulin) optimiert (s. Anhang 6.4.1). Das Elutionsprofil sowie das Laufverhalten des Standards unter den optimierten Trennbedingungen ist Abbildung 22 dargestellt.

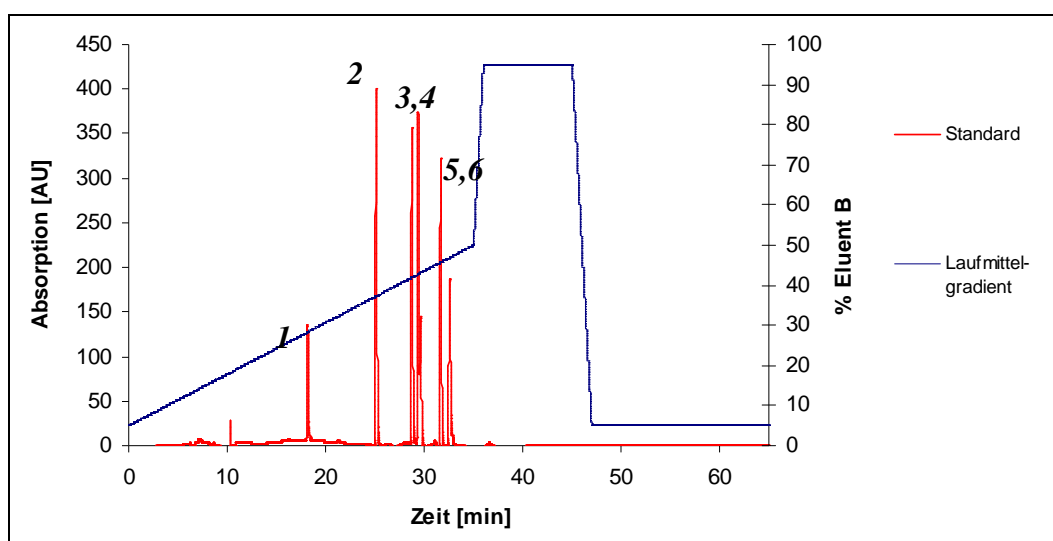


Abbildung 22: Chromatogramm der optimierten Trennung mit Peptidstandards inkl. Elutionsprofil (A = deion. H₂O mit 0,1 % [v/v] TFA, B = Acetonitril mit 0,1 % [v/v] TFA); UV-Detektion: 214 nm, Flussrate: 0,4 mL/min; Temperatur 40 °C; (1) Gly-Tyr, (2) Val-Tyr-Val, (3) Met-Enkephalin, (4) Leu-Enkephalin, (5) Angiotensin II, (6) Insulin

4.3.2 Bewertung der Peptid-Fingerprints im Verlauf der Hydrolyse

Die Hydrolyseverläufe des Pepsinverdaus und des Alcalaseverdaus anhand der Peptid-Fingerprint sind in Abbildung 23 und Abbildung 24 dargestellt. Zusätzlich zum Standard wurde das Substrat Patatin im entsprechenden Hydrolysesystem zum Hydrolysezeitpunkt $t = 0$ gemessen. Der Chromatogramm-Peak mit einer Retentionszeit $R_t = 37-43$ kann daher Patatin zugeordnet werden. Bereits nach 0,5 min ist Patatin zu ca. 80 % abgebaut und in Peptide gespalten worden. Nach 30 min Hydrolysezeit ist nur noch ca. 5 % der ursprünglichen Patatinkonzentration vorhanden, während das Substrat nach 120 min vollständig hydrolysiert ist und nicht mehr nachweisbar ist. Das Peptidspektrum verschiebt sich im Verlauf der Hydrolyse zu geringern R_t von rechts (große oder hydrophobe Peptide) nach links (kleine oder hydrophile Peptide). Nach 30 min ist keine signifikante Veränderung in den Peptid-Fingerprints festzustellen.

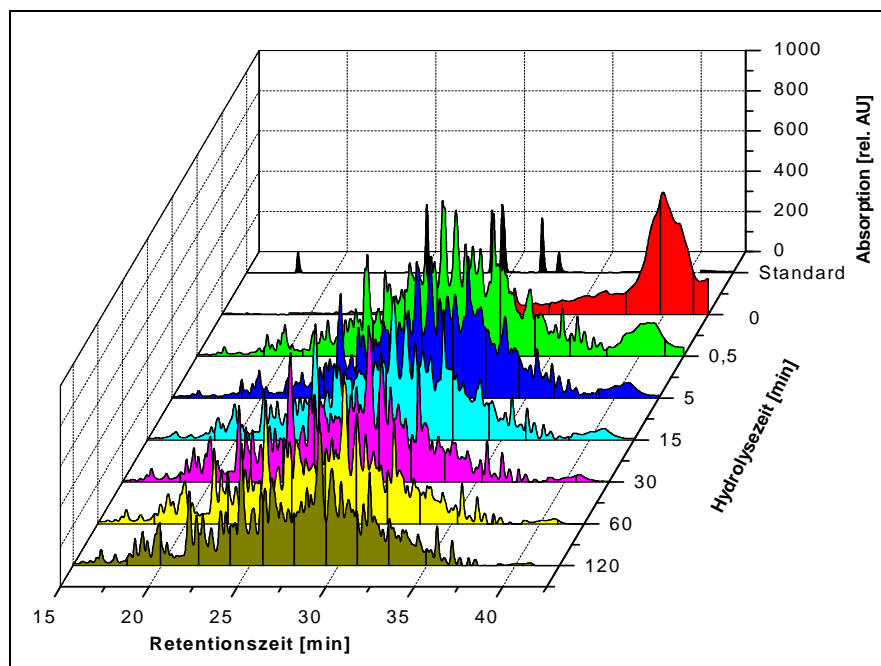


Abbildung 23: Peptid-Fingerprints im Verlauf der Patatinhydrolyse mit Pepsin; Standard: Gly-Tyr, Val-Tyr-Val, Methionin-Enkephalin, Leucin-Enkephalin, Angiotensin II, Insulin

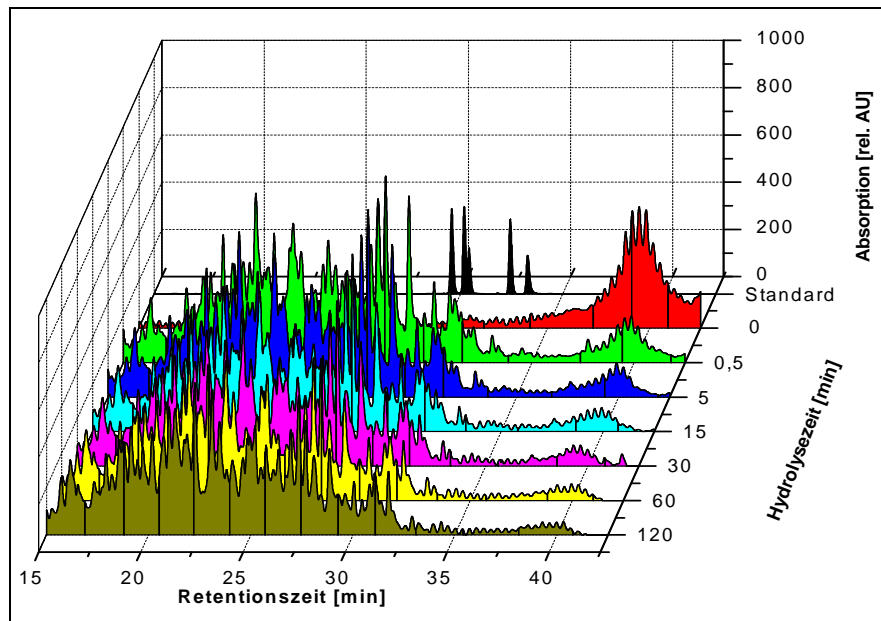


Abbildung 24: Peptid-Fingerprints im Verlauf der Patatinhydrolyse mit Alcalase; Standard: Gly-Tyr, Val-Tyr-Val, Methionin-Enkephalin, Leucin-Enkephalin, Angiotensin II, Insulin

Beim Papainverdau konnte zum Zeitpunkt $t=0$ kein Patatin in Lösung detektiert werden. Nicht umgesetztes Patatin wurde im Puffersystem bei pH 7 in Kombination mit EDTA, Phosphat- und Natriumionen koaguliert und während der HPLC-Analysevorbereitung der Proben (Zentrifugation) entfernt. Auf die Hydrolyse mit Papain und die daraus resultierenden Peptid-Fingerprints hatte die Ausfällung des Patatins jedoch keinen Einfluss.

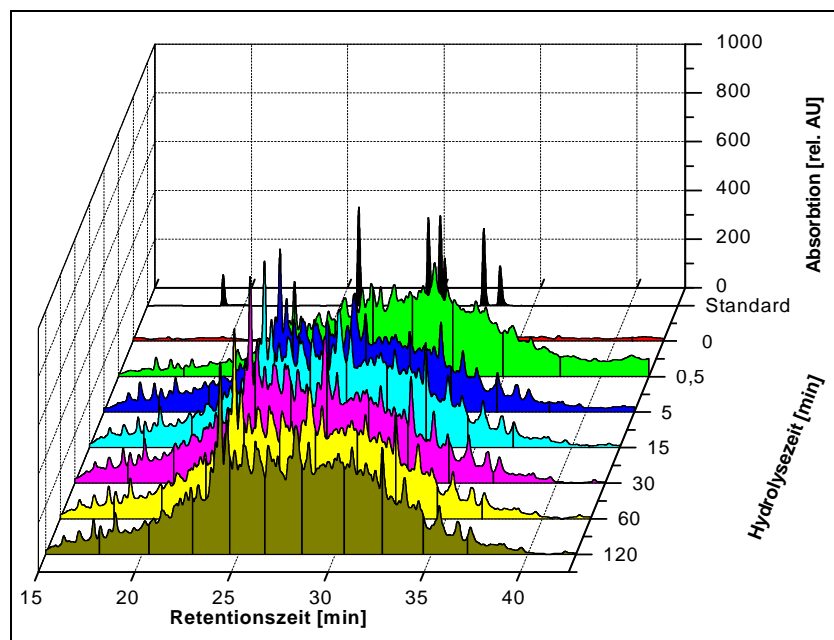


Abbildung 25: Peptid-Fingerprints im Verlauf der Patatinhydrolyse mit Papain; Standard: Gly-Tyr, Val-Tyr-Val, Methionin-Enkephalin, Leucin-Enkephalin, Angiotensin II, Insulin

4.3.3 Peptid-Fingerprints der Hydrolyseprodukte

Die Peptid-Fingerprints der Hydrolyseprodukte nach 2 h Reaktionszeit sind in Abbildung 26 zusammengefasst.

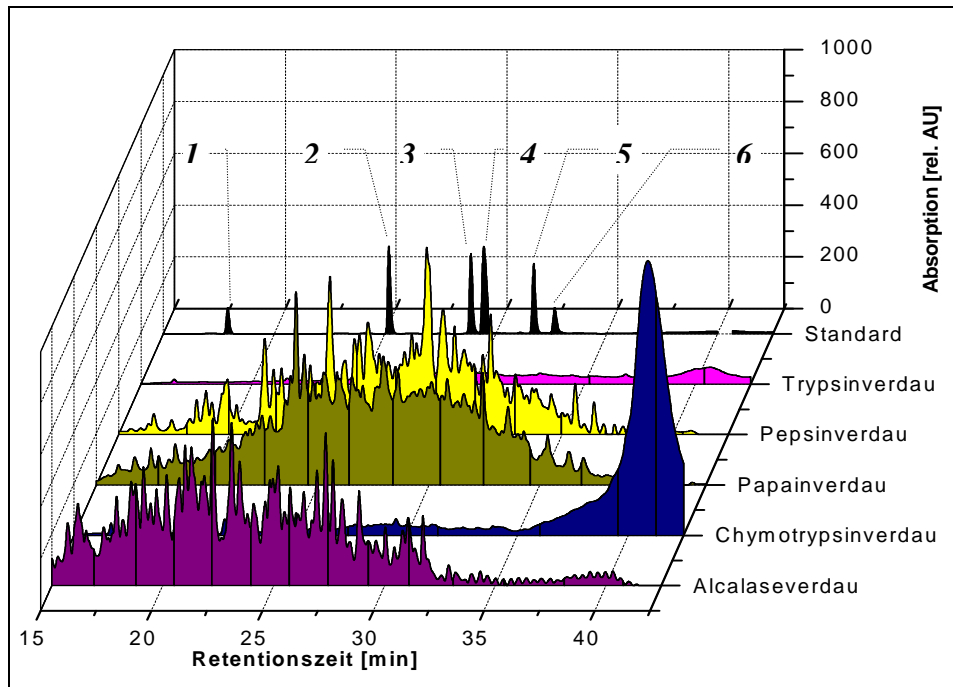


Abbildung 26: Peptidfingerprints der Patatinhydrolysate nach 120 min Hydrolysezeit; UV-Detektion: 214 nm, Gradientenflussrate: 0,4 mL/min; Temperatur 40 °C; (1) Gly-Tyr, (2) Val-Tyr-Val, (3) Met-Enkephalin, (4) Leu-Enkephalin, (5) Angiotensin II, (6) Insulin

Die Peptidchromatogramme zeigen bei niedrigen R_t kleine bzw. hydrophile Peptide und bei hohen R_t große bzw. hydrophobe Peptide/Proteine. Weder beim Hydrolyseprodukt des Chymotrypsinverdaus noch bei dem des Trypsinverdaus konnten Peptide nachgewiesen werden. Dies korreliert mit den ermittelten niedrigen OPA-Hydrolysegraden ($DH_{Try} = 2,79\%$, $DH_{Chy} = 0,82\%$). Beim Trypsinverdaus konnte kein Substrat detektiert werden. Grund hierfür ist, dass Patatin im Trypsin-Puffersystem bei Hitzeinaktivierung zur Koagulation neigt und daher bei der Probenvorbereitung abgetrennt wurde. Die Hydrolyseprodukte der Verdauung mit Alcalase, Pepsin bzw. Papain liefern Peptid-Fingerprints mit breiten Peptidspektren. Aufgrund der Komplexität der erhaltenen Peptidgemische ließen sich die Peaks nicht Basisliniengetrennt auflösen. Das Peptidspektrum des Alcalaseverdaus weist eine vergrößerte Peakdichte mit hohen Peptidkonzentrationen bei $R_t = 17,5-27,5$ min auf. Der Vergleich mit den Peptidstandards deutet qualitativ auf Aminosäuren und Peptide mit einer Kettenlänge von 2-6 Aminosäuren hin. Vor allem kleinere (2-4 Aminosäuren) bzw.

hydrophile Peptide lassen sich in höheren Konzentrationen nachweisen. Dies deckt sich mit den Erkenntnissen zum Hydrolysegrad aus dem OPA-Assay (DH = 22,9 %). Die Chromatogramme der Pepsin- und Papainverdaus zeigen Bereiche mit hohen Peptidkonzentrationen bei $R_t = 22,5-32,5$ min, was auf größere Peptide mit Kettenlängen von 3-8 Aminosäuren hinweist.

4.3.4 Untersuchung der freien Aminosäuren

Hohe Gehalte an freien essentiellen L-Aminosäuren werten einerseits die nutritive Qualität der Hydrolysate auf, andererseits schränkt der Abbau bis hinunter zur Aminosäure die Ausbeuten an Oligopeptiden mit potentieller physiologischer Wirksamkeit ein. Zur umfassenden Dokumentation der Abbauprodukte in den Patatinhydrolysaten wurden daher die freigesetzten Aminosäuren analysiert. Die Quantifizierung der freien Aminosäuren liefert außerdem wertvolle Hinweise zur Selektivität und Spezifität der verwendeten Proteasen. Die angewandte RP-HPLC-Methode mit Methanol/H₂O-Gradient sowie Probenvorbereitung und OPA-Vorsäulenderivatisierung werden im Anhang beschrieben. In Tabelle 21 sind die Gehalte an freien Aminosäuren der Hydrolyseprodukte und des Substrats Patatin dargestellt. Im Patatin konnten geringe Mengen freier Aminosäuren von insgesamt 7,14 mg/g nachgewiesen werden, die auf unspezifische Degradation des Substrats zurückzuführen ist. Ein Beleg hierfür ist, dass die Mengen der einzelnen Aminosäuren mit dem Aminosäurespektrum der Patatinsequenz korrelieren.

Durch den Hydrolyseprozess mit den technischen Proteasen Alcalase und Papain stiegen die Gesamtgehalte um den Faktor 6-9. Dies ist als Hinweis auf eine geringe hydrolytische Exoaktivität zu werten. Demgegenüber lieferten die Hydrolysen mit den Verdauungsenzymen Pepsin, Trypsin und Chymotrysin nur geringe Aminosäurekonzentrationen von 19,27-27,08 mg/g, so dass die Exoaktivität zu vernachlässigen ist. Die Zunahme an einzelnen Aminosäuren in den Hydrolysaten ist in der Regel proportional zur autolytisch freigesetzten Menge im Patatin, so dass insgesamt von unspezifischer Exoaktivität ausgegangen werden kann. Höhere Leucinwerte können mit der relativen Häufigkeit des Leucins in der Aminosäuresequenz des Patatins erklärt werden. Leucin ist mit 40 von 381 Aminosäuren mengenmäßig am stärksten vertreten.

Tabelle 21: RP-HPLC-Analytik der Patatinhydrolysate

Aminosäure	Konzentration an freien Aminosäuren [mg/g Substrat]					
	Patatin	Alcalase-verdau	Papain-verdau	Pepsin-verdau	Trypsin-verdau	Chymotrypsin-verdau
essentiell						
His	0,35	2,48	1,53	0,65	0,39	0,35
Ile	0,49	4,16	1,71	1,39	1,98	1,28
Leu	1,41	18,21	8,50	6,07	3,43	3,14
Met/Val	0,84	4,07	2,21	1,49	4,23	2,46
Phe	0,93	10,71	5,12	4,77	1,70	1,58
Thr	0,53	2,89	1,75	0,61	1,42	1,39
Trp	0,16	2,64	2,41	1,51	0,54	0,62
nicht-essentiell						
Ala	0,66	4,06	5,48	1,50	1,76	1,47
Arg	0,11	1,34	0,69	2,91	2,66	1,63
Asp	0,27	1,15	1,05	0,54	0,52	0,98
Asn	0,32	1,93	1,79	0,71	0,79	0,35
Glu	0,42	2,78	1,66	2,13	1,51	1,03
Gln	0,20	2,76	1,37	1,90	1,51	1,48
Gly	0,61	1,90	5,26	0,68	0,83	0,66
Ser	0,34	2,63	2,25	0,85	1,58	1,39
Tyr	0,35	4,36	4,39	1,41	0,61	1,10
Total	7,14	61,42	43,92	27,08	23,08	19,27

Im Falle der Aminosäuren Phenylalanin, Tryptophan und Tyrosin ist die vergleichsweise hohe Zunahme darauf zurückzuführen, dass Alcalase und Papain bevorzugt nach aromatischen bzw. hydrophoben Aminosäuren spalten (spezifische Endoaktivität). Folglich sind diese Aminosäuren überproportional an terminalen Enden von Peptidbruchstücken lokalisiert und werden statistisch häufiger autolytisch abgespalten. Gleichmaßen resultieren überproportional hohe Werte an Leu, Phe, Tyr und Trp beim Pepsinverau aus der endoselektiven Spaltung nach diesen Aminosäuren. Es kann festgehalten werden, dass die Hydrolyse zu Aminosäuren innerhalb des Reaktionsfensters (2 h) nur in geringem Maße auftritt. Mögliche Exoaktivität insbesondere der technischen Proteasen Alcalase und Papain wird von vorherrschenden autolytischen Effekten überlagert. Die Aminosäurezusammensetzungen der Verdaus weisen auf die selektive Endoaktivität der verschiedenen Proteasen hin.

4.4 Fraktionierung von Patatinhydrolysaten

Pihlanto *et al.* beschreiben die Trennung von Kartoffelproteinhydrolysaten mit Membran-Ultrafiltrationseinheiten [53]. Wegen der unspezifischen Ausschlussgrenzen der Membranporen erscheint die Fraktionierung jedoch wenig selektiv. Erste Versuche im 1,5 mL Maßstab (MWCO: 10 kDa bzw. 3 kDa) belegten diese These. Die Membraneinheiten lieferten keine befriedigende Auftrennung und verblockten beim ersten Zyklus. Komplexe Peptidgemische werden in der Regel nach physikalischen Eigenschaften wie Größe, Hydrophilie und/oder isoelektrischem Punkt getrennt. Etablierte und weit verbreitete Techniken sind die Chromatographie und die Elektrophorese. Zu den wichtigsten Vertretern im analytischen Bereich zählen die Gel- und Kapillarelektrophorese sowie die RP-HPLC. Für präparative Fraktionierungen bietet sich die Mitteldruck-Flüssigkeitschromatographie (FPLC) an, die nach dem Prinzip des Größenausschlusses (SEC) separiert. Im Vergleich zu analytischen Methoden lassen sich größere Mengen applizieren und trennen. Die Elution erfolgt isokratisch in wässrigen Puffersystemen, so dass auf den kostenintensiven Einsatz organischer Lösemittel verzichtet werden kann.

4.4.1 Aufarbeitung und Fraktionierung der Hydrolysate

Die FPLC-Gelfiltration wurde an einem Komposit aus Dextran und Agarose (Superdex 30 prep grade, GE Healthcare) als stationäre Phase getestet. Dieses Material trennt nach dem Prinzip der Größenausschlusschromatographie Moleküle im Bereich von 0 - 10.000 Da. Zunächst wurde für unterschiedliche Säulendimensionen (300 mm x 10 mm I.D., 450 mm x 10 mm I.D., 700 mm x 15 mm I.D.) die Zahl der theoretischen Trennböden mit Aceton als Spurstoff bestimmt. Bei einer Betthöhe von 700 mm (I.D. 15 mm) konnte eine zufriedenstellende Trennleistung von über 12.000 Trennböden pro Meter erreicht werden. Als Laufmittel wurde ein Ammoniumhydrogencarbonat-Puffer gewählt. Dieser bietet den Vorteil, dass er sich bei der Gefriertrocknung des Eluats zu den flüchtigen Substanzen Ammoniak und Kohlenstoffdioxid zersetzt und somit ein zusätzlicher Entsalzungsschritt, z.B. durch Dialyse, entfällt.

Optimale Parameter für Puffersalz-Konzentrationen (0,25 M und 0,5 M), Injektionsvolumina (0,05 - 2 mL) und Flussraten (0,2 - 1,5 mL) wurden mit Hilfe eines

Standards (Cytochrom C, 13 kDa; Insulin, 6 kDa; Angiotensin II, 1.046 Da) bestimmt. Die Peptide wurden über die UV-Absorption bei 214 nm detektiert. Ein guter Kompromiss aus maximaler Auflösung und Reproduzierbarkeit, geringer Elutionszeit und minimiertem Chemikalienverbrauch wurde bei folgenden Einflussgrößen erzielt:

- Injektionsvolumen : 1 mL
- Flussrate des Eluenten: 0,8 mL/min (isokratisch)
- Elutionsmittel: 0,25 M NH_4HCO_3 -Puffer

Die FPLC-Chromatogramme der Hydrolyseprodukte (Abbildung 27) zeigen im Zeitintervall zwischen 55 und 60 min einen kleinen Peak.

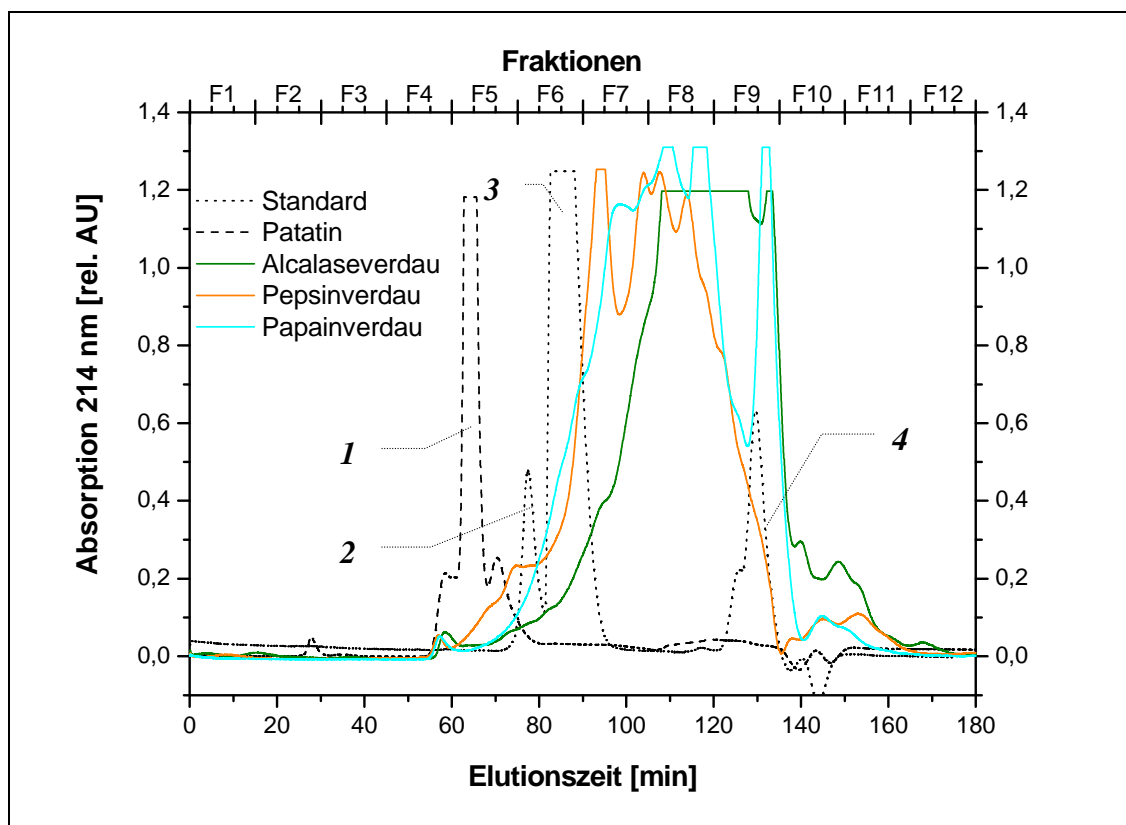


Abbildung 27: FPLC-UV-Chromatogramme der Patatinhydrolysate nach 120 min Hydrolysezeit; Elution mit 0,8 mL/min NH_4HCO_3 (isokratisch); (1) 1 g/L unhydrolysiertes Patatin (ca. 40-44 kDa); Standard je 0,1 g/L: (2) Cytochrom C (13 kDa), (3) Insulin (6 kDa), (4) Angiotensin II (1 kDa)

Der Vergleich mit der R_t von Patatin lässt darauf schließen, dass es sich um das unhydrolysierte Substrat handelt, das mit 44 kDa jenseits der Ausschlussgrenze des Säulenmaterials liegt. Die Größenverteilung der Hydrolyseprodukte der Reaktionen mit Alcalase, Pepsin bzw. Papain reicht vom Ausschlussvolumen der Säule bis zu einer Größe, die unterhalb des Standard-Peaks von Angiotensin II (1046 Da) liegt. Wegen der Komplexität der Hydrolyseprodukte konnte keine Basislinientrennung zwischen zwei

Peaks erreicht werden. Zwölf Hauptfraktionen F1-F12 (entspricht je 12 mL bzw. einem Zeitintervall von je 15 min) wurden gesammelt, die wiederum in drei Teilfraktionen a-c unterteilt wurden. Die Fraktionen F1-F3 liegen im Bereich des Totvolumens der Säule und enthielten lediglich das Laufmittel. Sie spielten für weitere Untersuchungen keine Rolle und wurden verworfen.

4.4.2 Bewertung der SEC-FPLC-Trennleistung

Um die Qualität der Trennleistung beurteilen zu können, wurden am Beispiel des Patatinhydrolysats mit Pepsin die Fraktionen F5 bis F9 gemessen und mit dem Chromatogramm des Gesamthydrolysats verglichen. Abbildung 28 veranschaulicht die Chromatogramme der FPLC-SEC-Analyse.

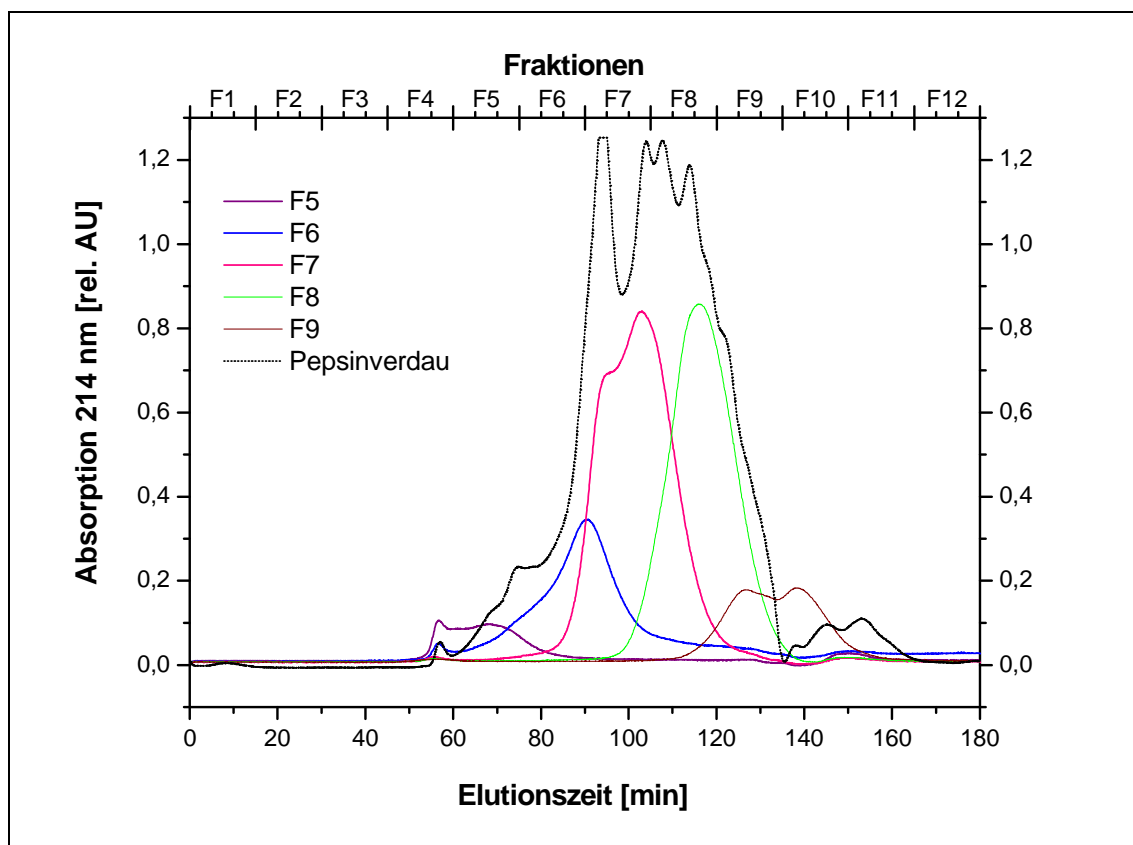


Abbildung 28: Vergleich der FPLC-UV-Chromatogramme einzelner Fraktionen mit dem Gesamtpatatinhydrolysat (enzymatischer Pepsinverdau); Elution mit 0,8 mL/min NH_4HCO_3 (isokratisch)

Bereits ab Fraktion F7 können keine höhermolekularen Bestandteile größer 10 kDa mehr nachgewiesen werden. Die Peak- R_t der Fraktionen liegen im erwarteten Fraktionierungsbereich. Aufgrund der Überschneidungen der Chromatogramme

einzelner Fraktionen kann zwar nicht von einer vollständig definierten Trennung nach Größe ausgegangen werden, dennoch stellt die FPLC-SEC-Methode eine sinnvolle Aufarbeitungstechnik dar, um komplexe Peptidmischungen von unhydrolysiertem Substrat zu trennen, eine grobe Fraktionierung nach Größe zu erzielen und die Proben zu entsalzen.

4.5 Zusammenfassung

Die Hydrolyse der Kartoffelproteinfraktion Patatin wurde mit den pankreatischen Enzymen Trypsin und Chymotrypsin sowie der Magenprotease Pepsin untersucht. Ergänzend wurden die technische Protease Alcalase und das pflanzliche Papain getestet. Um eine schnelle und genaue Information über den Reaktionsfortschritt zu erhalten, wurde ein photometrischer Assay etabliert, der eine indirekte Quantifizierung hydrolysierter Peptidbindungen bzw. die Angabe des Hydrolysegrades ermöglicht. Zusätzlich wurde der Proteinabbau verfolgt. Signifikante Hydrolysegrade konnten beim Verdau mit Alcalase, Papain und Pepsin ermittelt werden. Bei Trypsin und Chymotrypsin wurde keine Hydrolyse des Patatins nachgewiesen. Der Grund hierfür ist wahrscheinlich, dass minimale Verunreinigungen an PI die enzymatische Aktivität inhibieren. Die Hydrolyseprodukte wurden über so genannte Peptid-Fingerprints charakterisiert. Hierzu wurde eine RP-HPLC-Methode etabliert. Die Ergebnisse bestätigten die Inaktivität der pankreatischen Enzyme. Die Alcalase-, Papain- und Pepsinverdaue lieferten komplexe Fingerprints mit Peptiden bis 1,5 kDa, die eine weitere Aufreinigung nötig machten. Mittels einer Größenausschluss-Chromatographie wurden die Hydrolysate fraktioniert, entsalzt und anschließend getrocknet. Im folgenden Kapitel werden Methoden vorgestellt, um die biologische Aktivität der isolierten Produkte zu untersuchen.

4.6 Biologische Untersuchungen

Zur Bestimmung der Bioaktivität der dargestellten Hydrolysate aus den Alcalase-, Papain- und Pepsinverdauen sowie der aufgereinigten Hydrolysatfraktionen wurde die Anwendbarkeit verschiedener in vitro-Testsysteme untersucht. Hierzu zählen HPLC-basierte und spektrophotometrische Assays, die Aussagen über antioxidative, ACE-inhibierende und antimicrobielle Wirkungen erlauben.

4.6.1 Bestimmung der antioxidativen Kapazität

Zur Messung der antioxidativen Kapazität sind in der Literatur zahlreiche Methoden beschrieben. Sie basieren auf dem Prinzip, dass in einem oxidativen Milieu ein zugesetztes Antioxidans eine Oxidationsreaktion verzögert bzw. umkehrt. Der zeitliche Verlauf der Oxidationsreaktion mit dem Antioxidans wird gemessen und mit dem einer Referenz verglichen. Am weitesten verbreitet sind der TEAC-Assay (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) und der ORAC-Assay (Oxygen-Radical Absorbing Capacity). [55-62]

4.6.1.1 TEAC-Assay

Mit Hilfe des TEAC-Assay wird die antioxidative Kapazität einer Probe bestimmt und mit der des Vitamin E-Derivats Trolox verglichen. Der so ermittelte TEAC-Wert wird in mmol Troloxäquivalente pro Gramm (mmol Eq./g) Probe angegeben. Nach der von Fogiano et al. beschriebenen Variante wird anstelle von 2,2'-Azinobis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonsäure) der chemische Hilfsstoff N,N-Dimethyl-p-Phenylendiamin (DMPD) eingesetzt, der mit Eisen-(III)-chlorid in die violettfarbene Radikalspezies überführt wird. Die antioxidative Kapazität einer Probe wird danach über die Entfärbung photometrisch bei 505 nm detektiert. Der Vorteil in der Verwendung von DMPD liegt in der guten Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zwischen mehreren Tests [120].

Für die Proteinfraktionen Patatin und PI wurden auf diese Weise TEAC-Werte von $0,373 \pm 0,094$ mmol Eq./g Patatin bzw. $0,035 \pm 0,028$ mmol Eq./g PI bestimmt. Der TEAC-Wert eines Gramms Patatin liegt in ähnlicher Größenordnung wie die verschiedener Extrakte aus 100 g Früchten (Frischgewicht). Beispielsweise wurden für

Blaubeeren eine TEAC von 0,74 mmol Eq./100 g gemessen, für Äpfel 0,16 mmol Eq./100 g bzw. für Brombeeren 2,02 mmol Eq./100 g [121]. Die Hydrolyseprodukte von Patatin konnten nicht reproduzierbar analysiert werden. Eine mögliche Ursache hierfür könnte sein, dass terminale aromatische Aminosäuren in den gewonnenen Peptiden mit DMPD interagieren und die photometrische Messung stören. Daher wurde alternativ die antioxidative Kapazität über den ORAC-Assay bestimmt.

4.6.1.2 ORAC-Assay

Mittels des ORAC-Assays wird die oxidative Degradation einer fluoreszierenden Spezies durch Peroxylradikale fluoreszenz-spektroskopisch untersucht. Peroxylradikale werden beim thermischen Abbau von 2,2'-Azobis-(2-Methylpropionamidin) (AAPH) freigesetzt und schädigen nach Ou et al. das Phthalein Fluoreszein. [122] Antioxidative Substanzen schützen die Fluoreszeinmoleküle vor dem oxidativen Angriff und beeinflussen somit die Kinetik der Fluoreszenzabnahme. Der ORAC-Assay hat den Vorteil, dass sowohl die Inhibitionshöhe einer Substanz als auch die Inhibitions- und Verzögerungszeit in die antioxidative Kapazität mit einfließen. Dies ist insbesondere bei der Messung von Lebensmitteln und Nahrungsmittelzusatzstoffen günstig, die komplexe Inhaltsstoffe mit unterschiedlichen antioxidativen Wirkweisen besitzen.

Die gewählte Methode nach Dávalos et al. ist für die manuelle Anwendung optimiert. Das Fluoreszein wird 15 min bei 37 °C mit den Proben inkubiert und danach AAPH als Oxidationsmittel hinzugeben. Die Kinetik der Reaktion wird 80 min über die Fluoreszenzabnahme aufgenommen. Aus der normalisierten Fläche unter der Kurve berechnet sich die antioxidative Kapazität. Die Ergebnisse werden mit denen des Standards Trolox in Relation gesetzt und in mmol Troloxäquivalente pro Gramm (mmol Eq./g) Probe ausgedrückt [123].

Abbildung 29 zeigt die typischen Verläufe der Kinetik der durch AAPH induzierten Fluoreszein-Oxidation mit und ohne Zusatz eines Antioxidans. In Abwesenheit von Antioxidantien beginnt der Abbau sofort, während bei Zugabe von Trolox eine deutliche Verzögerung festzustellen ist. Demgegenüber zeigt sich beim Zusatz des Patatinhydrolysats (Pepsinverdau) eine geringere, aber signifikante antioxidative Wirkung.

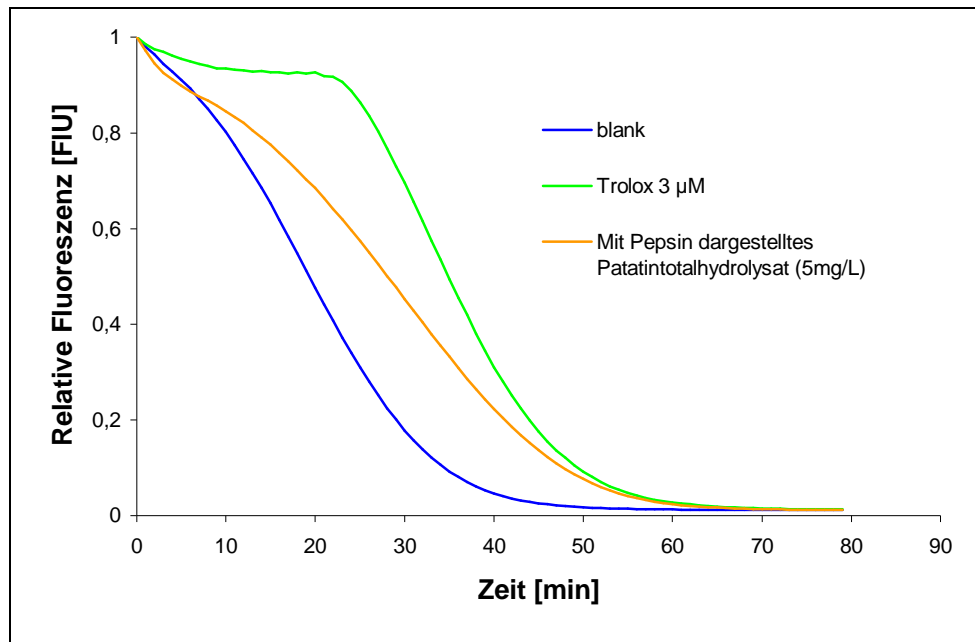


Abbildung 29: Kinetik der durch AAPH induzierten Fluorescein-Oxidation in Abwesenheit (blank) und Anwesenheit (Trolox 3µM, Patatinhydrolysat) von Antioxidantien

In Tabelle 22 sind die Ergebnisse der ORAC-Bestimmung einiger Proteine und Hydrolysate zusammengestellt. Es zeigt sich, dass die antioxidative Kapazität des Patatins durch die Hydrolyse mit Alcalase, Pepsin bzw. Papain mindestens um den Faktor 10 gesteigert werden kann. Ein mit Trypsin dargestelltes Hydrolysat zeigte dagegen keine solche Steigerung. Eine Erhöhung der antioxidativen Kapazität beim Hydrolysat des Chymotrypsinverdaus konnte auf den Pufferzusatz Triethanolamin zurückgeführt werden, so dass diesbezüglich keine eindeutige Aussage getroffen werden kann.

Tabelle 22: Antioxidative Kapazität (ORAC-Assay) ausgewählter Proteine, Peptide und Hydrolysate

Protein	Troloxäquivalente [mmol Trolox/ g Peptide]
Bovines Serumalbumin	0,1189
Glycyl-glycyl-phenylalanin	0,0288
Proteaseinhibitorfraktion	0,1481
Patatin	0,0236
Patatinhydrolysat (Alcalase)	0,4099
Patatinhydrolysat (Papain)	0,3623
Patatinhydrolysat (Pepsin)	0,2847

Um herauszufinden, welche Komponenten verstärkt zur antioxidativen Kapazität beitragen, wurden die Patatinhydrolysate der Pepsin-, Alcalase- und Papainverdau über SEC-FPLC fraktioniert und die ORAC-Werte bestimmt (s. Abbildung 30). Die Hydrolyseprodukte wiesen in den Fraktionen F9-F11 erhöhte ORAC-Werte von 0,89-2,14 mmol Eq./g auf. Insbesondere bei Fraktion F9 des Pepsinverdaus mit 2,14 mmol Eq./g, F10 des Papainverdaus mit 1,22 mmol Eq./g und F11 des Alcalaseverdaus mit 1,93 mmol Eq./g liegen die antioxidativen Kapazitäten im Vergleich zu den Gesamthydrolysaten um das 4-10-fache höher. Aus der Kalibration der SEC-FPLC mit Standardpeptiden ist bekannt, dass die Größe der Peptide in diesen Fraktionen bis ca. 1,5 kDa reicht. Auf die Zusammensetzung und die Charakterisierung der Peptide wird detailliert in Kapitel 4.7 eingegangen.

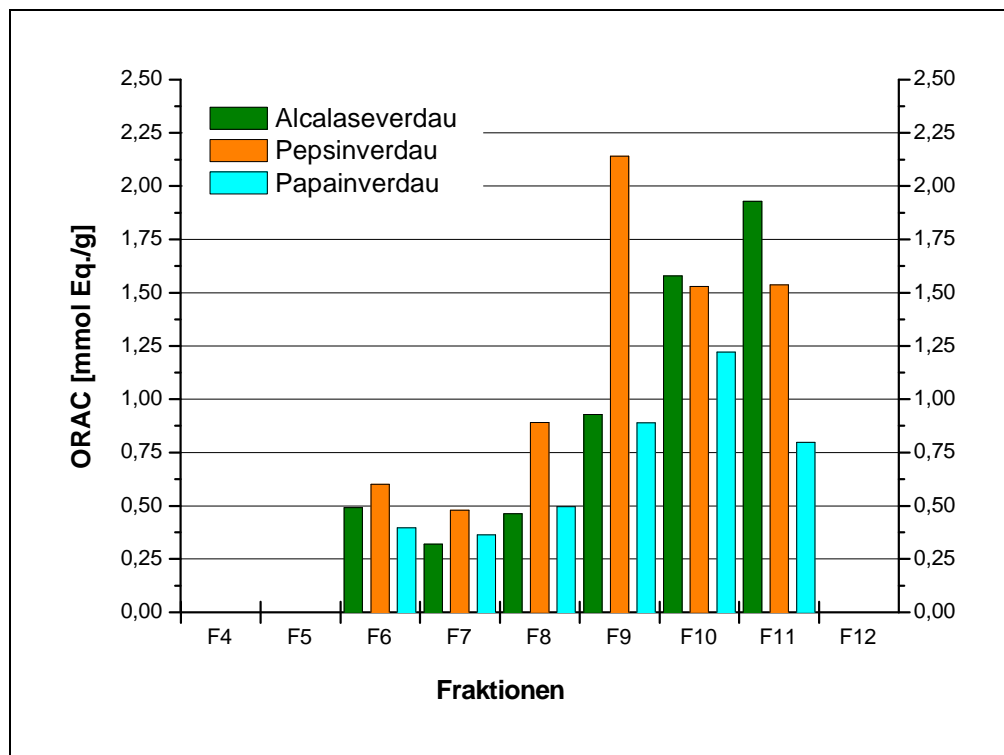


Abbildung 30: ORAC-Werte der fraktionierten Patatinhydrolysate

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass durch enzymatische Hydrolyse des Patatins die antioxidative Kapazität deutlich erhöht wurde. Diese konzentriert sich hauptsächlich auf Fraktionen mit kleineren Peptiden (kleiner ca. 1,5 kDa). Die Werte liegen in gleicher Größenordnung wie die kommerziell erhältlicher Nahrungsergänzungsmittel (0,0079-2,27 mmol Eq./g) [123]. Es konnten also erste Hinweise aufgezeigt werden, dass eine Vermarktung der Hydrolyseprodukte des Patatins im Bereich Functional Food mit dem Anspruch der antioxidativen Aktivität

möglich erscheint. Beachtet werden muss jedoch, dass die in vitro ermittelten ORAC-Werte nicht zwangsläufig auf eine gesundheitsfördernde Wirkung in vivo schließen lassen. Darüber hinaus bildet der Wert lediglich die antioxidative Aktivität gegen bestimmte Radikale (hauptsächlich Peroxyl) ab.

4.6.2 In vitro-Testung der inhibierenden Wirkung auf das Angiotensin-Converting-Enzyme

Zur Bestimmung der inhibitorischen Wirkung der dargestellten Hydrolysate bzw. Hydrolysatfraktionen auf das Angiotensin-Converting-Enzyme (ACE) wurde eine HPLC-basierte Methode angewandt, die bereits zur Untersuchung von Milch- und Kartoffelproteinen eingesetzt wurde [47,53,54]. Das Messprinzip beruht auf der Spaltung des Substrats Hippuryl-L-Histidyl-L-Leucin (HHL) in Hippursäure (HA) und L-Histidyl-L-Leucin (HL). Enzymatisch katalysiert wird diese Reaktion durch ACE (s. Abbildung 31). Die inhibitorische Wirkung einer Substanz auf ACE wird über die verlangsamte Produktbildungsrate ermittelt. Dazu wird eine definierte Menge dieser Substanz mit HHL und ACE exakt 30 min inkubiert. Der Reaktionsabbruch erfolgt durch einen pH-Shift in den sauren Bereich, der das ACE inaktiviert. Da sich die Produkte nicht hinreichend vom Substrat über optische Eigenschaften unterscheiden lassen, schließt sich eine quantifizierende HPLC-Auftrennung an einer C₈ Säule (Supelco, Sigma-Aldrich GmbH, Buchs/Schweiz) an.

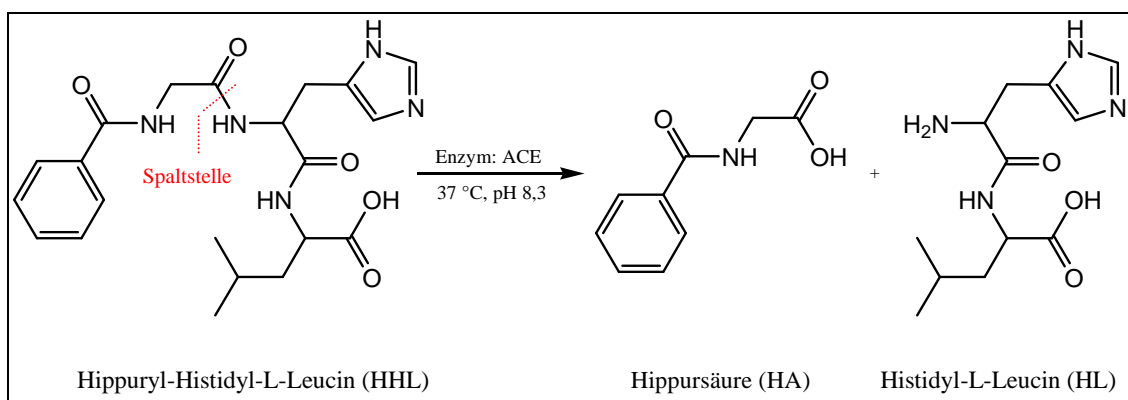


Abbildung 31 Umsetzung des HHL mit ACE zu Hippursäure und His-Leu

Die Detektion erfolgte mit einem UV-Spektrometer am Absorptionsmaximum der Hippursäure bei einer Wellenlänge von 228 nm. Zur Elution wurde ein Komponenten-Gradientensystem aus wässrigem (deion. H₂O mit 0,1% TFA) und organischem (ACN

mit 0,1% TFA) Eluenten genutzt (s. Anhang 6.5.8, S. 113). Abbildung 31 zeigt typische Chromatogramme des HHL bzw. der Reaktionsprodukte nach Umsetzung mit ACE.

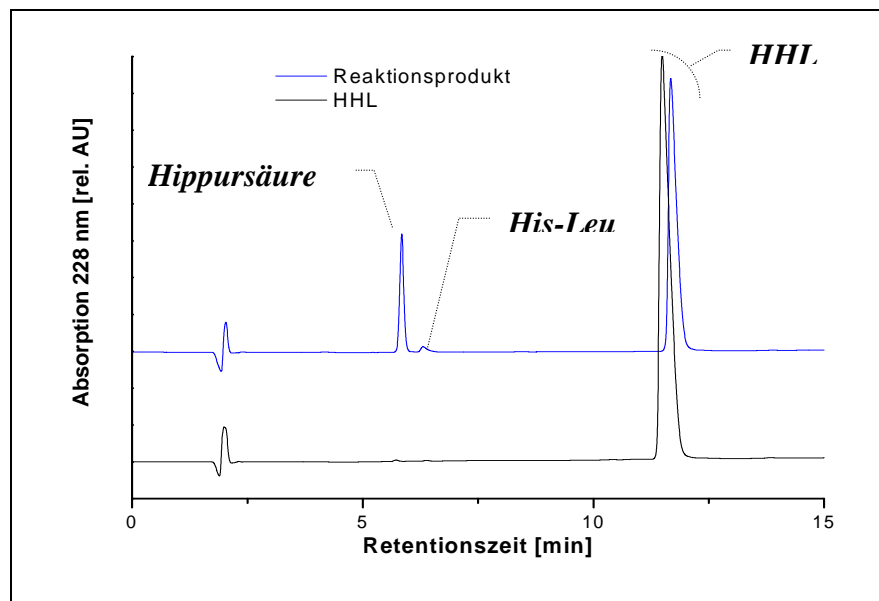


Abbildung 32: HPLC-UV-Chromatogramme des HHL sowie der Reaktionsprodukte nach Reaktion mit ACE; Gradientenflussrate: 0,4 mL/min; Temperatur: 40 °C

Die entstehende Hippursäure wird über die Peakintegrale quantifiziert. Bis zu einer ACE-Konzentration von 13 mU/mL besteht im betrachteten Reaktionsintervall ein linearer Zusammenhang zur Produktbildungsrate. Die inhibitorische Wirkung lässt sich somit prozentual ausdrücken, wobei 100 % ACE-Inhibition einer vollständigen Hemmung des Enzyms entspricht.

4.6.2.1 ACE-Inhibition der Proteine und Gesamthydrolysate

Zunächst wurden das Kartoffelprotein, die Kartoffelproteinfraktionen Patatin und PI sowie die enzymatischen Patatinhydrolysate untersucht. Abbildung 33 stellt die in Dreifachbestimmung ermittelten und berechneten ACE-Inhibitionswerte bei einer Konzentration von 0,07 mg/ml (1 g/l in der eingesetzten Probe) dar.

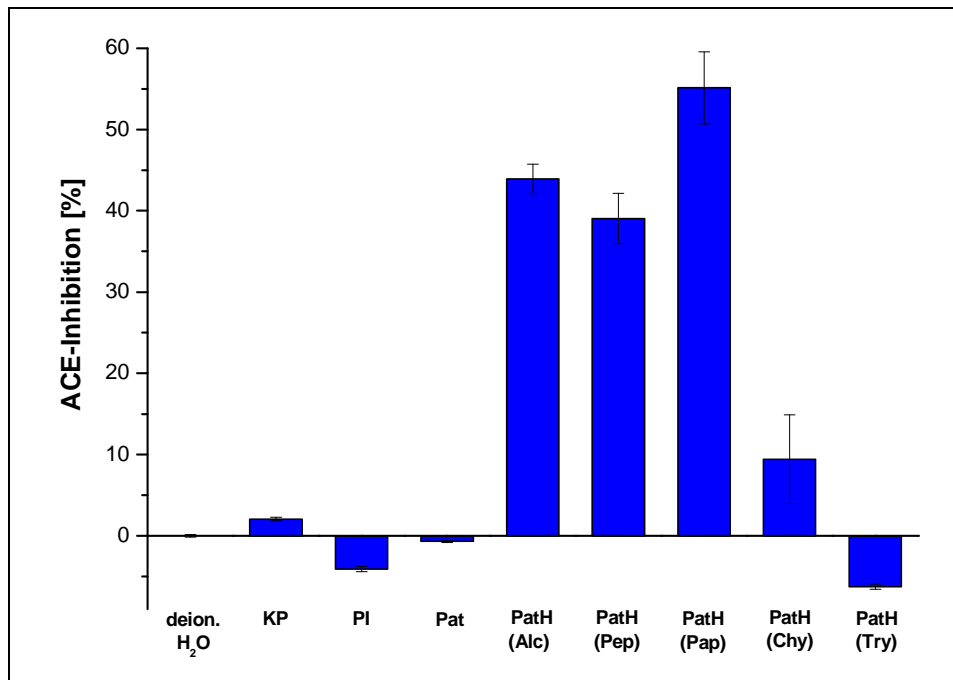


Abbildung 33: Prozentuale ACE-Inhibitionswerte des Kartoffelproteins (KP, Emsland-Stärke GmbH), der KFW-Fractionen Proteaseinhibitoren und (PI) Patatin (Pat) sowie der enzymatischen Patatinhydrolysate (PatH, Alc = Alcalase, Pep = Pepsin, Pap = Papain, Try= Trypsin, Chy = Chymotrypsin)

Negative Werte bei der ACE-Inhibition einer Probe deuten auf einen fördernden Einfluss auf die Aktivität des ACE hin. Eine weitere Ursache kann in der puffernden Wirkung der Probe liegen, der den Reaktionsabbruch durch pH-Shift verzögert. Aus dem Inhibitionswert kann über die jeweilige Proteinkonzentration (ermittelt über Lowry-Porteinassay) der IC_{50} - (Inhibitor Concentration)-Wert berechnet werden. Dieser Wert ist definiert als die Konzentration (mg/L), die benötigt wird, den Stoffumsatz der enzymatischen Reaktion um die Hälfte zu reduzieren. Je geringer dieser Wert, desto höher ist die inhibitorische Wirkung einer Substanz.

Tabelle 23 zeigt die Ergebnisse für Kartoffelprotein/-fraktionen und die Patatin-Hydrolysate. Während das Patatin und die Proteaseinhibitorfraktion keine hemmende Wirkung zeigten, wies das Kartoffelprotein einen, wenn auch geringen, inhibitorischen Effekt auf. Dies ist vermutlich auf minore Kartoffelproteine und Proteinfragmente zurückzuführen. Begünstigt durch die drastischen Separationsbedingungen, die während der sauren Koagulation im industriellen Gewinnungsprozess herrschen, werden Kartoffelproteine bis zu einem gewissen Grad gespalten.

Tabelle 23: IC₅₀-Werte der Kartoffelproteine/-proteinfraktionen und der Patatin-Hydrolysate

Probe	IC ₅₀ [mg/L]
Denat. Kartoffelprotein (KP)	1.238
Proteaseinhibitor-Fraktion	aktivitätsfördernd
Patatin-Fraktion	keine Aktivität
Patatinhydrolysat (Alcalase)	63
Patatinhydrolysat (Pepsin)	68
Patatinhydrolysat (Papain)	46
Patatinhydrolysat (Chymotrypsin)	269
Patatinhydrolysat (Trypsin)	aktivitätsfördernd

Die Patatinhydrolysate mit Trypsin und Chymotrypsin zeigen keinen signifikanten Einfluss auf die ACE-Inhibition. Im Falle des Chymotrypsinverdaus konnte der schwach inhibierende Effekt auf Pufferzusätze zurückgeführt werden. Die IC₅₀ der Alcalase-, Papain- und Pepsinverdaue liegen mit 46-68 mg/L in gleicher Größenordnung wie die in der Literatur angegebenen Werte (12-86 mg/L) für Hydrolyseprodukte aus Kartoffelprotein, Molkeprotein, Sojaprotein, Erbsenprotein oder Reisprotein [53,124,125,126]. Es kann somit konstatiert werden, dass durch die Patatinhydrolyse mit Pepsin, Alcalase und Papain eine ACE-inhibitorische Wirkung freigesetzt wurde, die weder die Fraktionen Patatin und PI allein, noch das denaturierte KP besitzen. Die ermittelten IC₅₀-Werte sind verglichen mit dem kommerziell erhältlichen, sehr potenten ACE-Hemmer Captopril (IC₅₀ = 0,004 mg/L) um den Faktor 2.000-10.000 höher. In der Literatur ist allerdings belegt, dass diese Werte in vivo relativiert werden. Miguel et al. zeigten, dass hydrolysiertes bovines Casein (HBC; < 3.000 kDa) einen IC₅₀ Wert von 5 mg/L (vergleichbar mit den hier ermittelten IC₅₀-Werten) in vitro aufwies. In vivo war jedoch eine viermal so hohe Konzentration HBC wie Captopril notwendig, um eine gleiche Absenkung des Diastolischen Blutdrucks zu erreichen [127].

4.6.2.2 ACE-Inhibition fraktionierter Hydrolysate

Um den Einfluss bestimmter Fraktionen auf die ACE-inhibierende Wirkung genauer zu beleuchten, wurden die Hydrolysate der Pepsin-, Alcalase- und Papainverdaue durch SEC-FPLC fraktioniert und mittels des ACE-Assays analysiert (s. Abbildung 34). Jeweils höchste ACE-Inhibitionswerte zeigten die Fraktionen F9b des Alcalaseverdaus

($52,8 \pm 2,7 \%$), F9a des Papainverdaus ($84,9 \pm 0,6 \%$) und F8c des Pepsinverdaus ($53,7 \pm 0,8 \%$). Insgesamt ließ sich die Wirkung jedoch nicht nur auf diese Fraktionen zurückführen. Gerade in Relation zu den geringen Peptidkonzentrationen konnte in den Fraktionen 10 bis 12 eine beachtliche ACE-inhibitorische Wirkung nachgewiesen werden.

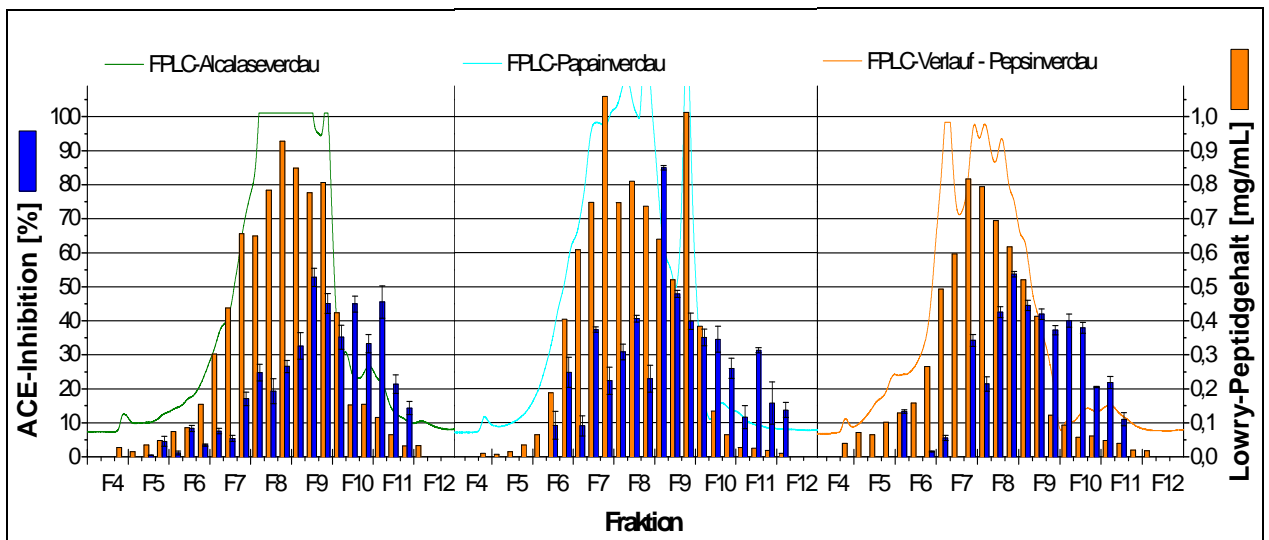


Abbildung 34: ACE-inhibitorische Wirkung und Peptidgehalte (bestimmt mittels Lowry-Assay) der durch SEC-FPLC fraktionierten Verdaue

4.6.3 Antimikrobielle Tests I: Agardiffusions-Assay

Eine mögliche antimikrobielle Wirksamkeit bestimmter Fraktionen der Patatinhydrolysate wurde zunächst mittels des Agardiffusionstests untersucht. Bei diesem Verfahren werden Bakterien, die zuvor in Schüttelkolben bis zur logarithmischen Wachstumsphase kultiviert wurden, auf Mueller-Hinton-Agar-Platten als Nährmedium ausgestrichen. Darauf werden Filterdisks mit applizierten Testlösungen gelegt. Nach 18 h Inkubation der Platten lässt sich das mikrobielle Wachstum als Trübung des Agars wahrnehmen. Entstandene Hemmhöfe um die Filterdisk erlauben somit den qualitativen und quantitativen Nachweis wachstumshemmender Substanzen.

Die Wahl des Mikroorganismus fiel auf den gram-negativen *E. coli*-K12-Stamm, der keine bekannten Resistenzen gegen Antibiotika aufweist. Die Ergebnisse der Tests sind am Beispiel des fraktionierten Patatinhydrolysats aus dem Pepsinverdaue stellvertretend für alle fraktionierten Hydrolysate dargestellt.



Abbildung 35: Hemmhöfe des Patatinhydrolysats aus dem Pepsinverdau (P120), der entsprechenden Fraktionen nach SEC-FPLC (F4-11) sowie ausgewählter Antibiotika und deion. H₂O als Referenz

Deutliche Hemmhöfe sind bei den Filterdisks mit Ampicillin und Tetracyclin auszumachen. Kleine Hemmhöfe bei Penicillin G zeugen von geringem antimikrobiellen Potential. Dies lässt entweder auf eine entstandene Penicillin-Resistenz des K12-Stammes oder auf inaktives Penicillin G schließen. In ähnlicher Größenordnung zeigten einige Fraktionen (z. B. F9) Anzeichen für kleine Hemmhöhe. Diese sind jedoch nicht hinreichend signifikant und lassen sich daher nicht als eindeutigen Hinweis auf eine antibakterielle Wirkung deuten. Daher wurde alternativ der im Folgenden beschriebene Mikroverdünnungsassay eingesetzt, der empfindlicher und vielseitiger anwendbar ist.

4.6.4 Antimikrobielle Tests II: Broth-Mikroverdünnungsassay

Die Fraktionen F4-F12 der Alcalase-, Papain- und Pepsinverdaue wurden mittels des Broth-Mikroverdünnungsassays auf eine mögliche antimikrobielle Wirkung untersucht. Als Testorganismen wurden die gram-positiven Bakterien *E. coli* K12 und die und gram-negativen Bakterien *Bacillus subtilis* sowie die Hefe *Kluyveromyces marxianus* eingesetzt. Die Mikroorganismen wurden im entsprechenden Medium bis zur exponentiellen Wachstumsphase kultiviert. Der Verlauf der Vorkultivierung wurde über die Messung der optischen Dichte bei 600 nm (OD) sowie über die Bestimmung der Zellzahl überwacht. Anschließend wurden 75 µL der jeweiligen Zellsuspension auf Mikrotiterplatten okuliert und mit je 75 µL der zu testenden Fraktionen versetzt, so dass eine finale Zellzahl von 10^6 Zellen/mL vorlagen. Die Proben wurden in Dreifachbestimmung bei 37 °C, bzw. 30°C im Falle der Hefe, 12-24 h erneut bis zur exponentiellen Wachstumsphase der Mikroorganismen kultiviert. Die antimikrobielle Wirkung wurde durch Messung der OD überprüft. Die Beeinträchtigung des Wachstums durch die Peptidfraktionen wurde mit einer Negativ-Kontrolle (OD_{NK}) ohne Zusätze und einer Positiv-Kontrolle (OD_{PK}) mit dem Antibiotikum Tetrazyklin (128 mg/L) korreliert. Das prozentuale antimikrobielle Potential (P_a) einer Probe wurde nach folgender Formel berechnet:

$$(3) \quad P_a [\%] = \frac{(OD_{Probe} - OD_{PK})}{(OD_{NK} - OD_{PK})} = -P_w$$

Ein Wert von 100 % kennzeichnet eine maximale Inhibition des Zellwachstums. Negative P_a -Werte indes beschreiben ein wachstumsförderndes Potential P_w . Für *Kluyveromyces marxianus* stand kein geeignetes Antibiotikum zur Verfügung, so dass der Vergleich mit einer Positiv-Kontrolle nicht in der Berechnung berücksichtigt werden konnte:

$$(4) \quad P_a [\%] = \frac{OD_{Probe}}{OD_{NK}} = -P_w$$

Dieser resultierende Fehler ist jedoch gering und somit für die Bewertung der experimentellen Ergebnisse vernachlässigbar

4.6.4.1 Wirkung auf *E. coli* K12

Zunächst wurde ein Screening aller Fraktionen mit spezifischer Konzentration (separat mittels Lowry-Assay bestimmt) durchgeführt. Abbildung 36 gibt einen Überblick über die antimikrobiellen Potentiale der verschiedenen Hydrolysatfraktionen.

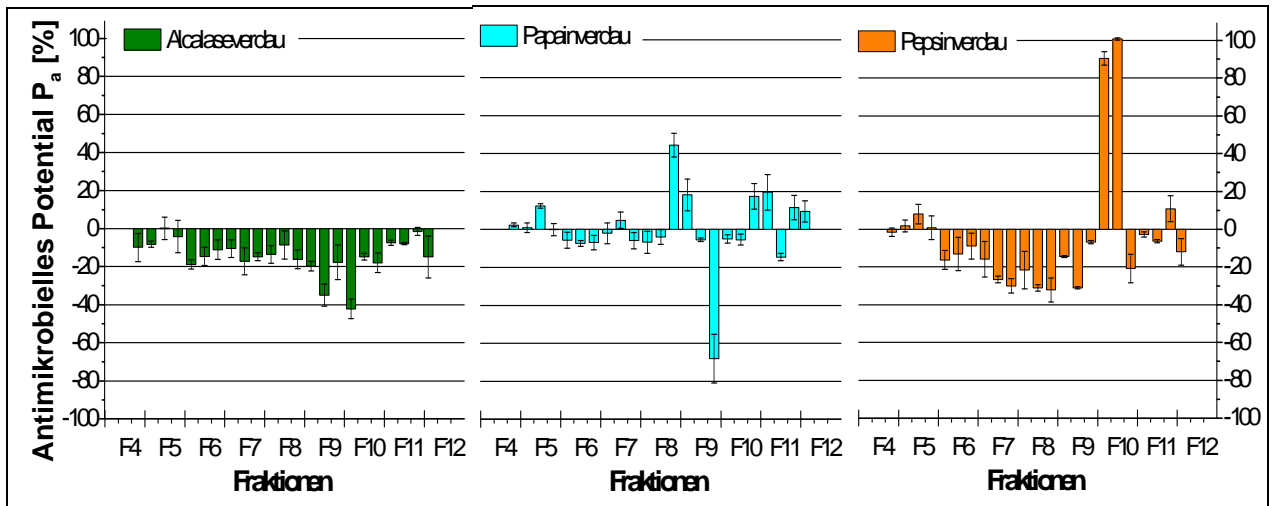


Abbildung 36: Wirkung der Hydrolysefraktionen auf die Kultivierung von *E. coli* K12

Für die Fraktionen des Alcalaseverdaus wurde eine fördernde Wirkung auf das Wachstum von *E. coli* K12 nachgewiesen. Gemittelt über alle Fraktionen betrug $P_w = 14,2 \pm 9,5$ %.

In der Regel zeigten auch die Fraktionen des Papain- und Pepsinverdaus einen positiven Wachstumseffekt. Eine wachstumshemmende Wirkung hingegen konnte bei Fraktion F8c des Papainverdaus ($P_{a(\text{PapF8c})} = 50,5 \pm 6,3$ %) sowie bei F10a und F10b des Pepsinverdaus ($P_{a(\text{PepF10a})} = 90,4 \pm 3,6$ % bzw. $P_{a(\text{PepF10b})} = 100,7 \pm 0,6$ %) dokumentiert werden. Die Fraktionen wurden in verschiedenen Verdünnungsstufen getestet und über graphische Regression der so genannte MIC₅₀-Wert bestimmt (s. Abbildung 11). Dieser kennzeichnet die Konzentration, bei der das mikrobielle Wachstum um 50 % inhibiert wird.

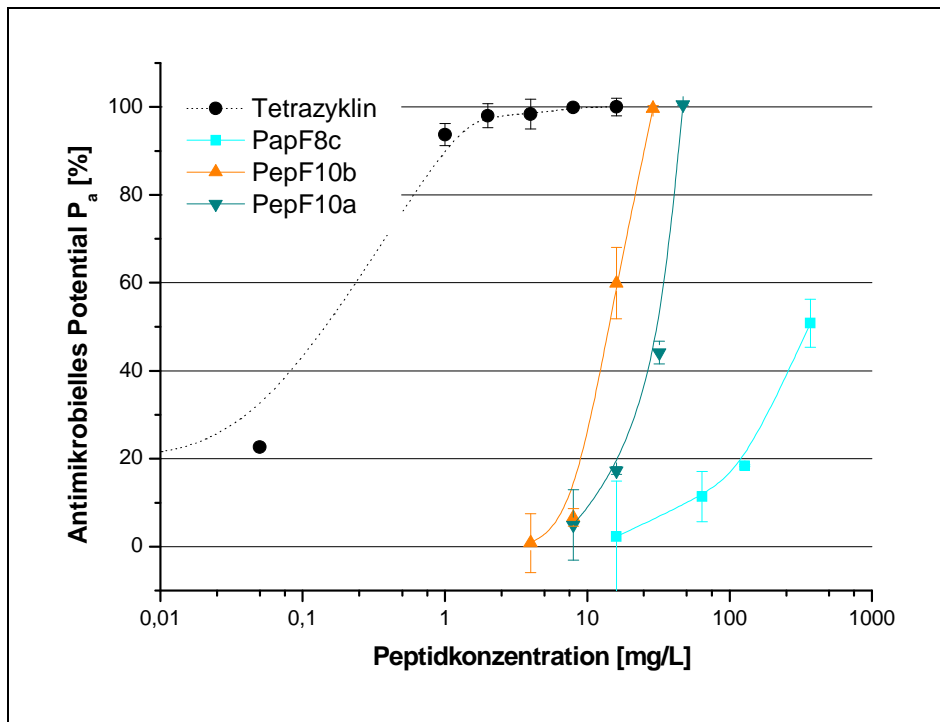


Abbildung 37: Antimikrobielles Potential auf *E. coli* K12

Die ermittelten Werte lagen bei $MIC_{50} = 360$ mg/L (F8c, Papainverdaus), $MIC_{50} = 34$ mg/L (F10a, Pepsinverdaus) bzw. $MIC_{50} = 14$ mg (F10b, Pepsinverdaus) und damit in gleicher Größenordnung wie des antimikrobiellen Peptids Lactoferricin B mit $MIC_{50} = 15,6-31,25$ mg/L [128].

4.6.4.2 Wirkung auf *Bacillus subtilis* und *Kluyveromyces marxianus*

Bei der OD-Bestimmung von *Bacillus subtilis* wurden erhebliche Schwankungen innerhalb der Dreifachbestimmung beobachtet, die sich in Standardabweichungen von bis zu 55 % ausdrücken. Die starke Streuung lässt sich anhand der stäbchenförmigen Morphologie von *Bacillus subtilis* erklären. Durch die spezifische Zellform bilden sich schon bei niedrigen Zelldichten Aggregate, die die homogene Verteilung der Zellen in der Suspension stören und somit reproduzierbare OD-Messungen erschweren. Verschiedene Versuche mit geringeren Animpfzellichten, zusätzlichen Verdünnungsschritten oder höheren Schüttlergeschwindigkeiten während der Kultivierung schufen keine Abhilfe. Daher konnten keine zuverlässigen Aussagen zur Wirkung der Hydrolysat-Fractionen auf den Bakterienstamm *Bacillus subtilis* getroffen werden.

Die Ergebnisse zur mikrobiellen Wirkung der Hydrolysatfraktionen auf *Kluyveromyces marxianus* sind in Abbildung 38 dargestellt. Die ermittelten Werte lagen durchschnittlich bei $P_a = 0,7\%$. Bei einer Standardabweichung von im Mittel 2,1% kann zuverlässig davon ausgegangen werden, dass die Hydrolysatfraktionen das Zellwachstum der kultivierten Hefe nicht beeinflussen.

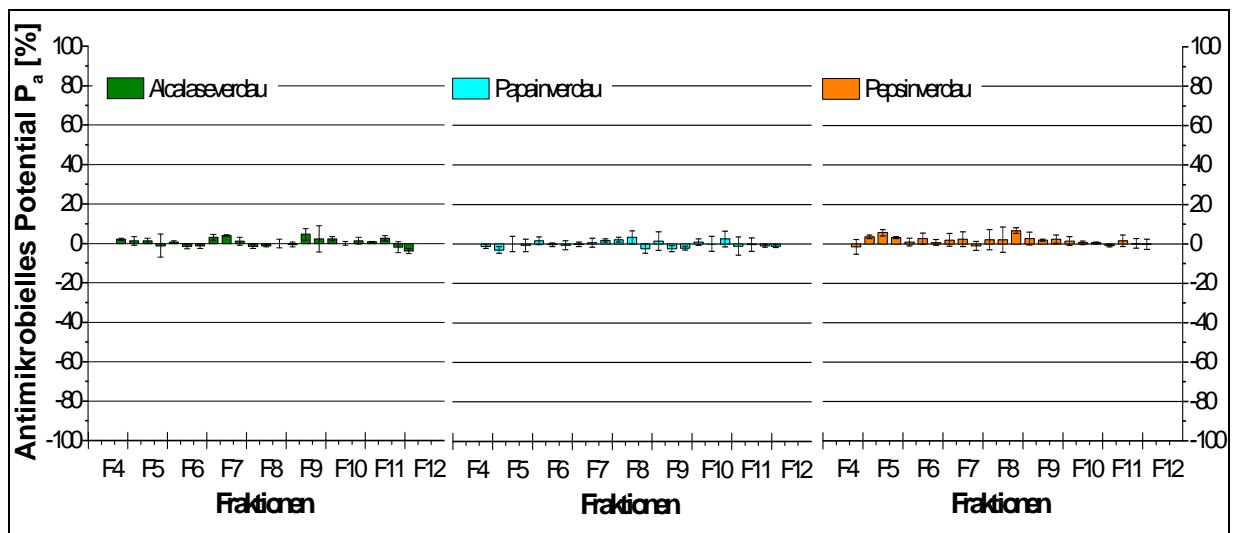


Abbildung 38 Wirkung der Hydrolysatfraktionen auf die Kultivierung von *Kluyveromyces marxianus*

4.6.5 Zusammenfassung

Durch enzymatische Patatinhydrolyse mit Alcalase, Papain bzw. Pepsin konnten Produkte gewonnen werden, die im Vergleich zum Präkursor-Protein signifikante antioxidative und ACE-inhibitorische Eigenschaften zeigen. Die ermittelten IC_{50} -Werte lagen mit 46-68 mg/L in gleicher Größenordnung wie die in der Literatur angegebenen Werte (12-86 mg/L) für Hydrolyseprodukte aus Kartoffelprotein, Molkeprotein, Sojaprotein, Erbsenprotein oder Reisprotein. Die Wirkung konzentrierte sich jedoch nicht auf eine einzelne Hydrolysatfraktion, sondern wurde bei den F8-11 nachgewiesen. Dies entspricht Peptiden mit einer Größe bis 1,5 kDa. Vergleicht man die Ergebnisse der beiden Assays untereinander, so fällt auf, dass gleiche Fraktionen für eine antioxidative bzw. ACE-inhibierende Wirkung verantwortlich sind. Dies legt die Vermutung nahe, dass die fraktionierten Peptide multifunktional agieren. Ein solcher Zusammenhang zwischen antioxidativen und ACE-inhibitorischen Effekten konnte u. a. für einige intrazelluläre Peptide (Carnosin, Anserin, Glutathion) bestätigt werden [129]. Auch das Oktapeptid Captopril, das als Medikament bei der Behandlung von Bluthochdruck angewandt wird, besitzt antioxidative Eigenschaften [130].

Die Hydrolysatfraktionen zeigten keinen antimikrobiellen Einfluss auf die Hefe *Kluyveromyces marxianus*. Eine Wirkung auf *Bacillus subtilis* konnte aufgrund messbedingter Fehler, aus denen hohe Standardabweichungen resultierten, nicht abschließend bewertet werden. Eine signifikante antimikrobielle Wirkung auf *E. coli* K12 wiesen die Fraktionen F8c des Papainverdaus ($MIC_{50} = 34 \text{ mg/L}$) sowie die Fraktionen F10a und F10b des Pepsinverdaus ($MIC_{50} = 14 \text{ mg/L}$ bzw. $MIC_{50} = 360 \text{ mg/L}$) auf. Für die Hydrolysatfraktionen des Alcalaseverdaus konnte hingegen eine wachstumsfördernde Eigenschaft gezeigt werden.

4.7 Massenspektrometrische Identifizierung der Abbauprodukte

Dieses Kapitel befasst sich mit massenspektrometrischen Untersuchungen zur Charakterisierung der Hydrolyseprodukte. Zunächst wurde der Pepsinverdau mit MALDI-MS (Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation Massenspektrometrie) untersucht, um die Substrat-Aminosäuresequenz zu ermitteln und indirekt nach Abgleich mit dem *in silico* Verdau mögliche Peptidsequenzen zu bestimmen. Anschließend wurden weitere Analysen mittels HPLC-Tandemmassenspektrometrie durchgeführt und Aminosäuresequenzen der Peptide aus den fraktionierten Pepsin-, Papain- und Alcalaseverdaue direkt identifiziert.

4.7.1 MALDI-MS-Analyse des peptischen Patatinhydrolysats

Die unfraktionierten, nicht aufgereinigten Reaktionsprodukte des Pepsinverdaus wurden mit Hilfe eines MALDI-TOF-Massenspektrometers untersucht. Das MALDI-Verfahren bietet sich hier zur schnellen Massenbestimmung der Peptide an, da im Vergleich zum ESI-Verfahren die Toleranz gegenüber Puffersubstanzen und Salzen wesentlich größer ist. Die Peptide wurden zunächst mit einer UV-absorbierenden Matrix auf einem Probenträger ko-kristallisiert, bevor der Ionisierungsprozess durch Laserbeschuss eingeleitet wurde. Die Wahl der Matrix hat einen wesentlichen Einfluss auf die Signalintensitäten. In Vortests wurden die in organisch-wässrigen Solvenzien gelösten Matrizes Sinapinsäure und α -Cyano-4-Hydroxymizinsäure auf ihre Eignung getestet. Optimale Ergebnisse konnten mit α -Cyano-4-Hydroxymizinsäure in 1:1-Ethanol/ACN erzielt werden. Zur exakten Massenbestimmung wurde das Gerät mit einem Peptidstandard aus Angiotensin I, Reninsubstrat und Adrenokortikotrop-Hormon Fragment 18-39 (ACTH) kalibriert. Bei der internen Kalibration werden nacheinander Standard und Probe auf demselben Spot des Probenträgers präpariert. Dies kann jedoch die Signalintensitäten wegen unterschiedlicher Ionisationsfähigkeiten von Standard und Probe stark unterscheiden. Daher wurde eine quasi-interne Kalibrierung durchgeführt, bei der Standard und Probe auf zwei unterschiedlichen Spots präpariert wurden. Dies hat den Vorteil, dass die Ionisation von Standard und Probe durch Variation der Laserintensität individuell optimiert werden konnte. Die mögliche Abweichung

zwischen verschiedenen Spots ist gering und zu vernachlässigen. Die Messung der Proben erfolgte im maximalen Messbereich von 500-7000 Da.

Das Spektrum des Peptidstandards (Abbildung 39 b) zeigt die einfach geladenen Ionen $[MH]^+$ des Peptidstandards. Zudem ist ein zweifach geladenes protoniertes $[MH]^{+2}$ -Ion des Reninsubstrats mit der Masse $m/z = 880,01$ u nachweisbar; die Intensität ist jedoch gering. Ansonsten treten keine mehrfach geladenen Peptidionen auf, so dass davon ausgegangen werden kann, dass die gemessenen Peptide des Pepsinverdaus einfach geladen vorliegen.

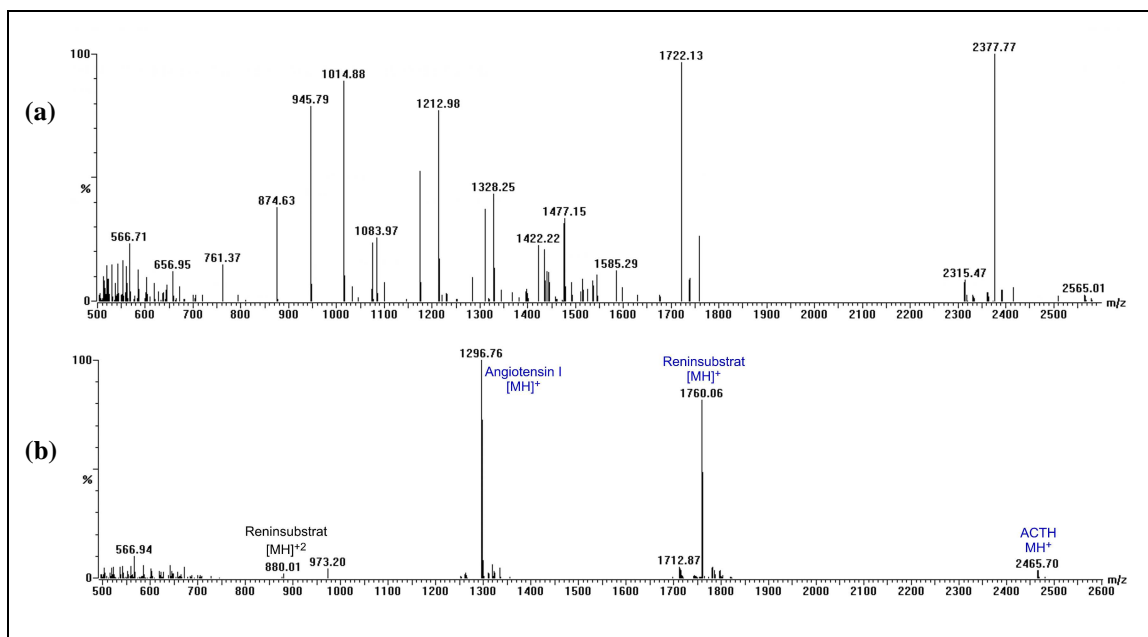


Abbildung 39: MALDI-TOF-MS-Spektrum (a) des Pepsinverdaus von Patatin, (b) des Peptidstandards

In dem Hydrolyseprodukt aus dem Pepsinverdaus (Abbildung 39 a) konnte mit der höchsten Intensität ein Peptid mit 2.377,77 Da nachgewiesen werden. Zudem lassen sich zahlreiche kleinere Peptide zwischen 559,75 Da und 1.759,13 Da identifizieren.

Informationen über die Aminosäuresequenz der Peptide lassen sich nicht direkt aus den erhaltenen MALDI-MS-Spektren ableiten. Um die Aminosäuresequenz unbekannter Peptide herauszufinden, ist es in der Regel notwendig, Peptide aus Gemischen zu trennen und anschließend z. B. durch De novo Sequenzierung, Edman-Abbau oder Tandemmassenspektrometrie separat zu sequenzieren. Ist jedoch die Substrat-Aminosäuresequenz bekannt und wurde die Hydrolyse mit einer spezifisch spaltenden Protease durchgeführt, können nachgewiesene Spaltprodukte bestimmten Sequenzabschnitten indirekt zugeordnet werden. Das erhaltene Peptidspektrum wurde in einer Datenbank (www.prospector.ucsf.edu) eingegeben und die Homologie mit

peptischen in silico Verdaus von insgesamt 33 verschiedenen Patatin-Aminosäuresequenzen abgeglichen. Die größte Übereinstimmung mit 33 % zurechenbaren Peptiden konnte für die Sequenz Q2MY38 erzielt werden. Die resultierenden Peptidspaltprodukte wurden mit dem MALDI-MS-Spektrum abgeglichen und den Massenpeaks potentielle Peptidsequenzen zugeordnet (s. Tabelle 24). Mögliche Modifikationen und Massenverluste wurden dabei berücksichtigt.

Tabelle 24: Mögliche Peptidsequenzen des Patatinhydrolysats mit Pepsin, ermittelt durch Datenbankabgleich des MALDI-MS-Spektrums mit berechneten Massen eines simulierten Verdaus der Patatinsequenz Q2MY38

Masse [MH] ⁺ u	Berechnete Masse [MH] ⁺ u	Massenverlust	Mögliche Aminosäuresequenz (1-Buchstaben-Code)	MC ¹⁾
559,75	559,64		LEGQL	1
559,75	559,65		RANKA	1
566,71	566,68		LSTVF	1
945,79	945,97	-3H ₂ O	TNTSNGDKY	0
1074,93	1075,21		FGPKYDGKY	2
1083,97	1084,09	-H ₂ O	Q(Gln→pyro-Glu)DLHSQNNY	1
1083,97	1084,14	-H ₂ O	DKTHTAQETA	1
1175,43	1175,42	-H ₂ O	DIKTNKPVIF	2
1310,28	1310,48	-H ₂ O	VIQQMTEAASSY	3
1328,25	1328,45	-H ₂ O	Q(Gln→pyro-Glu)KM(Oxidation)DNNADARLA	3
1328,25	1328,49		VIQQMTEAASSY	3
1422,22	1422,51	-4H ₂ O	FATNTSNGDKYEF	3
1434,28	1434,53		EGQLQKMDNNADA	2
1477,15	1476,92	-H ₂ O	TTKSVLVLFM(Oxidation)IL	5
1586,20	1585,99	-H ₂ O	KRFAKLLSDRKKL	4
1722,13	1721,83		FATNTSNGDKYEFNL	4
1722,13	1722,00		KQLLLLSLGTGTNSEF	5
1759,13	1758,93		ADYFDVIGGTSTGGLLTA	6
2377,77	2377,74	-2H ₂ O	QWMLVIQQMTEAASSYM(Oxidation)TDY	6

¹⁾ Missed Cleavage: Anzahl der spaltbaren Peptidbindungen, die durch Pepsin nicht hydrolysiert wurden.

Im Falle der Produkte aus dem Alcalase- bzw. dem Papainverdaus konnte kein Sequenzabgleich nach einem simuliertem Verdaus durchgeführt werden, da die Proteasen nicht hinreichend spezifisch hydrolysieren. Daher wurden zur Identifizierung im Folgenden tandem-massenspektrometrische Analysen durchgeführt.

4.7.2 Sequenzbestimmung von Peptiden mit Tandem-Massenspektrometrie

Zur tandem-massenspektrometrischen (MS/MS) Sequenzbestimmung von Peptiden wurden die Proben durch eine vorgeschaltete RP-Peptid-HPLC mit C₁₂-JupiterProteo-Säule (Phenomenex GmbH, Aschaffenburg/Deutschland) aufgereinigt und anschließend durch die Elektrospray-Ionisation (ESI) in die Gasphase überführt. Bei diesem Prozess wird die Probelösung durch eine hohle Metallnadel (1-100-µm Innendurchmesser) zur Nadelspitze geleitet, an der ein positives elektrisches Potenzial von 5 kV angelegt ist. Durch die hohe Spannung wird die Probe ionisiert und gleichzeitig durch einen beheizten Stickstoff-Trägergasstrom (T = 350 °C) zerstäubt. Bedingt durch die Coulomb-Abstoßung in den Flüssigkeitsfilamenten zerfallen die Tröpfchen und erzeugen schließlich einzelne Ionen in der Gasphase.

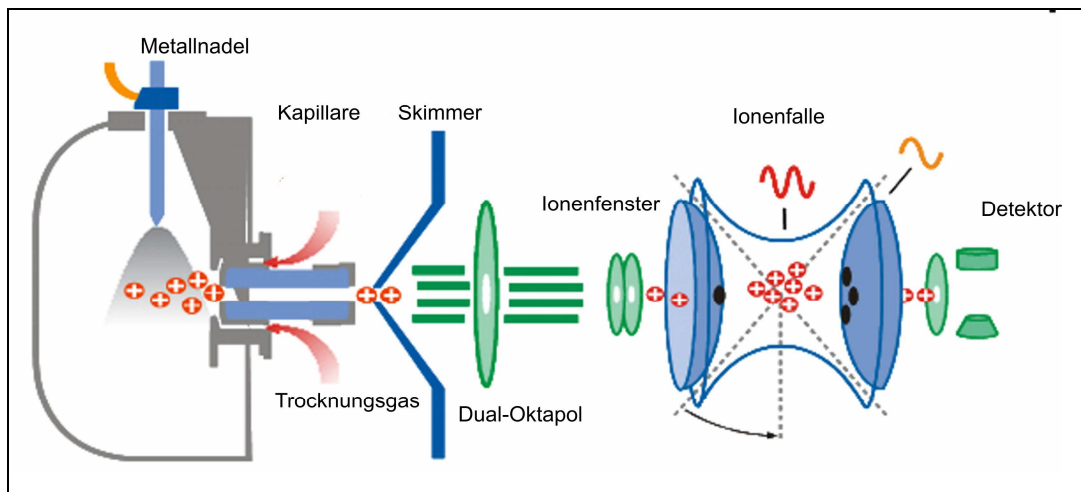


Abbildung 40: Schematischer Aufbau eines Ionenfallen-Massenspektrometers [131]

Über ein elektrisches Potenzial von 600 V werden diese zum Spray-Schild geleitet und über die Kapillare mit einer Spannung von 80 V durch den Skimmer dem Massenanalysator zugeführt. Zunächst werden die Ionen im Dual-Oktapol fokussiert. Über das Ionenfenster wird das Befüllen der Ionenfalle gesteuert. Eine Ionenfalle besteht aus einer Ringelektrode und zwei Endkappen mit kleinen, zentrischen Öffnungen zum Einlaß und Auswurf der Ionen. Durch eine angelegte Wechselspannung können die Ionen für variable Zeiten (Mikrosekunden bis Sekunden) auf stabilen Bahnen gehalten werden können. Die Ionen werden nun massenselektiv durch Variation der elektrischen Felder zum Detektor geschleust.

Bei der MS/MS wird in der Ionenfalle zunächst ein Vorläuferion isoliert, indem Ionen anderer Masse aus der Ionenfalle entfernt werden. Danach wird das Ion durch Resonanzanregung in Schwingung versetzt und durch Kollision mit einem zugeführten Stoßgas (Helium) fragmentiert. Die Fragmente werden schließlich sequenziell detektiert.

Die Fragmentierung der Peptide erfolgt an bevorzugten Soll-Bruchstellen (s. Abbildung 41). Dabei entstehen Serien von Fragmentationen, die sich in der Masse jeweils um die Aminosäure-spezifische Seitenkette unterscheiden. Aus den Massendifferenzen können die zugehörigen Aminosäuren und in Folge die Aminosäuresequenz abgeleitet werden.

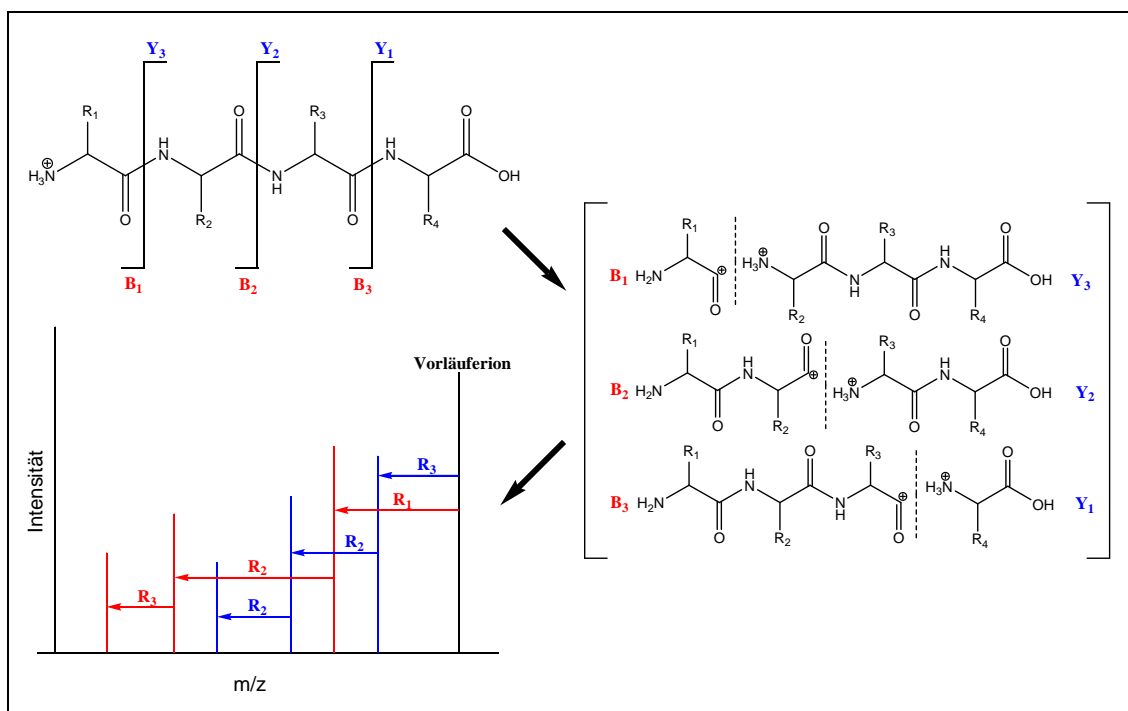


Abbildung 41: Fragmentierung der Vorläuferionen

In Abbildung 42 (S. 93) sind die HPLC-ESI-MS-Chromatogramme der Hydrolysatfraktionen F8a-F11c des Pepsinverdaus dargestellt. Aus den entsprechenden Spektren (nicht abgebildet) ließ sich m/z (Peptidmasse/Ladungs-Verhältnis) bestimmter Peaks ermitteln. In der anschließenden MS/MS-Analyse wurden diese Vorläuferionen (s. Abbildung 42, blaue/schwarze Peptidmassen) isoliert und fragmentiert und über die Fragmentationen die Aminosäuresequenz der unbekannt Peptide bestimmt. Dabei wurden variable Modifikationen, wie die mögliche Oxidation des Methionins oder die Umwandlung des Glutamins in Pyroglutaminsäure (Gln \rightarrow pyro-Glu), berücksichtigt. Bei nicht eindeutiger Zuordnung der Aminosäuresequenz ließen sich lediglich die Massen

der Peptide angeben. Insgesamt konnten bei den Hydrolysatfraktionen des Pepsinverdaus die Aminosäuresequenzen von 17 Peptiden bestimmt werden (s. Tabelle 25, S. 96), allein 11 davon in der Fraktion F8a. Die identifizierten Peptide bestehen aus 7-14 Aminosäuren mit Peptidmassen von $[MH]^+ = 876-1.669$ u. Sie weisen C-terminal die Aminosäuren Phenylalanin, Alanin, Tyrosin oder Leucin auf. Dies resultiert aus der spezifischen Bindungsspaltung des Pepsins nach dieser Aminosäure. Allerdings fällt auf, dass bei einigen Peptiden insbesondere nach Leucin und Alanin mögliche Spaltstellen ausgelassen und nicht hydrolysiert wurden. Ursache hierfür könnten benachbarte Aminosäuren sein, die die Anbindung der Enzym-Bindungstasche behindert. Kleinere Aminosäuren mit einer Kettenlänge von 2-6 Aminosäuren konnten nicht detektiert werden. Entweder liegt dies an einer zu geringen Konzentration in den Proben oder die Peptide wurden in der Gasphase nicht hinreichend ionisiert. In den antimikrobiell wirkenden Fraktionen F10a und F10b konnten zwei Peptide mit einer Peptidmasse von $[MH]^+ = 1.291,4$ u bzw. $[MH]^+ = 1.349,5$ u identifiziert werden. Weitere Peptide dieser Fraktionen ließen sich nicht zuverlässig charakterisieren. Daher bedarf es weiterer Untersuchungen, um diesen Peptiden die antimikrobielle Wirkung zweifelsfrei zuschreiben zu können.

Analog zu den vorangegangenen Analysen wurden die Hydrolysatfraktionen F8a-F11c des Alcalaseverdaus und des Papainverdaus untersucht (s. Abbildung 43 auf S. 94 und Abbildung 44 auf S. 95). Es konnten Peptide mit Massen von $[MH]^+ = 393-1.650$ u detektiert werden. Die Aminosäuresequenzen der identifizierten Peptide sind in Tabelle 25 (S. 96) zusammengefasst. Aufgrund der unspezifischen Spaltung der Alcalase und des Papains können C-terminal und N-terminal keine auffälligen Muster festgestellt werden. Für die antimikrobiell wirkende Fraktion F8c des Papainverdaus ließ sich nur bei einem Peptid mit $[MH]^+ = 1.160,3$ u die Aminosäuresequenz bestimmen. Weitere signifikante Peptide mit $[MH]^+ = 1.013$ u, 1.206 u, 1.227 u, 1.374 u, 1.462 u ließen sich ebenfalls nachweisen. Eine Bestimmung der Aminosäuresequenz konnte jedoch nicht eindeutig erfolgen.

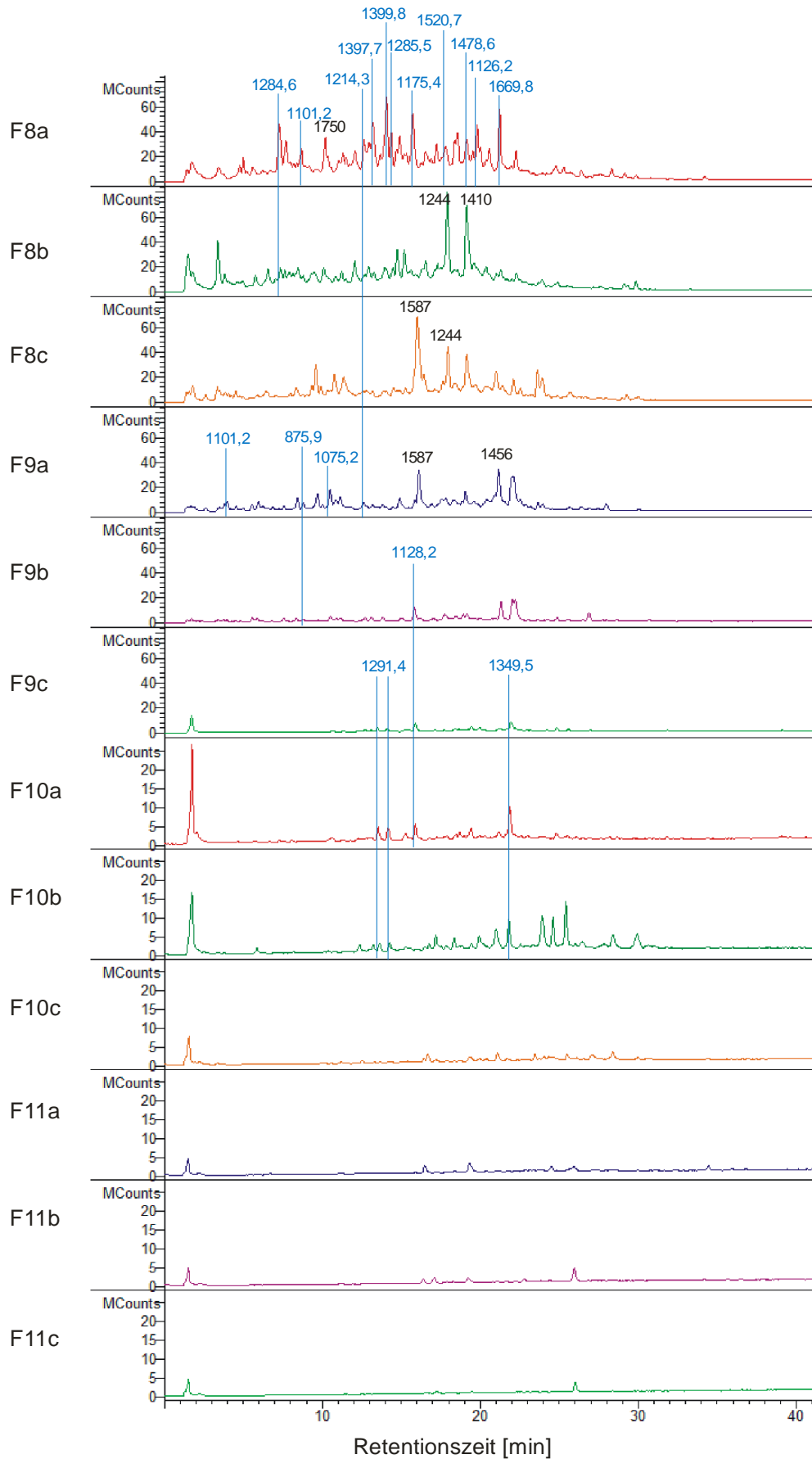


Abbildung 42: HPLC-ESI-MS-Analysen der Hydrolysatfraktionen des Pepsinverdaus (HPLC-Trennsäule: C₁₂-JupiterProteo (4 µm, 150 x 4 mm); Eluenten: A = deion. H₂O mit 0,1 % [v/v] FA, B = Acetonitril mit 0,1 % [v/v] FA; Gradient: 0,6 B%/min; Flussrate: 0,3 mL/min; Temperatur: 40 °C)

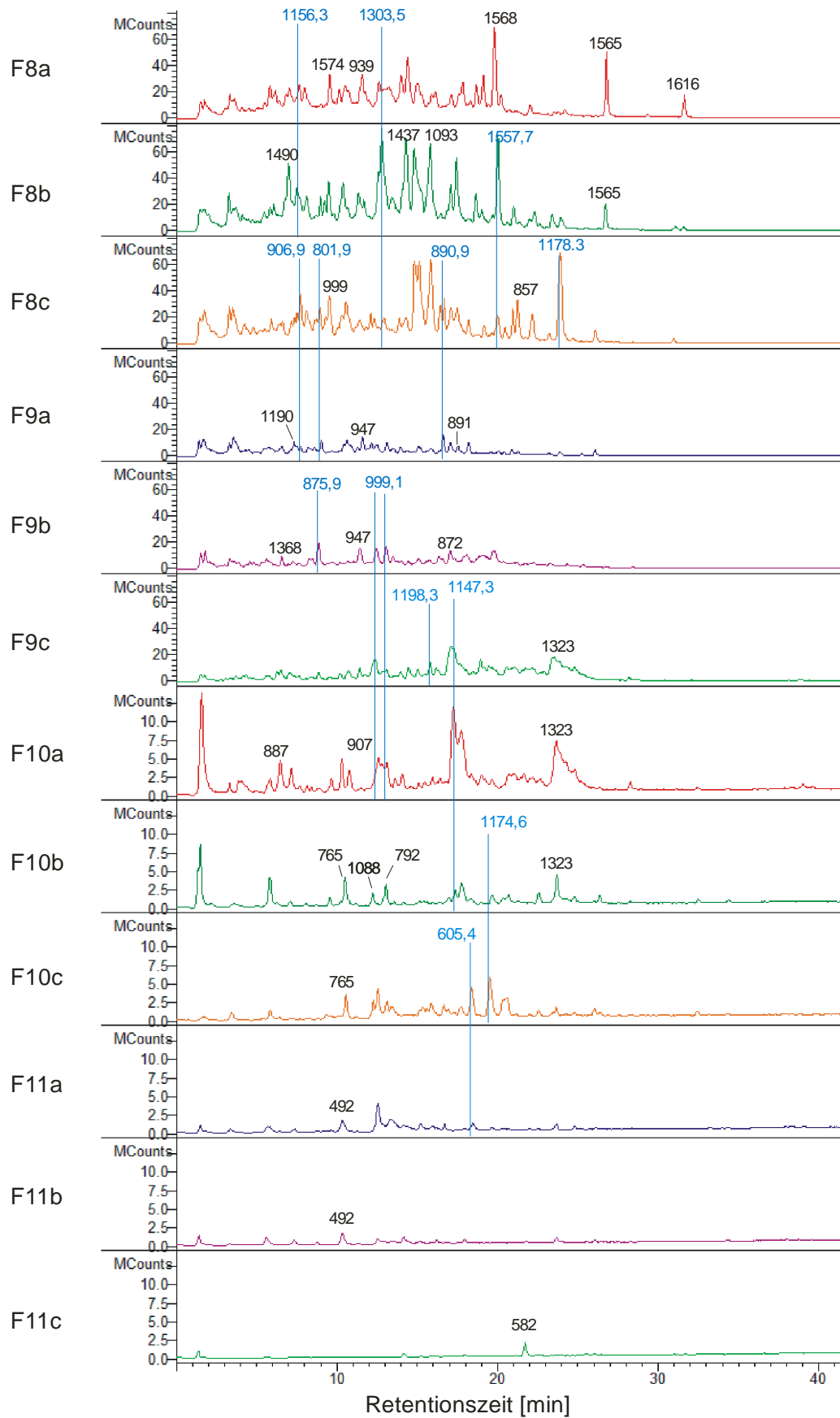


Abbildung 43: HPLC-ESI-MS-Analysen der Hydrolysatfraktionen des Alcalaseverdaus (HPLC-Trennsäule: C₁₂-JupiterProteo (4 µm, 150 x 4 mm); Eluenten: A = deion. H₂O mit 0,1 % [v/v] FA, B = Acetonitril mit 0,1 % [v/v] FA; Gradient: 0,6 B%/min; Flussrate: 0,3 mL/min; Temperatur: 40 °C)

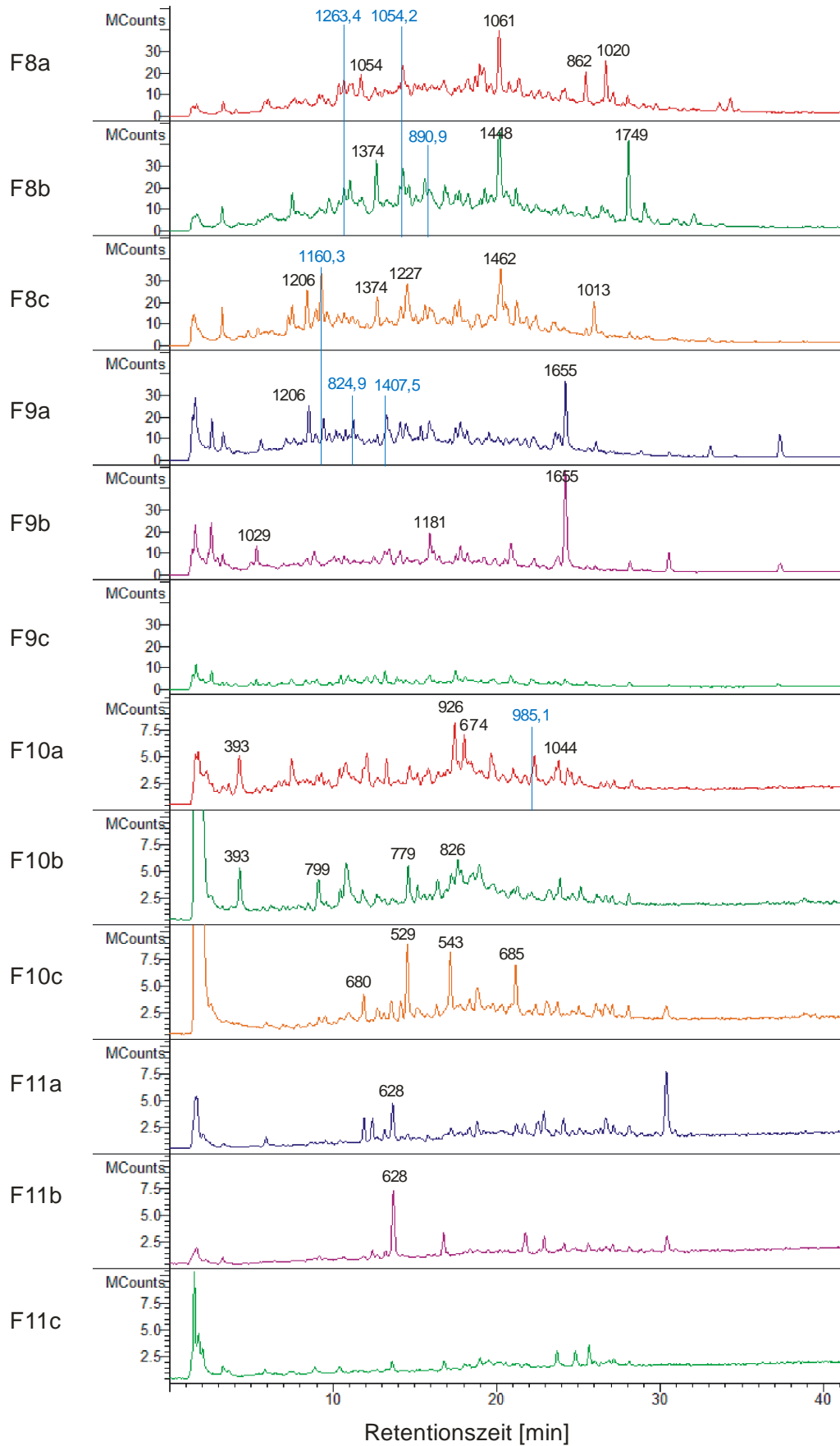


Abbildung 44: HPLC-ESI-MS-Analysen der Hydrolysatfraktionen des Papainverdaus (HPLC-Trennsäule: C₁₂-JupiteProteo (4 µm, 150 x 4 mm); Eluenten: A = deion. H₂O mit 0,1 % [v/v] FA, B = Acetonitril mit 0,1 % [v/v] FA; Gradient: 0,6 B%/min; Flussrate: 0,3 mL/min; Temperatur: 40 °C)

Tabelle 25: Identifizierte Peptide der fraktionierten Patatinhydrolysate

Hydrolyse	Fraktionen	Masse Vorläuferion [MH] ^{z+} ± 1,5 u	Berechnete Masse [MH] ⁺ u	Peptid-Aminosäuresequenz (1-Buchstaben-Code)
Pepsinverdau	F8a	835	1669,8	EFLEGQLQKM(Dioxidation)DNNA
	F8a	1520	1520,7	SLGTGTNSEFDKTY
	F8a	1479	1478,6	FDHGPKIFEPSGF
	F8a	1397	1399,8	AKLLSDRKKLRA
	F8a	1397	1397,7	LIVMILATTSSTF
	F9c-F10b	1350	1349,5	NM(Oxidation)ESLVQVGENL
	F9c-F10b	646	1291,4	Q(Gln→pyro-Glu)KM(Dioxidation)DNNADARL
	F8a	1284	1285,4	AIQQMTNAASSY(
	F8a+F8b	644	1284,6	AKSPELDAKM(Dioxidation)Y
	F8a-F9a	1214	1214,3	IQQMTNAASSY
	F8a	1174	1175,4	DIKTNKPVIF
	F8a	1126	1126,2	LSLGTGTNSEF
	F8a	1103	1101,2	QQMTNAASSY
	F9a	1101	1101,2	Q(Gln→pyro-Glu)ARHSQNNY
	F9a	1074	1075,2	FGPKYDGKY
F9b-F10a	515	1028,2	M(Oxidation)ATTKSFLI	
F9a+F9b	875	875,9	HSQNNYL	
Alcalaseverdau	F8b+F8c	779	1557,7	PNENNRPFAAANEI
	F8a-F8c	1303	1303,5	ITTPNENNRPF
	F9c	1198	1198,3	FVTHTSNGATY
	F8c	1180	1178,3	GEMVTVLSIDGG
	F10b+F10c	587	1174,6	RWLLAIQQM(Oxidation)
	F8a+F8b	1156	1156,3	ITTPNENNRPF
	F9c-F10b	1147	1147,3	YF[Q E]HGPHIF
	F9b-F10a	999	999,1	YF[Q E]HGPHI
	F8c-F9a	907	906,9	HTSNGDIY
	F8c-F9a	891	890,9	SPELDAKM
	F9b	875	875,9	HSQNNYL
	F8c-F9b	802	801,9	RYDGKY
F10c-F11a	605	605,4	ILATTS	
Papainverdau	F9a	704	1407,5	NSEFDKTHTAQE
	F8a+F8b	1263	1263,4	TGTNSEFDKTY
	F8c-F9a	1160	1160,3	TPNENNRPFA
	F8a+F8b	1053	1054,2	SPELDAKMY
	F10a	985	985,1	Q(Gln→pyro-Glu)FFGPKYD
	F8b	890	890,9	LAQEDPAF
	F9a	825	824,9	SFDIKTN

5 Fazit und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurden auf Basis der Membranadsorber-Technologie in einem mehrstufigen Prozess native, bioaktive Proteinfractionen aus Kartoffelfruchtwasser isoliert, aufgearbeitet und konfektioniert. An einer automatisierten Technikumsanlage wurden mittels verschiedener Membranadsorber-Wickelmodule die Kartoffelproteinfractionen Patatin und PI gewonnen. Durch Modifizierungen am Aufbau und der Prozessführung konnte die Fraktionierung in verschiedenen Modi betrieben werden. Im Vergleich zum Parallelbetrieb konnte durch den Tandembetrieb die Fraktionierungszeit mit kleinen Modulen (500 mL Totvolumen, 0,9-1,5 m² Membranfläche) um 38 % gesenkt werden. Damit stieg die Produktivität von 12,9 g/h Produkt auf 21,0 g/h Produkt. Die Bindungskapazitäten lagen im Durchschnitt bei 0,34 mg Patatin bzw. 0,18 mg PI pro cm² Membranfläche. Verblockungen in den Modulen beeinflussten die Leistungsfähigkeit negativ, so dass nach 5 Prozesszyklen ein Reinigungsschritt sinnvoll erscheint. Neben dem Standardsprotokoll sollten alternative Methoden zur schnellen und effektiven Reinigung getestet werden.

Durch das Scale-up auf große Module (1000 mL Totvolumen, 3,5-4,1 m² Membranfläche) konnte die Produktivität im Einzelbetrieb um 76 % gesteigert. Weiterhin zeigte sich, dass Extruder-Polymerspacer besser geeignet sind als Vlies-Polymerspacer. Letztere erzeugten im zweiten Fraktionierungszyklus Gegendrucke oberhalb des zulässigen Betriebsdrucks, so dass eine weitere Verwendung der Module nicht möglich war. In folgenden Untersuchungen, insbesondere zur Langzeitstabilität, sollten daher Extruder-Polymerspacer favorisiert werden.

Die Aufarbeitung der Fraktionierungseluate durch Ultra- und Diafiltration konnte mit hohen Proteinausbeuten von über 90 % realisiert werden. Nach anschließender Konfektionierung durch Sprüh- oder Gefriertrocknung wurden die Produkte bioanalytisch charakterisiert und die hohe Reinheit und Aktivität der Produkte nachgewiesen. Analysen zur Aminosäurezusammensetzung und zum Gylkoalkaloidgehalt bestätigten zudem die toxikologische Unbedenklichkeit und die hohe nutritive Qualität. Unerwünschte Verbräunungen im Patatin konnten durch Zusätze von Ascorbinsäure und Cystein effektiv verhindert werden.

Zur weiteren Optimierung des Prozesses sollten Einsparpotentiale beim Wasserverbrauch und Chemikalieneinsatz durch Wiederverwendung der Regenerations-

und Reinigungslösungen genutzt werden. Desweiteren ließe sich die Produktivität durch Schaltung mehrerer Module in Reihe erhöhen.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden Hydrolysesysteme mit den gastrointestinalen Enzymen Pepsin, Trypsin und Chymotrypsin sowie der technischen Protease Alcalase und der pflanzlichen Protease Papain entwickelt. Mit dem OPA-Assay wurde eine Methode etabliert, mit der schnell und genau der Reaktionsfortschritt über den Hydrolysegrad bestimmt werden kann. Beim Verdau mit Alcalase, Papain und Pepsin wurden hydrolytische Spaltprodukte generiert, die sich über eine RP-HPLC-Peptidanalytik nachweisen ließen und komplexe Fingerprints mit Peptiden bis etwa 1,5 kDa lieferten. Die Hydrolysate wurden mittels einer Größenausschluss-Chromatographie aufgereinigt, fraktioniert und entsalzt und anschließend lyophilisiert.

Die gewonnenen Hydrolysatfraktionen zeigten im Vergleich zum Präkursor-Protein signifikante antioxidative, antimikrobielle und ACE-inhibitorische Eigenschaften. Für einzelne Fraktionen des Pepsin- und Papainverdaus konnte eine antimikrobielle Wirkung auf *E. coli* K12 ($MIC_{50} = 14\text{-}360$ mg/L) bestimmt werden, die in gleicher Größenordnung wie die des antimikrobiellen Peptids Lactoferricin B liegt. Eine wachstumsfördernde Eigenschaft hingegen konnte für die Hydrolysatfraktionen des Alcalaseverdaus ermittelt werden. Die antioxidative Kapazität der Hydrolysatfraktionen lag mit bis zu 2,1 mmol Eq./g in gleicher Größenordnung wie die kommerziell erhältlicher Nahrungsergänzungsmittel. Untersuchungen zu Radikalfänger-Eigenschaften könnten diese Ergebnisse erweitern. Die ACE- IC_{50} -Werte lagen mit 46-68 mg/L im Bereich der in der Literatur angegebenen Ergebnisse für Hydrolyseprodukte aus Kartoffelprotein, Molkeprotein, Sojaprotein, Erbsenprotein oder Reisprotein (12-86 mg/L). Verglichen mit dem kommerziell erhältlichen, sehr potenten ACE-Hemmer Captopril sind sie zwar um den Faktor 2.000-10.000 höher. Allerdings ist belegt, dass diese Unterschiede in vivo relativiert werden, so dass in vivo Studien zur Behandlung von Hypertonie mit Patatinhydrolysaten vielversprechend erscheinen.

Mittels massenspektrometrischer Analysen konnten zahlreiche Peptide charakterisiert und die Aminosäuresequenz identifiziert werden. In den aufgereinigten Hydrolysatfraktionen lagen jedoch Pools verschiedener Peptide vor, so dass keine eindeutige Zuordnung zwischen Peptid und bioaktiver Wirkung getroffen werden konnte. Eine weitere Aufreinigung und Fraktionierung durch eine präparative Peptid-RP-HPLC erscheint hier sinnvoll, um die spezifische Wirkung isolierter Peptide zu testen.

6 Anhang

6.1 Material

6.1.1 Geräteliste

Crossflow-Filtrationsanlage	Sartocon jet Pumpe, Sartocon-Slice Kassettenmodule Hydrosart 10kDa, 0,1 m ² Membranfläche, (Sartorius AG, Göttingen/Deutschland),
SartobindDirect-Wickelmodule	Q- und S-Ionenaustauscher, (Sartorius Stedim Biotech, Göttingen/Deutschland)
Sprühtrockner	B-191 Mini-Spray-Dryer (Büchi GmbH, Essen/Deutschland)
Leitfähigkeitsmessgerät	WTW, Cond 315i
Sterilfilter-Spritzenaufsätze	Porengröße 0,2 µm (Sartorius Stedim Biotech, Göttingen/Deutschland)
Autoklav	System V-150 (System GmbH, Wettenberg/Deutschland)
Zellkultur-Brutschrank	Certomat® HK (B. Braun Biotech International, Melsungen/Deutschland)
Gelelektrophorese:	MiniProtean® Tetracell; PowerPac Basic (BIO-RAD Laboratories, München/Deutschland)
SEC-FPLC	BioLogic DuoFlow, BioLogic BioFrac Fraction Collector, Auto-Injection Valve AVR 7-3 (alle BIO-RAD Laboratories, München), Linear Uvis-20I Absorbance Detector und Omnifit-Säule (ID: 1,5 cm, Sigma-Aldrich GmbH, Buchs/Schweiz)
RP-HPLC	HPLC-Pumpe LCP 4100 (Techlab, Sickinge/Deutschland), UV/VIS-Detektor S- 3702 (Soma Optics LTD, Tokyo/Japan),

	Fluoreszenz-Detektor RF-10AXL (Shimadzu GmbH, Duisburg/Deutschland), Autosampler Triathlon (Spark, Emmen/Niederlande), Vakuumdegaser TS 7505 (Sykam GmbH, Gilching/Deutschland), Säulenofen ERC-125 (ERC, Alteglofheim), Software Clarity, Trennsäule C ₁₂ -JupiterProteo (4 µm, 250 x 4,6 mm) (Phenomenex GmbH, Aschaffenburg/Deutschland), Trennsäule C ₁₈ Resolve (5 µm, 150 x 3.9 mm) (Waters GmbH, Eschborn/Deutschland)
Gefriertrocknung	Christ ALPHA 1-4 LSC, Pumpe Vacuubrand 6 (Christ GmbH, Osterode am Harz/Deutschland)
Microplate-Spektrophotometer	Multiskan Spectrum (Thermo Labsystems, Vantaa, Finnland), Software SkanIt
Küvetten-Spektrophotometer	Cary50 (Varian GmbH, Darmstadt/Deutschland)
Fluoreszenz-Spektrophotometer	Fluoroskan Ascent (Thermo Labsystems, Vantaa, Finnland), Software Ascent
pH-Meter	HI 221 Calibration Check Microprocessor pH Meter (Hanna Instruments, Kehl am Rhein/Deutschland)
Reinstwasseranlage	Arium 611 uf uv (Sartorius AG, Göttingen/Deutschland)
Thermomixer:	Thermomixer compact (Eppendorf, Hamburg/Deutschland)
Zentrifugen	Centrifuge 5415 R (Eppendorf, Hamburg/Deutschland), Megafuge 1.0 RS (Heraeus Instruments GmbH, Osterode/Deutschland)
Optischer Sauerstoffsensor	Fibox 3 (Precision Sensing GmbH, Regensburg/Deutschland)

MALDI-TOF-MS	Micromass M@ldi (Waters GmbH, Eschborn/Deutschland)
ESI-MS/MS	500-MS ion trap (Varian GmbH, Darmstadt/Deutschland), HPLC-Trennsäule C ₁₂ -JupiterProteo (4 µm, 150 x 4 mm) (Phenomenex GmbH, Aschaffenburg/Deutschland)

6.1.2 Chemikalienliste

Acetonitril HPLC grade (Fluka GmbH, Buchs/Schweiz)
Acrylamid, p.a. (GE Healthcare, Chalfont St Giles/Großbritannien)
Agar (Sigma-Aldrich GmbH, Buchs/Schweiz)
Alcalase® 2,5L Typ DX (Novozymes, Bængvard, Dänemark)
Ammoniumhydrogencarbonat (Fluka GmbH, Buchs/Schweiz)
Ammoniumpersulfat, APS, p.a. (Sigma-Aldrich GmbH, Buchs/Schweiz)
Angiotensin-Converting-Enzyme, rabbit lung (Sigma-Aldrich GmbH, Buchs/Schweiz)
Ascorbinsäure, Vitamin C, 99 % (Fluka GmbH, Buchs/Schweiz)
2,2'-Azobis-(2-Methylpropionamidin) (Sigma-Aldrich GmbH, Buchs/Schweiz)
Bisacrylamid, p.a. (GE Healthcare, Chalfont St Giles/Großbritannien)
Bovines Serumalbumin (Sigma-Aldrich GmbH, Buchs/Schweiz)
Caseinhydrolysat (Sigma-Aldrich GmbH, Buchs/Schweiz)
Calciumchlorid Dihydrat (Sigma-Aldrich GmbH, Buchs/Schweiz)
Catechol (Sigma-Aldrich GmbH, Buchs CH)
Chlorogensäure, 95 % (Sigma-Aldrich GmbH, Buchs/Schweiz)
α-Chymotrypsin, bovin Pankreas Typ II, 40 U (Sigma-Aldrich GmbH, Buchs/Schweiz)
L-Cystein (Merck KGaA, Darmstadt)
Dikaliumhydrogenphosphat K₂HPO₄ (Sigma-Aldrich GmbH, Buchs/Schweiz)
N,N-Dimethyl-1,4-phenylendiamin, DMPD (Sigma-Aldrich GmbH, Buchs/Schweiz)
Dinatriumhydrogenphosphat Na₂HPO₄ (Riedel de Haën, Seelze)
Eisen(III)-chlorid (Fluka GmbH GmbH, Buchs/Schweiz)
Essigsäure, p.a. (Fluka GmbH GmbH, Buchs/Schweiz)
Ethylendiamintetraessigsäure, EDTA, 98 % (Fluka GmbH GmbH, Buchs/Schweiz)
Ethanol (Merck KGaA, Darmstadt)

Fleischextrakt, Rindfleischinfusion (Difco Laboratories GmbH, Augsburg)

Formaldehyd p.a. (Fluka GmbH GmbH, Buchs/Schweiz)

Fluorescein, Natriumsalz (Sigma-Aldrich GmbH, Buchs/Schweiz)

L-Glutathion (Sigma-Aldrich GmbH, Buchs/Schweiz)

Glycerin (Fluka GmbH GmbH, Buchs/Schweiz)

Glycin (Sigma-Aldrich GmbH, Buchs/Schweiz)

Harnstoff (Sigma-Aldrich GmbH, Buchs/Schweiz)

Hefeextrakt (Fluka GmbH GmbH, Buchs/Schweiz)

Hippuryl-histidyl-leucin Hydrat, HHL (Sigma-Aldrich GmbH, Buchs/Schweiz)

Kaliumdihydrogenphosphat KH_2PO_4 (Merck KGaA, Darmstadt)

Kaliumhexacyanoferrat(III) (Carl Roth GmbH, Karlsruhe)

Kaliumphosphat (Fluka GmbH GmbH, Buchs/Schweiz)

2-Mercaptoethanol, p.a. (Fluka GmbH, Buchs/Schweiz)

Modified Lowry Protein Test Kit (Pierce Thermo Fisher Scientific, Bonn)

Natriumacetat Trihydrat (Riedel de Haën, Seelze)

Natriumborat (Merck KGaA, Darmstadt)

Natriumcarbonat p.a. (Fluka GmbH, Buchs/Schweiz)

Natriumchlorid (VWR International GmbH, Darmstadt)

Natriumdihydrogenphosphat (Fluka GmbH, Buchs/Schweiz)

Natriumdisulfit, p.a. (Sigma-Aldrich GmbH, Buchs/Schweiz)

Natriumdodekylsulfat, SDS, p.a. (Fluka GmbH, Buchs/Schweiz)

Natriumhydrogencarbonat (Fluka GmbH, Buchs/Schweiz)

Natriumhydroxid Micropills (Riedel-de-Haën, Seelze)

Natriumthiosulfat p.a. (Fluka GmbH, Buchs/Schweiz)

p-Nitrophenylcaprat, syn. p-Nitrophenyldecanoat (Sigma-Aldrich GmbH, Buchs/Schweiz)

Papain 3U (Fluka GmbH, Buchs/Schweiz)

Pepsin 3500U (Sigma-Aldrich GmbH, Buchs/Schweiz)

PageRulerTM Unstained Protein Ladder (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot)

Rotiphorese® Gel 40 (37,5:1) (Carl Roth GmbH, Karlsruhe)

Salzsäure (Fluka GmbH, Buchs/Schweiz)

Silbernitrat (Carl Roth GmbH, Karlsruhe)

Tetramethylethyldiamin, TEMED (Carl Roth GmbH, Karlsruhe)

N_α -p-Tosyl-L-Arginin-Methylester, TAME (Sigma-Aldrich GmbH, Buchs/Schweiz)

Tricin (Sigma-Aldrich GmbH, Buchs/Schweiz)

Tris-Base (Fluka GmbH, Buchs/Schweiz)

Tris-HCl (Fluka GmbH, Buchs/Schweiz)

Tris-(hydroxymethylamino)methan (Fluka GmbH, Buchs/Schweiz)

Triton X-100 (Sigma-Aldrich GmbH, Buchs/Schweiz)

Trizma® pre-set crystals, pH 8,0, pH 8,3 (Sigma-Aldrich GmbH, Buchs/Schweiz)

Trolox, 97 % (Sigma-Aldrich GmbH, Buchs/Schweiz)

Trypton (Sigma-Aldrich GmbH, Buchs/Schweiz)

Trypsin aus Rinderpankreas, 14923 U (Fluka GmbH, Buchs/Schweiz)

Trypsininhibitor, Kunitz-Inhibitor, Sojabohne (Fluka GmbH GmbH, Buchs/Schweiz)

6.2 Downstream-Methoden

6.2.1 Prozesstechnische Fraktionierung der Kartoffelproteine

Die automatisierte Anlage wurde vor jeder Fraktionierung mit VE-Wasser gespült. Im Anschluss daran wurden die Membranadsorbermodule mit NaPP-Lösung gewaschen. Die Anlage wurde nach beendeter Prozessierung mit 0,1 M NaOH gereinigt und mit 50 mM NaOH beschickt. Die Module wurden nach der Reinigung in 1 M NaCl-Lösung mit 20 % Ethanol gelagert.

6.2.1.1 Einzelbetrieb

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

Zyklusschritt	Abbruchbedingungen/Parameter
Beladen Q-MA	min. 900 s
Waschen Q-MA	UV<0.2; min. 10 s
Verwerfen Q-MA	UV>0.2; min. 2 s
Eluieren Q-MA	UV<0.5 and LF>12; min. 30 s
Regenerieren Q-MA	UV<0.2 and LF>18; min. 30 s
Äquilibrierung Q-MA	LF<5; min. 30 s

6.2.1.2 Parallelbetrieb

Pro Zyklus wurde 2 L Kartoffelfruchtwasser (KFW) der Emsland-Stärke GmbH mit 10 g Natriumdisulfit versetzt und mit VE-Wasser auf 10 L verdünnt. Das verdünnte KFW wurde im Vorratsbehälter gegeben und die automatisierte Anlage mit folgenden Zyklusschritten gestartet:

Zyklusschritt	Abbruchbedingungen/Parameter
Beladen Q-MA, S-MA	min. 1200 s
Waschen Q-MA, S-MA	UV<0.2; min. 10 s
Verwerfen Q-MA	UV>0.2; min. 2 s
Eluieren Q-MA	UV<0.5 and LF>12; min. 30 s
Verwerfen S-MA	UV>0.2; min. 2 s
Eluieren S-MA	UV<0.5 and LF>12; min. 30 s
Regenerieren Q-MA, S-MA	UV<0.2 and LF>18; min. 30 s
Äquilibrierung Q-MA, S-MA	LF<5; min. 30 s

6.2.1.3 Tandembetrieb

Pro Zyklus wurde 2 L Kartoffelfruchtwasser (KFW) der Emsland-Stärke GmbH mit 10 g Natriumdisulfit versetzt und mit VE-Wasser auf 10 L verdünnt. Das verdünnte KFW wurde im Vorratsbehälter gegeben und die automatisierte Anlage mit folgenden Zyklusschritten durchgeführt:

Zyklusschritt	Abbruchbedingungen/Parameter
Beladen S-MA Waschen Q-MA	min. 1200 s UV<0.2; min. 10 s
Beladen S-MA Verwerfen Q-MA	min. 1200 s UV>0.2; min. 2 s
Beladen S-MA Eluieren Q-MA	min. 1200 s UV<0.5 and LF>12; min. 30 s
Beladen S-MA Regenerieren Q-MA	min. 1200 s UV<0.2 and LF>18; min. 30 s
Beladen S-MA Äquilibrierung Q-MA	min. 1200 s LF<5; min. 30 s
Beladen Q-MA Waschen S-MA	min. 1200 s UV<0.2; min. 10 s
Beladen Q-MA Verwerfen S-MA	min. 1200 s UV>0.2; min. 2 s
Beladen Q-MA Eluieren S-MA	min. 1200 s UV<0.5 and LF>12; min. 30 s
Beladen Q-MA Regenerieren S-MA	min. 1200 s UV<0.2 and LF>18; min. 30 s
Beladen Q-MA Äquilibrierung S-MA	min. 1200 s LF<5; min. 30 s

6.2.2 FPLC-Aufreinigung

Die Gelfiltration wurde an der Biologic-Duoflow-FPLC-Anlage mit Superdex 30-Säulenmaterial durchgeführt. Die Betthöhe der Säule betrug 70 cm. Die Detektion erfolgte bei $\lambda = 214$ nm. Als Puffer wurde 0,25 M Ammoniumhydrogencarbonatpuffer eingesetzt. Die Flussrate betrug 0,8 mL.

Die Gefriertrocknung der Fraktionen wurden in 15 mL Falcontubes mit 5 Löchern im Deckel höchstens 8 mL Probe gegeben. Diese wurden schräg gestellt (um Siedeverzug zu vermeiden) bei -80 °C schockgefroren. Die Trocknung erfolgte bei ca. 1 mbar über Nacht.

6.3 Enzymatische Hydrolysesysteme

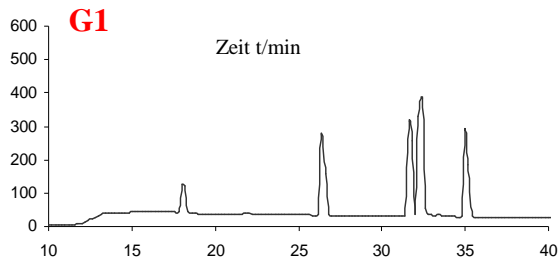
Es wurde eine 5 g/L Patatinlösung in den jeweiligen Hydrolysepuffern hergestellt und mit 1 % [v/v] Enzymlösung versetzt:

Verdau	Hydrolysepuffer	Enzymlösung
Alcalaseversau	deion. H ₂ O	direkt (flüssig)
Papainverdau	100 mM NaPP mit 10 mM Cystein und 2mM EDTA, (pH 7)	15 g/L Papain in Puffer
Pepsinverdau	0,1 M KPP (pH 2)	6 g/ Pepsin in 10 mM HCl
Trypsinverdau	0,1 M KPP (pH 8)	6 g/L Trypsin in 10 mM HCl
Chymotrypsin	100 mM Triethanolamin mit 10 mM CaCl ₂ (pH 7,8)	6 g/L Chymotrypsin in 10 mM HCl mit 2 mM CaCl ₂

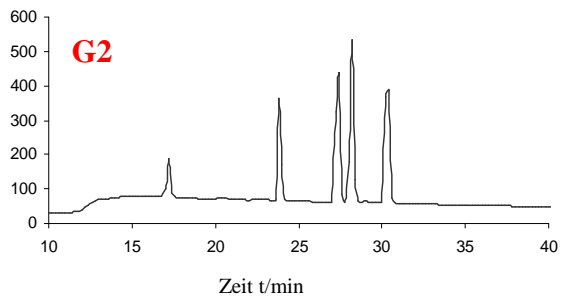
Die Inkubation erfolgte bei 37°C und 900 rpm im Thermoschüttler bzw. im thermostatisiertem Hydrolyse-Setup (s. Abbildung 18, S. 55). Die Deaktivierung nach Probenahme erfolgte bei 95 °C und 600 rpm für 15 min.

6.4 RP-HPLC Analytik

6.4.1 RP-HPLC-Peptidanalytik



Säule: Phenomenex C₁₂-JupiterProteo (4 µm; 250 x 4,6 mm); **Temperatur:** 40 °C; **Eluenten:** A = 0,1 % TFA/H₂O, B = 0,1 % TFA/ACN; **Standard:** Gly-Tyr, Val-Tyr-Val, Met-Enkeph., Leu-Enkeph., Angiotensin II, Insulin; **Injektion:** 50 µL



Variation der Gradientenrate [132]

Einfluss der Gradientenraten des Eluenten B bei konstanter Flussrate.

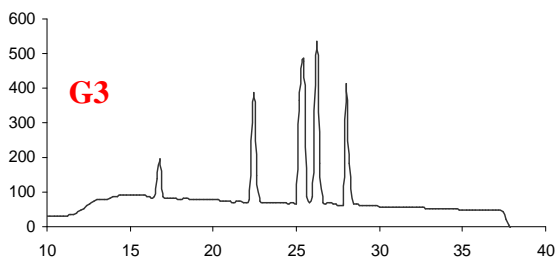
1,0 % B/min.....G1

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

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

1,7 % B/min.....G4

2,0 % B/min.....G5

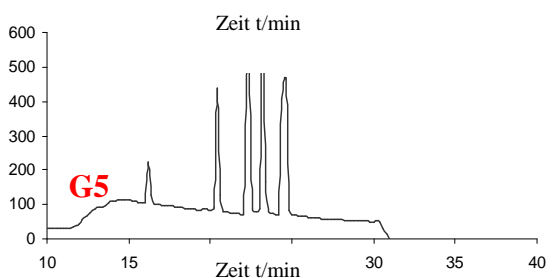
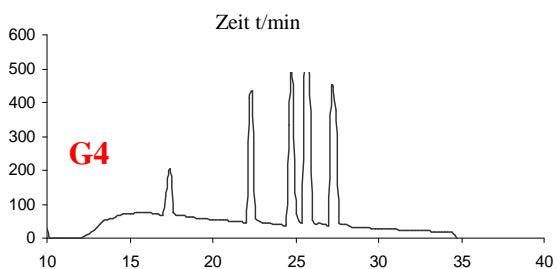


- Relative Peakhöhe verbessert sich mit höherer Gradientenrate.

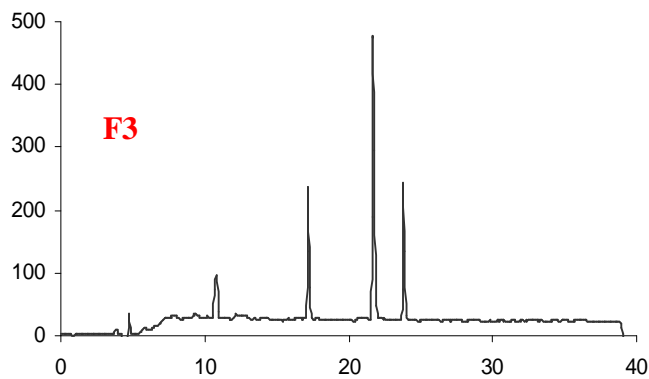
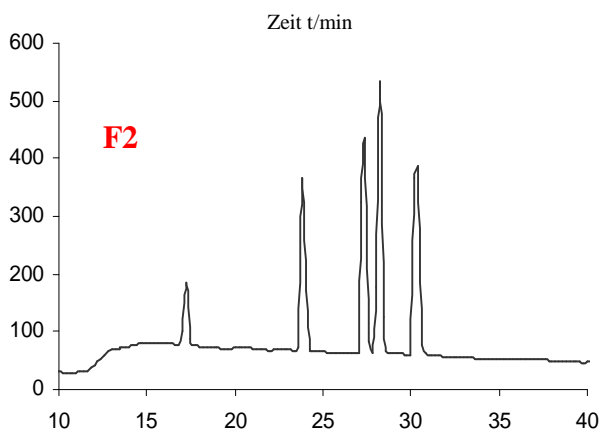
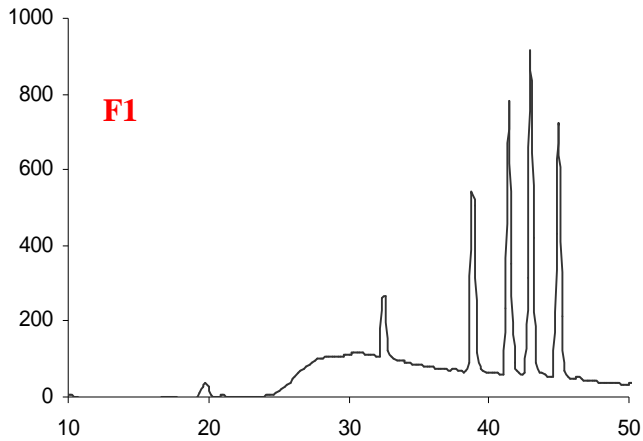
- Höherer Anteil an B (höhere Gradientenrate) steigert die Basislinienabsorption.

- Schwache Auflösung bei G1, akzeptable bei G2-G5.

- Peakfläche unabhängig von der Gradientenrate (Ergebnisse nicht dargestellt).



Gradientenrate G2 (1,3 % B/min) bietet den besten Kompromiss mit niedriger Basislinienabsorption, ausreichender Peakhöhe und exzellenter Auslösung.



Variation der Flussrate [132]

Einfluss verschiedener Flussraten auf die Peptidtrennung bei konstantem Gradienten G2 (1,3 % B/min) :

0.2 mL/min.....F1

0.4 mL/min.....F2

0.8 mL/min.....F3

- Detektorsignal (Peakhöhe) sinkt mit steigender Flussrate
 - Steigende Flussrate führt zu sinkender Retentionszeit
 - Keine Verbesserung der Auflösung mit hoher Flussrate
- Flussrate F2 (0,4 mL/min) bietet den besten Kompromiss aus Trennzeit, guter Auflösung und minimalem Eluentenverbrauch.

6.4.2 RP-HPLC-OPA-Aminosäureanalytik

6.4.2.1 Probenvorbereitung: Totalhydrolyse

In 2 mL Reaktionshütchen wurden 15 mg Protein eingewogen und mit 1,5 mL 6 N HCl gelöst/suspendiert. Der Reaktionsansatz wurde unter Stickstoff versiegelt und 24 h bei 100 °C und 500 rpm im Thermoschüttler inkubiert. Danach wurden die Lösung 5 min bei 13500 rpm zentrifugiert. 0,1 mL des Überstands wurden mit 0,2 mL 5M NaOH und 0,2 mL deion. H₂O versetzt und erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde 1:50 mit 0,4 M Natriumboratpuffer (pH 8) verdünnt und die Aminosäuren durch RP-HPLC analysiert.

6.4.2.2 Probenvorbereitung: freie Aminosäuren

In 1,5 mL Reaktionshütchen wurden 10 mg Protein bzw. Proteinhydrolysat eingewogen und mit 1 mL deion. H₂O gelöst/suspendiert. Unlösliche Bestandteile wurden 5 min bei 13500 rpm abzentrifugiert. 0,1 mL des Überstands wurden mit 0,4 mL Methanol versetzt, über Nacht bei -18 °C gelagert und gefällte Proteine 5 min 13500 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde 1:50 mit 0,4 M Natriumboratpuffer (pH 8) verdünnt und die Aminosäuren durch RP-HPLC analysiert.

6.4.2.3 RP-HPLC Analytik

15 µL der Proben wurden vor der Analyse mit 50 µL OPA-Reagenz derivatisiert. Je 10 µL der OPA-derivatisierten Proben wurden injiziert und bei einer Flussrate von 1 mL/min und linearem Gradienten an einer Waters C₁₈ Resolve Säule (5 µm, 150 x 3.9 mm) bei 30 °C getrennt. Die derivatisierten Aminosäuren wurden mittels eines Fluoreszenz-Detektors bei Ex. = 330 nm, Em. = 460 nm analysiert. In ist das Gradientenprofil sowie das Chromatogramm verschiedener Aminosäuren dargestellt.

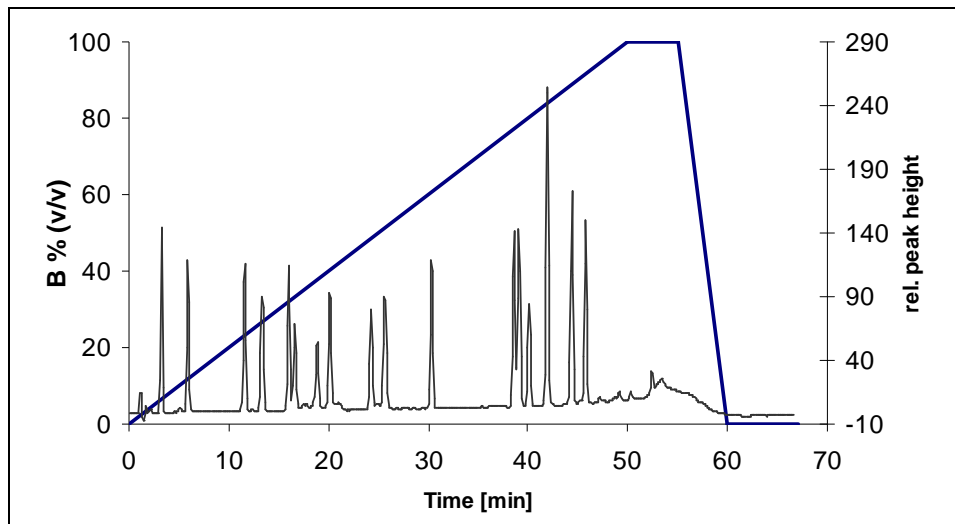


Abbildung 45: Gradientenprofil (blau) und Chromatogramm verschiedener Aminosäurestandards

6.5 Bioanalytische Assays

6.5.1 Bradford-Assay

Der Bradford-Assay wurde gemäß der Microplate Procedure A des Pierce Bradford Assay Kits [118] durchgeführt. Für die Messung der Absorption wurde das Multiskan-Platereader-Spektrophotometer verwendet. Die Proben wurden 1:5 mit deion. H₂O verdünnt.

6.5.2 Lowry-Assay

Der Lowry Assay wurde gemäß der Microplate Procedure des Pierce Modified Lowry Protein Kits [101] durchgeführt. Für die Messung der Absorption wurde das Multiskan-Platereader-Spektrophotometer verwendet. Zusätzlich zur BSA-Kalibrationsreihe wurde eine GGF-Kalibrationsreihe erstellt. Die Ergebnisse im Vergleich zeigt Abbildung 46.

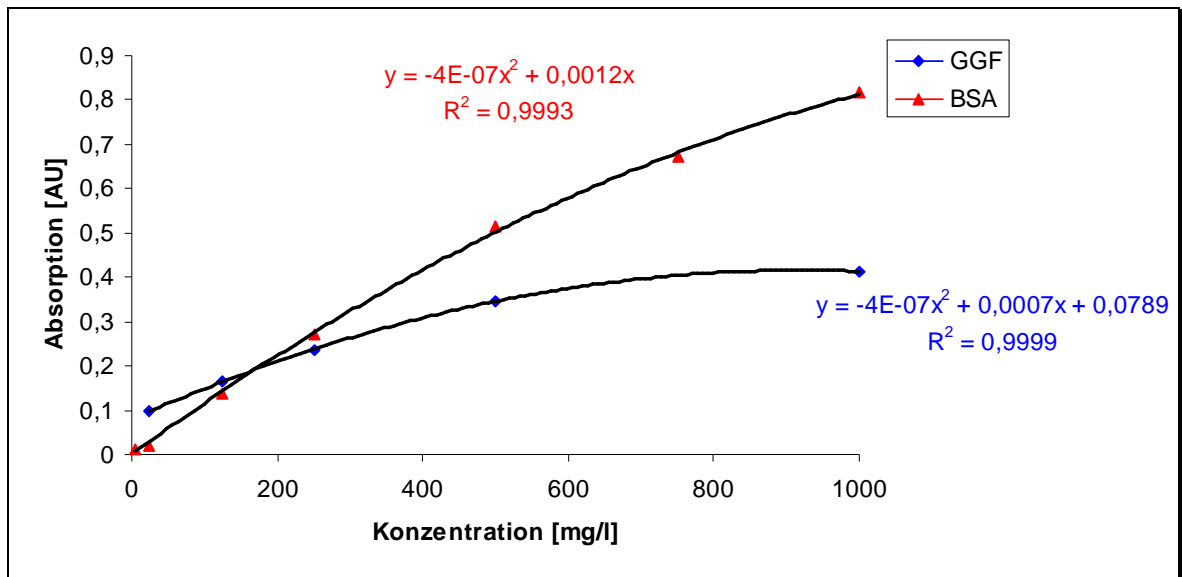


Abbildung 46: Kalibrationsreihen für BSA und GGF im Vergleich

6.5.3 Lipidacyldrolase-(LAH)-Assay

10 μL p-Nitrophenylcaprat (10,22 mM in Acetonitril) wurden in einer Halbmikroküvette vorgelegt. Dazu wurden 250 μL Triton X-100-Detergenzlösung (4 mM in deion. H_2O) und 690 μL Tris-HCl-Puffer (10 mM in deion. H_2O , pH 8) gegeben. Die bei 25 $^\circ\text{C}$ thermostatisierte Hydrolysereaktion des p-Nitrophenylcaprat wurde durch Zugabe von 50 μL Probelösung gestartet. Die Produktzunahme an p-Nitrophenol wurde am Cary50-Spektrophotometer bei einer Wellenlänge von 400 nm verfolgt. Über die lineare Steigung ließ sich mittels des molaren Extinktionskoeffizient $\epsilon = 16888 \text{ L}/(\text{mol cm})$ die LAH-Aktivität berechnen.

6.5.4 Proteaseinhibitor-Assay

20 μL Trypsinlösung (4,35 μM) in wässrigem Puffer (50 mM Tris-HCl, 10 mM CaCl_2 , pH 8,3) wurde mit 20 μL Probelösung in einer UV-Halbmikroküvette vorgelegt und 15 min bei 25 $^\circ\text{C}$ inkubiert. Danach wurde die bei 25 $^\circ\text{C}$ thermostatisierte enzymatische Spaltung durch Zugabe von 580 μL Pufferlösung und 400 μL des Substrats N_α -p-Tosyl-L-Arginin-Methylester (2,64 mM in Puffer) gestartet. Der Reaktionsverlauf wurde am Cary50-Spektrophotometer bei einer Wellenlänge von 247 nm verfolgt und mittels des Extinktionskoeffizienten $\epsilon = 449,5 \text{ L}/(\text{mol cm})$ die Aktivität quantifiziert. Über eine Kalibrierung des Testsystems (s. Abbildung 47) unter Verwendung des definiert

eingesetzten Trypsininhibitors (STI, 4,98 μM in Puffer) ließ sich die Aktivität unbekannter Proben prozentual als STI-Äquivalente ausdrücken.

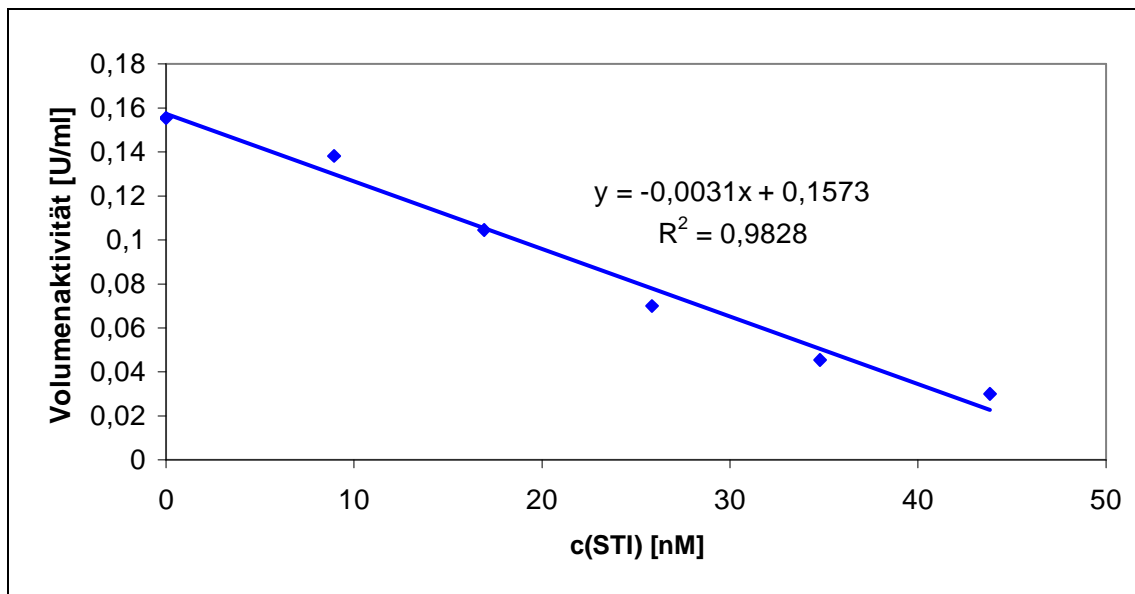


Abbildung 47: Linearer Zusammenhang der fallenden Volumenaktivität mit steigender Trypsininhibitor-Konzentration

6.5.5 PPO-Assay I

500 μL 0,1 M Kaliumphosphatpuffer (pH 7, 1 mM EDTA) wurde mit 500 μL wässriger Ascorbinsäurelösung (56 μM) in einer UV-Halbmikroküvette vorgelegt und mit 10 μL wässriger Chlorogensäure (5,7 mM) versetzt. Danach wurde die bei 25 $^{\circ}\text{C}$ thermostatisierte Redoxreaktion durch Zugabe von 10 μL Probelösung gestartet. Der Reaktionsverlauf wurde am Cary50-Spektrophotometer bei einer Wellenlänge von 265 nm verfolgt und mittels des Extinktionskoeffizienten $\epsilon = 7000 \text{ L}/(\text{mol cm})$ die PPO-Aktivität quantifiziert.

6.5.6 PPO-Assay II

10 μL Probelösung wurde mit 10 μL Inhibitorlösung (Ascorbinsäure, Cystein, Glutathion bzw. Natriumdisulfit; nicht inhibiert: Pufferlösung) in einer Halbmikroküvette vorgelegt. Die bei 25 $^{\circ}\text{C}$ thermostatisierte Reaktion wurde durch Zugabe von 480 μL Catechollösung (20 mM in 0,1 M Kaliumphosphatpuffer, pH 7) gestartet. Der Reaktionsverlauf wurde am Cary50-Spektrophotometer bei einer

Wellenlänge von 505 nm verfolgt und über die Anfangssteigung (s. Abbildung 48) die Aktivität quantifiziert.

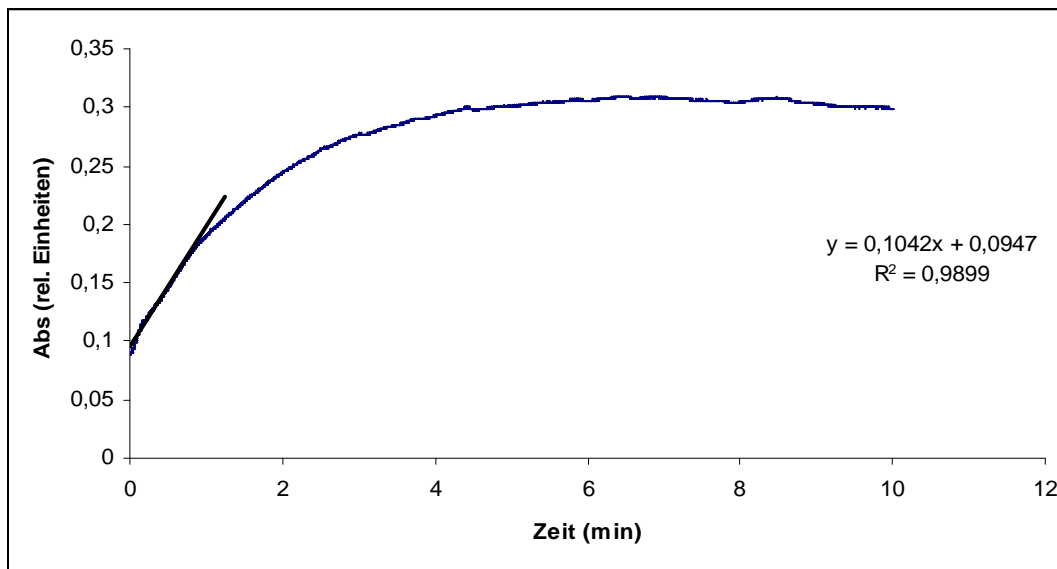


Abbildung 48: Direkte photometrische PPO-Aktivitätsbestimmung einer Patatinprobe ($c = 0,3 \text{ g/L}$) über die max. Anfangssteigung. Absorptionsmessungen bei 505 nm, 25 °C, pH 7

6.5.7 OPA-Assay

Für das OPA-Reagenz wurden 1,905 g Natriumtetraborat (Dekahydrat) und 50 mg SDS vollständig in 37,5 mL deion. H₂O gelöst und 40 mg *ortho*-Phthaldialdehyd, gelöst in 1 mL Ethanol, hinzugegeben. Dazu wurden 285 µl DTT-Lösung (1M) gegeben und mit deion. H₂O auf 50 mL aufgefüllt. Als Standard eine Serin-Stammlösung mit einer Konzentration von 100 mg/L angesetzt. Die Proben wurden 1:5 verdünnt. Auf einer Mikrotiterplatte wurden je 30 µl Standard, Nullprobe (Blank) bzw. Peptidproben vorgelegt, 225 µl OPA-Reagenz hinzugegeben und nach 2 min Inkubationszeit die Absorption bei $\lambda = 340 \text{ nm}$ am Multiskan-Platereader-Spektrophotometer gemessen. Zunächst wurden mit folgender Formel die Milliäquivalente Serin-NH₂ pro g Protein berechnet:

$$(5) \quad \text{Serin} - \text{NH}_2 = \frac{\text{Absorption}_{\text{Probe}} - \text{Absorption}_{\text{Blank}}}{\text{Absorption}_{\text{Standard}} - \text{Absorption}_{\text{Blank}}} \cdot \frac{0,9516 \text{ meqv/L} \cdot 100}{X \cdot P}$$

Dabei ist X die eingesetzte Probenkonzentration in g/L und P der Proteingehalt der Probe in %. Damit ergibt sich h aus der folgenden Formel:

$$(6) \quad h = \frac{\text{Serin-NH}_2 - \beta}{\alpha} \left[\frac{\text{meqv}}{\text{g/Protein}} \right]$$

α und β sind spezifische Proteinkonstanten. Für nicht bestimmte Proteinkonstanten kann in guter Näherung $\alpha = 1.0$ und $\beta = 0,4$ verwendet werden. Aus h und h_{tot} (8,4 meqv/g Protein für Patatin) wurde der Hydrolysegrad (DH) über die folgende Formel berechnet:

$$(7) \quad \text{DH} = h / h_{tot} * 100\%$$

6.5.8 ACE-Assay

90 μL 5 mM Hippuryl-histidyl-leucin Hydrat (HHL), gelöst in 0,1 M Borat-Puffer (pH 8.3, 0.4 M NaCl), wurden mit 10 μL Probe versetzt und bei 5 min 37 °C inkubiert. Danach wurden 30 μL 60 mU/mL Angiotensin-Converting-Enzym, gelöst in Tris-Puffer (pH 7.5, 0.3 M NaCl), hinzugeben und weitere 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde danach durch pH-Shift-Inaktivierung des ACE mit 8 μL 5 M HCl beendet. Die Reaktionsprodukte wurden an einer RP-HPLC mit C₈ Supelco-Säule (5 μm ; 150 x 4.6 mm) bei 37 °C aufgetrennt und bei 228 nm detektiert. Als mobile Phasen wurde ein Gradient aus Eluent A = 0,1 % TFA/H₂O und Eluent B = 0,1 % TFA/ACN bei einer Flussrate von 1 mL/min verwendet:

Zeit	Eluent A	Eluent B
0	100	0
24	30	70
25	0	100
30	0	100
31	100	0
38	100	0

Es wurden 10 μL Probe injiziert. Die Analysen wurden in Dreifachbestimmung durchgeführt. Über die Bestimmung der Peakintegrale wurden die Konzentrationen des Abbauprodukts Hippursäure bestimmt. Nach einer Kalibration des Produktumsatzes mit verschiedenen Konzentrationen an ACE wurde der Produktumsatz nach Zugabe einer inhibierenden Probe korreliert und die entsprechende ACE-Aktivität bzw. -Inhibition ermittelt.

6.5.9 TEAC-Assay

15 μL Probe ($c \approx 1 \text{ g/L}$) oder Trolox-Standard (in Methanol) in einer Mikrotiterplatte vorlegen und mit 300 μL Reaktionslösung versetzen. Die Reaktionslösung besteht aus 100 μL 100mM DMPD in 9,88 mL 0.1 M Acetat-Puffer (pH 5.25) und 20 μL 50 mM Eisen(III)-chlorid-Lösung (Endkonzentrationen $c(\text{DMPD}) = 1 \text{ mM}$, $c(\text{FeCl}_3) = 0.1 \text{ mM}$). Das Mikrotiterplatte wird 10 min bei 25 °C geschüttelt und anschließend photometrisch die Absorption am UV-Spektrometer bei 505 nm gemessen.

Die Werte der Oxidationsinhibition verschiedener Trolox-Standardkonzentrationen wurden nach der Formel

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

Berechnet. Dabei ist A_0 die Absorption der Blank-Probe und A_i die Absorption der Standardprobe. Aus den OxI der Proben wurde über die Standardreihe (Abbildung 49) die Troloxäquivalentkonzentration berechnet und über die Formel

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

die antioxidative Kapazität ermittelt.

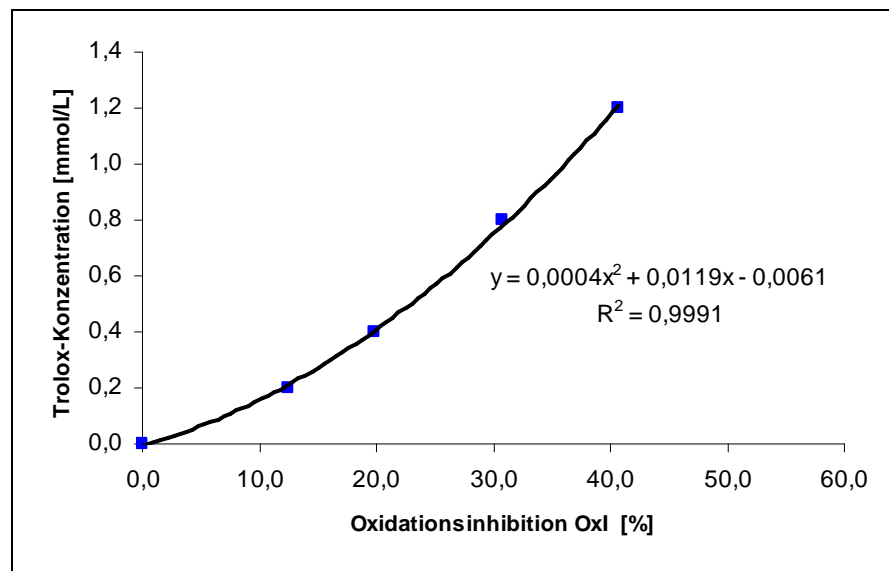


Abbildung 49: Kalibration des TEAC-Assay mit Trolox als Antioxidanz

6.5.10 ORAC-Assay

20 µL der verdünnten Probe (ca. 0,1 g/L je nach Aktivität) bzw. der Trolox-Standards im Konzentrationsbereich von 10-80 µM (Endkonzentration 1-8 µM) wird in einer Mikrotiterplatte vorgelegt. Dazu werden 120 µL einer 117 nM Fluorescein-Lösung in 75 mM Phosphatpuffer (pH 7,4) (1,17 mM Fluorescein-Stammlösung 4 Wochen bei 4°C haltbar) gegeben und 15 min bei 37 °C inkubiert. Nahezu gleichzeitig wird in alle Wells mit einer Multichannelpipette 60 µL APPH (40 mM) pipettiert und sofort im Fluoreszenzspektrometer die Fluoreszenz (Excitation 485-P, Emission 535-P) 80 min jede Minute nach vorherigem Schütteln vermessen.

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

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

Dabei ist f_0 die Fluoreszenz zum Zeitpunkt 0 und f_i die Fluoreszenz zum Zeitpunkt i . Nach Subtraktion des Blank-AUC von der Proben-AUC wurde die Netto-AUC erhalten. Die Netto-AUC der Standardreihe lieferten eine Kalibrationsreihe (Abbildung 50).

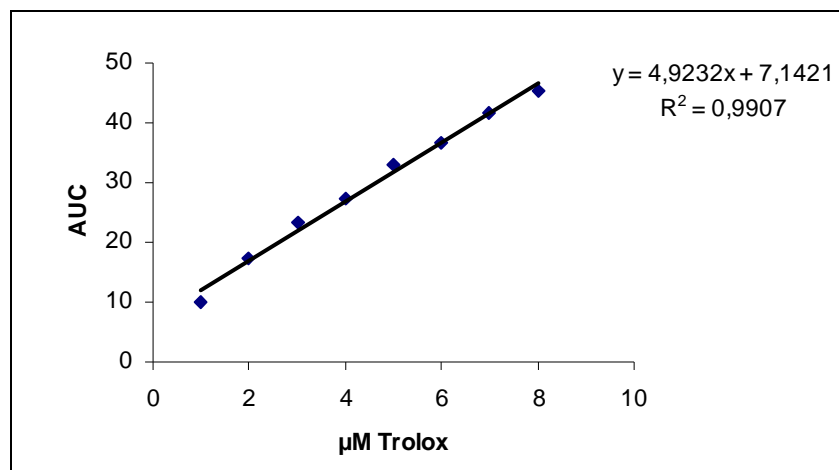


Abbildung 50: Kalibration des ORAC-Tests mit Trolox als Antioxidanz

Aus den Netto-AUC der Proben wurde über die Standardreihe die µmol Troloxäquivalente berechnet. Daraus konnten über die Formel

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

folgende antioxidative Kapazitäten berechnet werden:

Patatinhydrolysate (Pepsin)	mmol Eq. /g Protein	Patatinhydrolysate (Papain)	mmol Eq. /g Protein	Patatinhydrolysate (Alcalase)	mmol Eq. /g Protein
F6	0,601	F6	0,397	F6	0,490
F7	0,479	F7	0,364	F7	0,319
F8	0,892	F8	0,495	F8	0,463
F9	2,140	F9	0,890	F9	0,928
F10	1,529	F10	1,221	F10	1,579
F11	1,536	F11	0,797	F11	1,928

6.5.11 Plattendiffusionstest

Für die Untersuchung auf antimikrobielle Wirkung wurde ein Plattendiffusionstest genutzt. Dazu wurden *E. coli* K12 in LB-Medium (Hefeextrakt 5 g/L; Trypton 5g/L; NaCl 1 g/L) bei 37 °C und 120 rpm bis zum logarithmischen Wachstum kultiviert. Der Fortschritt der Kultivierung wurde durch Auszählen der Zellzahl sowie der OD₆₀₀-Bestimmung überwacht. Abbildung 51 zeigt die Korrelationsgerade der beiden Werte.

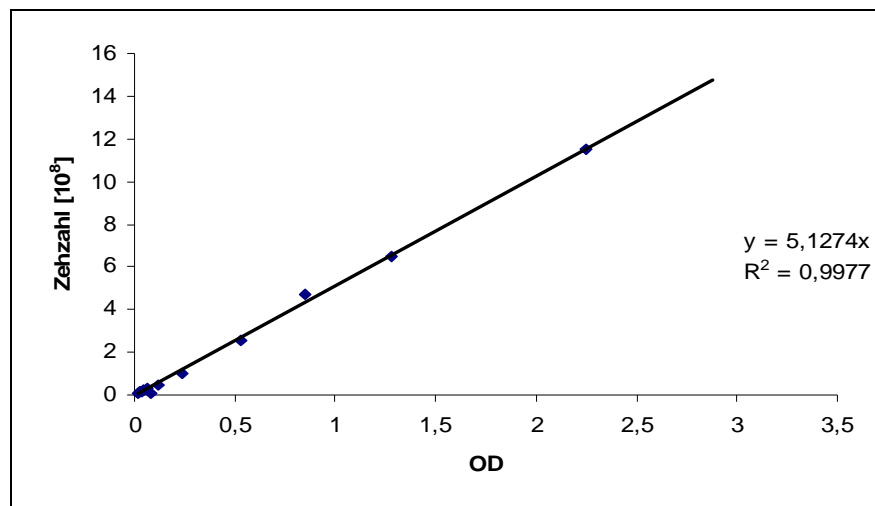


Abbildung 51: Korrelationsgrade von OD₆₀₀ und Zellzahl

Für den eigentlichen Test wurde die gleiche Kultivierung durchgeführt und aus der OD über die Korrelationsgerade die Zellzahl berechnet. Dann wurde mit LB-Medium auf eine Zellzahl von 10⁸ Zellen/ml verdünnt und davon 100 µL auf Mueller-Hinton-Agar-Platten (Fleischextrakt/Rindfleischinfusion 6,0 g/L; Caseinhydrolysat 17,5 g/L; Stärke 1,5 g/L; Agar 11,0 g/L) ausgestrichen. Auf diese Platten wurden schließlich Filterdisks mit einem Durchmesser von 5 mm gelegt, auf die jeweils 10 µl Standardantibiotika (Konzentration 1g/L), 10 µl deion. H₂O als Nullwert, sowie 10 µl der zu untersuchenden Substanzen gegeben wurden. Die Platten wurden 18 h inkubiert und danach die Hemmhöfe um die Filterdisks vermessen.

6.6 Abkürzungsverzeichnis

[°C]	Grad Celsius
[cm]	Zentimeter
[cm ²]	Quadratcentimeter
[Da]	Dalton
[L]	Liter
[m ²]	Quadratmeter
[mg]	Milligramm
[min]	Minute
[mL]	Milliliter
[μL]	Mikroliter
[s]	Sekunde
[v/v]	Volumen/Volumen
[v/w]	Volumen/Gewicht
%	Prozent
AU	Absorptionseinheit
c	Konzentration
deion. H ₂ O	deionisiertes Wasser
dyn.	dynamisch
E.C.	Enzyme Commission
Em.	Emission
Eq.	Äquivalente
etc.	et cetera
Ex.	Excitation
I.D.	Innendurchmesser
KFW	Kartoffel Fruchtwasser
Lsg.	Lösung
<i>m</i>	Mittelwert
M	molar
Mio.	Million
MWCO	Molecular Weight Cut-Off, molekularer Größenausschluss
n. b.	nicht bekannt
pI	isoelektrischer Punkt

rel.	relativ
rpm	rotation per minute (Umdrehungen pro Minute)
s	Standardabweichung
s.	siehe
u	Masseneinheit (unit)
U	Unit
UV	ultraviolett
\dot{V}	Volumenstrom
VE	vollentionisiert
vgl.	vergleiche
vs.	versus
wt-%	Gewichtsprozent
z. B.	zum Beispiel

Aminosäure	3-Buchstaben- code	1-Buchstaben- code
Histidine	His	H
Arginin	Arg	R
Lysin	Lys	K
Isoleucin	Ile	I
Phenylalanin	Phe	F
Leucin	Leu	L
Tryptophan	Trp	W
Alanin	Ala	A
Methionin	Met	M
Prolin	Pro	P
Cystein	Cys	C
Asparagin	Asn	N
Valin	Val	V
Glycin	Gly	G
Serin	Ser	S
Glutamin	Gln	Q
Tyrosin	Tyr	Y
Asparaginsäure	Asp	D
Glutaminsäure	Glu	E
Threonin	Thr	T

6.7 Curriculum Vitae

Persönliche Informationen

Name	Alain-Michel Graf
Geburtsdatum	10. Juni 1980
Geburtsort	Hildesheim
Familienstand	ledig
Kontaktdaten	Fröbelstr. 9, 30451 Hannover Tel.: 0511-2629603 Mobil: 0177-6295887 E-Mail: alaingraf@web.de

Berufliche Tätigkeit

05.2009 – 11. 2009	Wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Rinderklinik der Tierärztlichen Hochschule Hannover
05.2006 – 04.2009	Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Technische Chemie der Leibniz Universität Hannover unter der Leitung von Prof. Dr. Thomas Scheper

Studium

10.2000 – 04.2006	Chemiestudium an der Leibniz Universität Hannover Erlangung des Diploms in Chemie (Gesamtnote 1.28) Diplomarbeit mit dem Titel <i>Chemische Funktionalisierung von Hohlfasermembranen für die Anwendung im Bereich integrierter Downstreaming-Prozesse</i> (Note 1.0)
-------------------	---

Zivildienst

1999 – 2000 Städtisches Krankenhaus Hildesheim

Schulausbildung

1990 – 1999 Bischöfliches Gymnasium Josephinum, Hildesheim

Abschluss: Allgemeine Hochschulreife (Note 2.5)

1986 – 1990 Grundschule St. Elisabeth, Hildesheim

Zusätzliche Qualifikationen

Fremdsprachen Englisch, Latein, Grundkenntnisse in Italienisch

IT-Kenntnisse MS Office, Origin, ChemOffice, Adobe Photoshop,
CorelDraw

Zertifikate/Seminare Qualitäts-, Öko- und Kostenmanagement in der
chemisch-pharmazeutischen Industrie

Marketing

Qualitätssicherung in der chemischen Produktion

Verfahrenstechnische und betriebswirtschaftliche
Grundlagen biotechnologischer Prozesse

Schutzrechte und Patente

Fachseminar pH, Redox, Leitfähigkeit, O₂ und Trübung

Projektmanagement

6.7.1 Publikationen

- [1] C. Benecke , A. Graf, S. Beutel, M. Lotz, T. Scheper; Gewinnung von fettreduziertem Erbsenprotein durch den Einsatz von Ionenaustauschermembranen, DECHEMA-Tagung „Industrielle Nutzung nachwachsender Rohstoffe - Chemie, Biotechnologie, Verfahrenstechnik“ 2008, Frankfurt (Poster)
- [2] A. Graf, S. Beutel, M. Lotz, T. Scheper; Isolation and characterization of biologically active potato proteins, DECHEMA-Tagung „Industrielle Nutzung nachwachsender Rohstoffe - Chemie, Biotechnologie, Verfahrenstechnik“ 2008, Frankfurt (Poster)
- [3] A. Graf, S. Beutel, M. Lotz, T. Scheper, Isolation and characterization of biologically active potato proteins; European BioPerspectives 2007, Köln (Poster)
- [4] S. Kroll, L. Meyer, A.-M. Graf, S. Beutel, J. Glökler, S. Döring, U. Klaus, T. Scheper: Heterogeneous surface modification of hollow fiber membranes and the utilization of affinity membranes in purification processes, Intl. Workshop on Downstream Processing 2007, Delft (Poster)
- [5] S. Kroll, L. Meyer, A.-M. Graf, S. Beutel, J. Glökler, S. Döring, U. Klaus, T. Scheper: Heterogeneous surface modification of hollow fiber membranes for use in micro-reactor systems; Journal of Membrane Science 299 (2007), 181-189
- [6] A.-M. Graf, R. Steinhof, M. Lotz, C. Kasper, S. Beutel, R. Ulber: Downstream-Processing mit Membranadsorbern zur Isolierung nativer Proteinfractionen aus Kartoffelfruchtwasser; Chemie Ingenieur Technik 81 (2009), 267-274
- [8] K. Wegner, A.-M. Graf, I. Schneider, W. Detmering, N. Zern, T. Ellrott: Aktuelle Aspekte der Kartoffelforschung; Ernährungsumschau Forschung & Praxis 4 (2010), 184
- [9] A.-M. Graf: Isolation and characterization of high-value functional ingredients from potatoes, Biotechnica-Messe 2008 (Vortrag)
- [10] A.-M. Graf, V. Alt, S. Beutel, C. Kasper, T. Scheper: Quantitative Glycoalcaloid Determination in PFJ Process Samples from Industrial Starch Production, 60. Starch Convention 2009, Detmold (Vortrag)

7 Literatur

- [1] Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz, Kartoffelernte 2008: Erträge gut – Verbraucherpreise stabil, *Pressemitteilung 146*, 25.09.2008
- [2] A. Pots, Physico-chemical properties and thermal aggregation of patatin, *Proefschrift Universität Wageningen*, 1999
- [3] G. van Koningsveld, Physico-chemical and functional properties of potato proteins, *Proefschrift Wageningen Universität*, 2001
- [4] I. Siro, E. Kápolna, B. Kápolna, A. Lugasi, Functional food. Product development, marketing and consumer acceptance – A review, *Appetite 51*, 456-467, 2008
- [5] F. Menzel, Proteinauftrennung aus Standardproteinmischungen und industriellem Kartoffelfruchtwasser mittels Membranadsorbentien, *Dissertation Universität Hannover*, 2005
- [6] V. Alt, Entwicklung verschiedener Aufreinigungs- und Analysestrategien für Proteine und Glykoalkaloide in Kartoffelfruchtwasser, *Dissertation Universität Hannover*, 2006
- [7] R. Steinhof, Aufbau eines Downstream-Prozesses zur Proteingewinnung mittels Membrantechnologie am Beispiel von Kartoffelfruchtwasser, *Dissertation Leibniz Universität Hannover*, 2007
- [8] <http://faostat.fao.org>, 15.02.2010
- [9] Statistisches Jahrbuch, Über Ernährung, Landwirtschaft und Forsten 2009, *Wirtschaftsverlag NW*, Bremerhaven 2009, ISBN 978-3-86509-981-5
- [10] E. Breitmaier, Alkaloide: Betäubungsmittel, Halluzinogene und andere Wirkstoffe – Leitstrukturen aus der Natur, 3. Auflage, *Vieweg+Teubner Verlag*, Wiesbaden 2008, ISBN 3834805319
- [11] Z. Udalova, S. Zinoveva, I. Vasileva, V. Paseshnichenko, Correlation between the structure of plant steroids and their effects on phytoparasitic nematodes, *Applied Biochemistry and Microbiology 40(1)*, 93-97, 2004
- [12] D. B. Smith, J. G. Roddick, J. L. Jones, Potato glycoalkaloids: Some unanswered questions, *Trends in Food Science & Technology 7*, 126-131, 1996

-
- [13] A. M. Pots, H. Gruppen, R. van Diepenbeek, J. J. van der Lee, M. A. J. S. van Boekel, G. Wijngaards, A. G. J. Voragen, The effect of storage of whole potatoes of three cultivars on the patatin and protease inhibitor content; a study using capillary electrophoresis and MALDI-TOF mass spectrometry, *Journal of the Science of Food and Agriculture* 79(12), 1557-1564, 1999
- [14] D. Racusen, M. Foote, A major soluble Glycoprotein of Potato-Tubers, *Journal of Food Biochemistry* 4(1), 43-52, 1980
- [15] A. M. Pots, H. H. J. De Jongh, H. Gruppen, R. J. Hamer, A. G. J. Voragen, Heat-induced conformational changes of patatin, the major potato tuber protein, *European Journal of Biochemistry* 252(1), 66-72, 1998
- [16] W. D. Park, C. Blackwood, G.A. Mignery, M. A., Hermodson, R. M. Lister, Analysis of the Heterogeneity of the 40,000 Molecular Weight Tuber Glycoprotein of Potatoes by Immunological Methods and by NH₂-Terminal Sequence Analysis, *Plant Physiology* 71(1), 156-160, 1983
- [17] D. Racusen, Lipid Acyl Hydrolase of Patatin, *Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne de Botanique* 62(8), 1640-1644, 1984
- [18] H. J. H. B. Hirschberg, J. W. F. A. Simons, N. Dekker, M. R. Egmond, Cloning, expression, purification and characterization of patatin, a novel phospholipase A, *European Journal of Biochemistry* 268(19), 5037-5044, 2001
- [19] A. K. Allen, G. P. Bolwell, D. S. Brown, C. Sidebottom, A. R. Slabas, Potato lectin: A three-domain glycoprotein with novel hydroxyproline-containing sequences and sequence similarities to wheat-germ agglutinin, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 28(11), 1285-1291, 1996
- [20] R. Ulber, Biotechnologische Methoden zur effizienteren Rohstoffnutzung, *Habilitationsschrift Universität Hannover*, 2002
- [21] T. Morita, A. Ohashi, K. Takei, M. Ikai, S. Kasaoka, S. Kiriya, Cholesterol-lowering effects of soybean, potato and rice proteins depend on their low methionine contents in rats fed a cholesterol-free purified diet, *J. Nutrition* 127, 470-477, 1997
- [22] R. Liyanage, K. Han, S. Watanabe, K. Shimada, M. Sekikawa, K. Ohba, Y. Tokuyi, M. Ohnishi, Potato and Soy Peptide Diets Modulate Lipid Metabolism in Rats, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 72(4), 943-950, 2008

-
- [23] FAO/WHO Expert Consultation, Protein Quality Evaluation, Food and Agricultural Organization of the United Nations, *FAO Food and Nutrition Paper 51*, Rome, 1990
- [24] E. Renner, Milk and Dairy Products in Human Nutrition. *W-GmbH Volkswirtschaftlicher Verlag*, München, 90–130, 1983
- [25] European Dairy Association, Nutritional Quality of Proteins. *European Dairy Association*, Brüssel, 1997.
- [26] G. Schaafsma. The protein digestibility-corrected amino acid score, *J. Nutrition* 130(7),1865S-1867S, 2000
- [27] H. O. Jin, C. W. Song, T. M. Chang, W. Y. Chey, Roles of gut hormones in negative-feedback regulation of pancreatic exocrine secretion in humans, *Gastroenterology* 1007, 1828-1834, 1994
- [28] A. J. Hill, S. R. Peikin, C. A. Ryan, J. E. Blundell, Oral Administration of Proteinase Inhibitor II From Potatoes Reduces Energy Intake in Man, *Physiology and Behavior* 48, 241-246, 1990
- [29] Kartoffelprotein F7020, *Produktspezifikation 03 2006-02-07*, Emsland-Stärke GmbH, Emlichheim/Deutschland
- [30] <http://www.solanic.eu/>, 17.02.2010
- [31] H. Meisel, R. J. FitzGerald, Biofunctional peptides from milk proteins: mineral binding and cytomodulatory effects. *Curr. Pharm. Des.* 9(16), 1289-1295, 2003
- [32] J. Otte, S. M. A. Shalaby, Fractionation and identification of ACE-inhibitory peptides from [alpha]-lactalbumin and [beta]-casein produced by thermolysin-catalysed hydrolysis, *International Dairy Journal* 17(12), 1460-1472, 2007
- [33] T. Yasuyuki, M. Yoshikawa, Introduction of enterostatin (VPDPR) and a related sequence into soybean proglycinin AlaB1b subunit by site directed mutagenesis, *Biosci. Biotech. Biochem.* 64, 2731–2733, 2000
- [34] K. Hermansen, M. Sondergaard, L. Hoie, M. Carstensen, B. Brock, Beneficial effects of a soy-based dietary supplement on lipid levels and cardiovascular risk markers in type 2 diabetic subjects, *Diabetes Care* 24, 228–233, 2001
- [35] H. Fujita, M. Yoshikawa, LKPNM: a prodrug-type ACE-inhibitory peptide derived from fish protein, *Immunopharmacology* 44,123–127, 1999

-
- [36] K. Arihara, Y. Nakashima, T. Muka, S. Ishikawa, M. Itoh, Peptideinhibitors for angiotensin I-converting enzyme from enzymatic hydrolysates of porcine skeletal muscle proteins, *Meat Sci.* 57, 319–324, 2001
- [37] A. Moure, H. Domínguez, J. C. Parajó, Antioxidant properties of ultrafiltration-recovered soy protein fractions from industrial effluents and their hydrolysates, *Process Biochem.* 41, 447–456, 2006
- [38] J. Wu, X. Ding, Hypotensive and physiological effect of angiotensin converting enzyme inhibitory peptides derived from soy protein on spontaneously hypertensive rats, *J. Agric. Food Chem.* 49, 501–506, 2001
- [39] R. Hartmann, H. Meisel, Food-derived peptides with biological activity: from research to food applications, *Current Opinion in Biotechnology* 18, 163–169, 2007
- [40] H. Korhonen, A. Pihlanto, Food-derived bioactive peptides--opportunities for designing future foods, *Curr. Pharm. Des.* 9(16), 1297-1308, 2003
- [41] O. Mellander, The physiological importance of the casein phosphopeptide calcium salts. II. Peroral calcium dosage of infants, *Acta Soc. Med. Ups.* 55(5-6), 247-255, 1950
- [42] N. P. Shah, Effects of milk-derived bioactives: an overview, *British Journal of Nutrition* 84, 3-10, 2000
- [43] A. Mercier, S. F. Gauthier, I. Fliss, Immunomodulating effects of whey proteins and their enzymatic digests, *Int. Dairy J.* 14, 175–183, 2004
- [44] H. Kayser, H. Meisel, Stimulation of human peripheral blood lymphocytes by bioactive peptides derived from bovine milk proteins, *FEBS Lett.* 383, 18–20, 1996
- [45] G. Linden, D. Lorient, *New Ingredients in Food Processing*, CRC Press INC, 1999
- [46] C. Prugger, P. Heuschmann, U. Keil, Epidemiologie der Hypertonie in Deutschland und weltweit, *Herz* 31, 287–293, 2006
- [47] R. J. FitzGerald, B. A. Murray, D. J. Walsh, Hypotensive peptides from milk proteins, *The Journal of Nutrition* 134, 980–988, 2004
- [48] J. Dziuba, M. Niklewicz, A. Iwaniak, M. Darewicz, P. Minkiewicz, Bioinformatic-aided prediction for release possibilities of bioactive peptides from plant proteins, *Acta Alimentaria* 33, 227–235, 2004

-
- [49] A. Pihlanto, H. Korhonen, Bioactive peptides and proteins, *Advances in food and nutrition research* 47, 175–276, 2003
- [50] H. Matsufuji, T. Matsui, S. Ohshige, T. Kawasaki, K. Osajima, Y. Osajima, Antihypertensive effects of angiotensin fragments in SHR, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 59(8), 1398-1401, 1995
- [51] T. Kawasaki, E. Seki, K. Osajima, M. Yoshida, K. Asada, T. Matsui, Y. Osajima, Antihypertensive effect of valyl-tyrosine, a short chain peptide derived from sardine muscle hydrolyzate, on mild hypertensive subjects, *J. Hum. Hypertens.* 14(8), 519-523, 2000
- [52] M. Sipola, P. Finckenberg, J. Santisteban, R. Korpela, H. Vapaatalo, M. L. Nurminen, Long-term intake of milk peptides attenuates development of hypertension in spontaneously hypertensive rats, *J. Physiol. Pharmacol.* 52(4Pt2), 745-754, 2001
- [53] A. Pihlanto, S. Akkanen, H. J. Korhonen, ACE-inhibitory and antioxidant properties of potato (*Solanum tuberosum*), *Food Chemistry* 109, 104–112, 2008
- [54] R. J. FitzGerald, H. Meisel, Milk protein-derived peptide inhibitors of angiotensin-I-converting enzyme, *British Journal of Nutrition* 84(S1), 33-37, 2000
- [55] H. M. Chen, K. Muramoto, F. Yamauchi, K. Fujimoto, K. Nokihara, Antioxidative properties of Histidine-Containing Peptides Designed from Peptide Fragments Found in the Digests of a Soybean Protein, *J. Agric. Food Chem.* 46(1), 49–53, 1998
- [56] Y. Okada, M. Okada, Scavenging effect of water soluble proteins in broad beans on free radicals and active oxygen species, *J. Agric. Food Chem.* 46,401–406, 1998
- [57] K. Suetsuna, H. Ukeda, H. Ochi, Isolation and characterization of free radical scavenging activities peptides derived from casein, *J. Nutritional Biochem.* 11,128–131, 2000
- [58] A. Pihlanto, Antioxidative peptides derived from milk proteins, *International Dairy Journal* 16, 1306–1314, 2006
- [59] S. K. Kim, Y. T. Kim, H. G. Byun, K. S. Nam, D. S. Joo, F. Shahidi, Isolation and characterization of antioxidative peptides from gelatin hydrolysate of Alaska pollack skin, *J. Agric. Food Chem.* 49, 1984–1989, 2001

-
- [60] A. Davalos, M. Miguel, B. Bartolome, R. Lopez-Fandino, Antioxidant activity of peptides derived from egg white proteins by enzymatic hydrolysis, *Journal of Food Protection* 67, 1939–1944, 2004
- [61] H. Chiue, T. Kusano, K. Iwami, Antioxidative activity of barley hordein and its loss by deamidation. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology* 43, 145-154, 1997
- [62] L. L. Wang, Y. L. Xiong, Inhibition of lipid oxidation in cooked beef patties by hydrolyzed potato protein is related to its reducing and radical scavenging ability, *J. Agric. Food Chem.* 53, 9186–9192, 2005
- [63] D. Q. Jin, B. C. Park, J. S. Lee, H. D. Choi, Y. S. Lee, J. H. Yang, J. A. Kim, Mycelial extract of *Cordyceps ophioglossoides* prevents neuronal cell death and ameliorates b-amyloid peptide-induced memory deficits in rats, *Biological and Pharmacological Bulletin* 27, 1126–1129, 2004
- [64] K. B. Beckman, B. N. Ames, The free radical theory of aging matures, *Physiological Reviews* 78, 547–581, 1998
- [65] R. J. Waddington, R. Moseley, G. Embery, Reactiveoxygen species: A potential role in the pathogenesis ofperiodontal diseases, *Oral Diseases* 6, 187–190, 2000
- [66] S. H. Marshall, Antimicrobial peptides: A natural alternative to chemical antibiotics and a potential for applied biotechnology, *Electronic Journal of Biotechnology* 6(2), 2003
- [67] W. Broekaert, B. Cammue, M. de Bolle, K. Thevissen, G. de Samblanx, R. Osborn, Antimicrobial peptides from plants, *Critical Reviews in Plant Sciences* 16(3), 297-323, 1997
- [68] W. Bellamy, M. Takase, K. Yamauchi, H. Wakabayashi, K. Kawase, M. Tomita, Identification of bactericidal domain of lactoferrin, *Biochimica et Biophysica Acta* 1121, 130-136, 1992
- [69] Y. Hata, M. Yamamoto, H. Ohni, K. Nakajima, Y. Nakamura, T. Takano, A placebo-controlled study of the effect of sour milk on blood pressure in hypertensive subjects, *American Journal of Clinical Nutrition* 64, 767–771, 1996
- [70] E. O. Strolle, J. R. Cording, N. C. Aceto, Recovering potato proteins coagulated by steam injection heating, *J. Agric. Food Chem.* 21, 974-977, 1973

-
- [71] D. Knorr, G. O. Kohler, A. A. Betschart, Potato protein concentrates: the influence of various methods of recovery upon yield, compositional and functional characteristics, *J. Food Process. Preserv.* 1, 235-246, 1977
- [72] J. W. Finley, E. Hautala, Recovery of soluble proteins from waste streams, *Food Product Development* 10, 92-93, 1976
- [73] E. Meister, N. R. Thomson, Protein quality of precipitate from waste effluent of potato chip processing measured by biological methods, *J. Agric. Food Chem.* 24, 919-923, 1976
- [74] D. Knorr, Effect of recovery methods on yields, quality and functional properties of potato protein concentrates, *J. Food Sci.* 45, 1183-1186, 1980
- [75] D. Knorr, Effects of recovery methods on the functionality of protein concentrates from food processing wastes, *J. Food Process. Eng.* 5, 215-230, 1982
- [76] I. Ahlden, G. Trägård, *Food Chem.* 44, 113-118, 1992
- [77] J. E. Kinsella, *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 7, 1076, 219-280
- [78] F. Holm, S. Eriksen, A new system for the production of starch and protein from potato, *J. Food Technol.* 15, 71-83, 1980
- [79] G. A. Van Koningsveld, H. Gruppen, H. H. J. De Jongh, G. Wijngaards, M. A. J. S. Van Bockel, P. Walstra, A. G. J. Voragen, The solubility of potato proteins from industrial potato fruit juice as influenced by pH and various additives, *J. Sci. Food Agric.* 82, 134-142, 2001
- [80] J. M. Gonzalez, J. B. Lindamood, N. Desai, Recovery of protein from potato plant waste effluents by complexation with carboxymethylcellulose, *Food Hydrocolloids* 4, 355-363, 1991
- [81] P. Lindner, R. Keren, I. Ben-Gera, Precipitation of proteins from potato juice with bentonite, *J. Sci. Food Agric.* 32, 1177-1182, 1981
- [82] M. Boruch, J. Makowski, M. Wachowicz, Energy-saving method for obtaining protein from potato juice, *Acta Alimentari Polonica* 15, 253-260, 1989
- [83] I. Wojnowska, S. Poznanski, W. Bednarski, Processing of potato protein concentrates and their properties, *J. Food Sci.* 47, 167-172, 1981
- [84] S. Eriksen, Protein nutritional quality of air classified potato fractions, *J. Food Sci.* 46, 540-542, 1981

-
- [85] T. Scheper, O.-W. Reif, *Angewandte Mikrobiologie* (Ed: G. Antranikian) *Springer-Verlag*, 430-445, Berlin 2006
- [86] S. Fischer-Frühholz, Membranadsorber, *GIT Fachzeitschrift für das Laboratorium* 6, 603, 2004
- [87] S. Fischer-Frühholz, Membranadsorber, *GIT Fachzeitschrift für das Laboratorium* 9, 1, 2004
- [88] D. Harkensee, Ö. Kökpinar, J. Walter, C. Kasper, S. Beutel, O. Reif, T. Scheper, R. Ulber; Fast Purification for Proteins Using Membrane Adsorber Modules; Eng. Life Science; *Eng. Life Sci.* 7, 388-394, 2007
- [89] O. Kökpinar et al., *Chem. Ing. Tech.* 80(6), 861, 2008
- [90] K. Suck et al. *J. Biotechnol.* 121(3), 361, 2006
- [91] J. Schwarz, Downstream-Processing und Biotransformation von nachwachsenden Rohstoffen, *Dissertation Universität Hannover*, 2006.
- [92] K. Plate et al., *J. Chromatogr. A* 1117(1), 81, 2006
- [93] P. Riechel et al., *J. Chromatogr. A* 817(1-2), 187, 1998
- [94] A. M. Pots, E. ten Grotenhuis, H. Gruppen, A. G. J. Voragen, K. G. de Kruif, Thermal Aggregation of Patatin Studied in Situ, *J. Agric. Food Chem.* 47, 4600-4605, 1999
- [95] J. Broadhead, S. K. E. Rouan, C. T. Rhodes, The spray drying of pharmaceuticals, *Drug Development and Industrial Pharmacy* 18, 1169-1206, 1992
- [96] K. Masters, Spray drying. The unit operation today, *Industrial and Engineering Chemistry* 60, 53-63, 1968
- [97] K. Sattler, Thermische Trennverfahren, 3. Auflage, *Wiley-VCH*, Weinheim 2001
- [98] D. S. Shah, Spray dryers. Applications, *Chemical Industry Developments* 7, 39-45, 1973
- [99] <http://www.buchi.com>, *Schulungsunterlagen*, Fa. Büchi GmbH, Essen/Deutschland, 28.01.2010
- [100] F. Franks, Improved freeze-drying: from empiricism to predictability, *Cryo. Letters* 11, 93-110, 1990
- [101] PIERCE Modified Lowry Protein Assay Kit, 23240 *product information*
- [102] FAO/WHO/UNU, Energy and protein requirements. Report of a joint FAO/WHO/UNU expert consultation, *Technical report series no. 724*, World Health Organization, Geneva 1985.

-
- [103] J. Zawistowski, C. G. Biliaderis, N. A. M. Eskin, Polyphenol oxidases. In Oxidative enzymes in foods; D. S. Robinson, N. A. M. Eskin, Eds.; *Elsevier*, London 1991.
- [104] E. C. Sisler, H. J. Evans, A comparison of Chlorogenic acid and Catechol as Substrates for the polyphenol oxidase from Tobacco and Mushroom, *Plant Physiology* 33, 255- 257, 1958
- [105] M. Lee, I. Park, Inhibition of potato polyphenol oxidase by Maillard reaction products. *Food Chemistry*. 91, 57–61, 2005
- [106] S. Dogan, P. Turan, M. Dogan, M. Alkan, O. Arslan, Inhibition kinetics of polyphenol oxidase by Glutamic acid, *Eur. Food Res. Technol.* 225, 67- 73, 2007
- [107] R. N. Gacche, S. C. Warangkar, V. S. Ghole, Glutathione and Cinnamic Acid - Natural Dietary Components Used in Preventing the Process of Browning by Inhibition of Polyphenol Oxidase in Apple Juice, *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* 19(2), 175-179, 2004
- [108] S. Patil, M. Zucker, Potato Phenolases. *The Journal of Biological Chemistry*, 240(10), 3938- 3943, 1965
- [109] A. M. Mayer, E. Harel, Phenol oxidases in fruit and vegetables, In Food Enzymol. P. F. Fox (Ed.), *Elsevier*, 253-272, London 1991
- [110] M. Friedman, F. F. Bautista, Inactivation of polyphenol oxidase by thiols in the absence and presence of potato tissue suspensions. *J. Agric. Food Chem.* 43, 69-76, 1985
- [111] S. L. Taylor, Why sulfite alternative?, *Food Technol.* 47, 14-18, 1993
- [112] W. Baltes, Lebensmittelchemie, 5. Auflage, *Springer-Verlag*, Berlin-Heidelberg-New York 2000
- [113] B. Keil, Specificity of proteolysis. *Springer-Verlag*, 335, Berlin-Heidelberg-New York 1992
- [114] P. J. Sweeney, J. M. Walker, Enzymes of Molecular Biology, M. M. Burrell ed., *Humana Press*, 290-291, Totowa/NJ 1993
- [115] Z. Bohak, *J. Biol. Chem.* 244, 4638-4648, 1969
- [116] A. P. Ryle, *Methods in Enzymol.* 19, 316-336, 1970
- [117] W. Pschyrembel, Klinisches Wörterbuch mit klinischen Syndromen und Nomina Anatomica, 256. Auflage, *Walter de Gruyter*, Berlin - New York 1990
- [118] PIERCE Coomassie Plus, the Bradford assay kit, 23236 product information

-
- [119] P. M. Nielsen, D. Petersen, C. Dambmann, Improved Method for Determining Food Protein Degree of Hydrolysis, *Journal of Food Science* 66(5), 642-646, 2001
- [120] V. Fogliano, V. Verde, G. Randazzo, A. Ritieni, *J. Agric. Food Chem.*, 47, 1035-1040, 1999
- [121] N. Pellegrini, M. Serafini, B. Colombi, D. Del Rio, S. Salvatore, M. Bianchi, F. Brighenti, *J. Nutr.* 133, 2812–2819, 2003
- [122] B. Ou, M. Hampsch-Woodill, R. L. Prior, Development and Validation of an Improved Oxygen Radical Absorbance Capacity Assay Using Fluorescein as the Fluorescent Probe, 2001
- [123] A. Dávalos, C. Gómez-Cordovés, B. Bartolomé, Extending Applicability of the Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC. Fluorescein) Assay, *J. Agric. Food Chemistry* 52, 48-54, 2004
- [124] V. Vermeirssen, A. van der Bent, J. Van Camp, A. van Amerongen, W. Verstraete, A quantitative in silico analysis calculates the angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory activity in pea and whey protein digests, *Biochimie* 86, 231–239, 2004
- [125] M. Kuba, C. Tana, S. Tawata, M. Yasuda, Production of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides from soybean protein with *Monascus purpureus* acid proteinase, *Process Biochemistry* 40, 2191–2196, 2005
- [126] G. Li, H. Liu, Y. Shi, G. Le, Direct spectrophotometric measurement of angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity for screening bioactive peptides, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 37, 219–224, 2005
- [127] M. Miguel, M. M. Contreras, I. Recio, A. Aleixandre, ACE-inhibitory and antihypertensive properties of a bovine casein hydrolysate, *Food Chemistry* 112, 211–214, 2009
- [128] E. M. Jones, A. Smart, G. Bloomberg, L. Burgess and M. R. Millar, Lactoferricin, a new antimicrobial peptide, *Journal of Applied Bacteriology* 77, 206-214, 1994
- [129] Wen-Chi Hou, Hsien-Jung Chen, and Yaw-Huei Lin, Antioxidant Peptides with Angiotensin Converting Enzyme Inhibitory Activities and Applications for Angiotensin Converting Enzyme Purification, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51(6), 1706-1709, 2003

-
- [130]H. Gurer, R. Neal P. Yang, S. Oztezcan, N. Ercal, Captopril as an antioxidant in lead-exposed Fischer 344 rats, *Human Exp. Toxicol.* 18, 27–32, 1999
- [131]Bruker Daltonics, <http://www.bdal.de/>, 23.02.2010
- [132]I. Pepelanova, The Digestion of Functional Ingredients by Detergent Enzymes, *Master Thesis Leibniz Universität Hannover*, 2007