

Technische Universität München

**Lehrstuhl für Chemisch-Technische Analyse
und Chemische Lebensmitteltechnologie**

Anreicherung von Pflanzenproteinen mit Hilfe der adsorptiven Zerschäumung

Oliver Gschwendtner

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Brauwesen, Lebensmitteltechnologie
und Milchwissenschaft der Technischen Universität München zur Erlangung des
Akademischen Grades eines

Doktor-Ingenieur
(Dr.-Ing.)

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. K. Sommer

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. H. Parlar
2. apl. Prof. Dr. A. Görg

Die Dissertation wurde am 31.08.2000 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Brauwesen, Lebensmitteltechnologie und
Milchwissenschaft am 25.09.2000 angenommen.

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von März 1998 bis August 2000 am Lehrstuhl für Chemisch-Technische Analyse und Chemische Lebensmitteltechnologie in Zusammenarbeit mit dem Fachgebiet Proteomik der Technischen Universität München, in Freising/Weihenstephan angefertigt.

Herrn Prof. Dr. H. Parlar gilt mein besonderer Dank für die Überlassung des außerordentlich interessanten Themas, seine stete Diskussionsbereitschaft, seine wohlwollende und umfassende Unterstützung, insbesondere für die großzügige finanzielle Förderung.

Frau Prof. Dr. A. Görg, Leiterin des Fachgebietes Proteomik, spreche ich meinen verbindlichsten Dank aus für die ausgesprochen gute Zusammenarbeit sowie für die freundliche Übernahme des Koreferates.

Mein besonderer Dank gilt auch Herrn G. Boguth und Herrn Ch. Obermeier vom Fachgebiet Proteomik. Ihre fachlichen Kenntnisse und die umfassende Einarbeitung in die Elektrophorese haben wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Ferner danke ich Frau Dr. D. Angerhöfer für die wertvollen Hinweise und kritischen Ratschläge bei der Zusammenstellung der Ergebnisse und der Niederschrift der Arbeit.

Herrn Dr. G. Leupold, Arbeitsgruppenleiter, gilt mein Dank und meine Anerkennung für seine Unterstützung in fachlichen und technischen Angelegenheiten.

Des weiteren bin ich zu Dank verpflichtet:

Herrn Scholz für die prompte und präzise Anfertigung spezieller Glasapparaturen für die Zerschäumung.

Herrn Dr. K. Glas von der Staatlichen Brautechnischen Prüf- und Versuchsanstalt, da er auf unbürokratische Weise die Voraussetzung zur Erstellung der AAS-Analysen ermöglichte.

Den Herren Dipl.-Ing. P. Avendaño und Dipl.-Ing. A. Förg für ihre Kollegialität, stete Hilfsbereitschaft und das hervorragende Arbeitsklima.

Nicht zuletzt gilt mein aufrichtiger Dank meinen Eltern Hyazintha und Gerald Gschwendtner sowie meiner Schwester Ivonne Gschwendtner für das entgegengebrachte Vertrauen und die bereitwillige Unterstützung in den vergangenen Jahren.

GLIEDERUNG

	Seite
1 EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG	1
2 THEORETISCHER TEIL	4
2.1 Zerschäumung	4
<i>2.1.1 Vorgänge bei der Zerschäumung</i>	4
<i>2.1.2 Verfahren der Zerschäumung</i>	10
2.1.2.1 Apparaturen	11
2.1.2.2 Batch-Zerschäumungsverfahren	16
2.1.2.3 Kontinuierliche Zerschäumungsverfahren	18
2.1.2.4 Praktischer Einsatz der Verfahren	21
2.2 Zerschäumung von Proteinen	24
<i>2.2.1 Aufbau von Proteinschäumen</i>	24
<i>2.2.2 Bildung und Stabilisierung von Proteinschäumen</i>	27
<i>2.2.3 Verfahren zur Proteinanreicherung</i>	28
2.3 Kartoffelproteine	30
<i>2.3.1 Kartoffelinhaltsstoffe</i>	30
<i>2.3.2 Industrielle Verarbeitung</i>	33
<i>2.3.3 Schlempenentsorgung</i>	35
2.4 Proteinanalytik	36
<i>2.4.1 Quantitative Proteinbestimmungsmethoden</i>	36
<i>2.4.2 Gelelektrophoretische Trennmethode</i>	38

	Seite
3 MATERIAL UND METHODEN	42
3.1 Materialien und Geräte	42
3.1.1 <i>Materialien</i>	42
3.1.2 <i>Geräte und Hilfsmittel</i>	44
3.1.3 <i>Kartoffelproben</i>	44
3.2 Methoden	45
3.2.1 <i>Analyse von Kartoffelfruchtwasser und Kartoffelschlempe</i>	45
3.2.2 <i>Zerschäumung</i>	46
3.2.2.1 <i>Batch-Verfahren</i>	47
3.2.2.2 <i>Kontinuierliches Verfahren</i>	50
3.2.3 <i>Gesamtproteinbestimmung</i>	53
3.2.4 <i>Gelelektrophorese</i>	53
4 ERGEBNISSE	72
4.1 Zerschäumung von Referenzproteinen	72
4.1.1 <i>Einfluss der Konzentration auf die Proteinanreicherung</i>	72
4.1.2 <i>Einfluss der Gasflussgeschwindigkeit</i>	74
4.1.3 <i>Einfluss der Zugabe von NaCl</i>	76
4.1.4 <i>Einfluss der Zugabe von Fructose</i>	78
4.1.5 <i>Einfluss des pH-Wertes</i>	80
4.2 Zerschäumung von Kartoffelfruchtwasser	83
4.2.1 <i>Zusammensetzung des Fruchtwassers der Kartoffelproben</i>	83
4.2.1.1 <i>Proteinfraktionen</i>	83
4.2.1.2 <i>Weitere Inhaltsstoffe</i>	85

	Seite
<i>4.2.2 Batch-Zerschäumung</i>	86
4.2.2.1 Gesamtproteinanreicherung	86
4.2.2.2 Anreicherung einzelner Fraktionen	93
<i>4.2.3 Kontinuierliche Zerschäumung</i>	100
4.2.3.1 Gesamtproteinanreicherung	100
4.2.3.2 Anreicherung einzelner Fraktionen	105
4.3 Gesamtproteinanreicherung bei der Zerschäumung von Kartoffelschlempe	109
5 DISKUSSION	111
5.1 Zerschäumung von Referenzproteinen	111
5.2 Zerschäumung von Kartoffelfruchtwasser	113
<i>5.2.1 Zusammensetzung des Probenmaterials</i>	113
<i>5.2.2 Vergleich der Batch- mit der kontinuierlichen Zerschäumung</i>	116
<i>5.2.3 Selektive Anreicherung einzelner Proteinfractionen</i>	120
5.3 Praktischer Einsatz der Zerschäumung bei der Entproteinierung von Kartoffelschlempe	122
6 ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK	124
7 LITERATURVERZEICHNIS	127

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AAS:	Atomabsorptionsspektroskopie
DTT:	Dithiothreitol
Flot.:	Flotation
IEF:	isoelektrische Fokussierung
IPG:	immobilisierter pH-Gradient
IPG-Dalt:	zweidimensionale Elektrophorese mit immobilisierten pH-Gradienten
MGM:	Molekulargewichtsmarker
mod.:	modifiziert
n. d.:	nicht durchführbar
PAGE:	Polyacrylamidgelelektrophorese
pI:	isoelektrischer Punkt
SDS:	Natriumdodecylsulfat
var.:	Variation

1 EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG

Am 16. Oktober 1920 wurde vom Reichspatentamt eine Patentschrift für ein „Verfahren zum Verdampfen von Flüssigkeiten zum Zwecke der Anreicherung, Abscheidung oder Trocknung in ihnen gelöst oder emulgiert enthaltenen Stoffe durch Zerschäumung ...“ herausgegeben (*Ostwald, 1920*). Diese sogenannte Zerschäumung ist ein wenig bekanntes, jedoch vorteilhaftes Verfahren zur Anreicherung von oberflächenaktiven Substanzen (z. B. Proteine, Tenside) unter schonenden Bedingungen (*Ostwald und Siehr, 1936, 1937; Peters, 1952a; Lemlich, 1968, 1972; Maas, 1974; Uraizee und Narsimhan, 1990; Narsimhan und Uraizee, 1995*). Mit ihr können mit geringem apparativem Aufwand polare und unpolare Komponenten aus wässrigen Lösungen abgetrennt werden. Beispielsweise kann nicht nur Protein aus einer Einzelproteinlösung angereichert werden (*Ahmad, 1975; Britten und Lavoie, 1992; Liu et al., 1995*), sondern es könnten eventuell auch selektiv Proteine aus Mehrkomponentensystemen herausgeholt werden. Weitere Vorteile dieses Verfahrens sind niedrige Energie-, Investitions- und laufende Kosten sowie hohe Selektivität und Effektivität besonders in verdünnten Lösungen.

Die Zerschäumung gehört zu den adsorptiven Blasetrennmethoden (engl.: *adsorptive bubble separation methods*) (*Karger et al., 1967*), die eine Alternative zu den bisher bekannten wie Ultrafiltration, Gelfiltration, Ionenaustausch, Ausfällung und Koagulierung darstellen könnten, da in der Industrie ein Bedarf an kostengünstigen Verfahren besteht. Gerade für die Massenproduktion in der Industrie werden Verfahren gesucht, mit denen oberflächenaktive Substanzen, u. a. Proteine, aufkonzentriert und selektiv von anderen Substanzen gereinigt werden können (*Brown et al., 1999*).

In vielen Bereichen der Lebensmittelindustrie fallen große Mengen an Abfällen an, die noch Wertstoffe wie Proteine enthalten. Beispielsweise entstehen bei der industriellen Verarbeitung der Kartoffelknollen, z. B. in der Kartoffelstärkeindustrie und der Schnapsbrennerei, große Mengen an Kartoffelsaft mit einem Restproteingehalt von 0,1-0,2 %. Bisher wurden diese Proteine entweder als Tierfutter verwendet oder im Abwasser entsorgt (*Brown et al., 1990*). Hier wäre eine kostengünstige und effiziente Methode zur Anreicherung oder Isolierung der Proteine von großem ökologischen und ökonomischen Interesse. Die starke Anpassungsfähigkeit der Kartoffel an Temperatur und Tageslänge zusammen mit ihrem besonderen ernährungsphysiologischen Wert macht sie zu einer der am weitesten verbreiteten Kulturpflanzen (*Knorr,*

1978). In Verbindung mit anderen Proteinen (z. B. Ei) spielen Kartoffelproteine in der menschlichen Ernährung eine wichtige Rolle (*Stegemann, 1978*). Die Aminosäurezusammensetzung ist ausgewogener als bei den meisten Getreide- und Gemüsesorten, und die Qualität der Proteine steht der aus Vollei in nichts nach (*Knorr, 1977, 1978, 1980*). Über die Zusammensetzung der Proteine im Kartoffelfruchtwasser bzw. in der Kartoffelschlempe gibt es allerdings kaum Untersuchungen.

Aus solchen Resten wiedergewonnene Proteine könnten bei der Herstellung proteinreicher Nahrungsmittel eingesetzt werden. Ebenso könnten bestimmte, mittels Zerschäumung erhaltene Proteinfractionen zur Ernährung bestimmter Altersgruppen, welche eine auf ihre Bedürfnisse angepasste Ernährung und damit Proteinzusammensetzung benötigen (altersgerechte Ernährung), verwendet werden. Weitere Einsatzgebiete wären die Nahrungs- und Düngemittelindustrie. Bestimmte, mit der Zerschäumung erhaltene Proteinfractionen könnten auch als Basis für Klebstoffe oder evtl. in der Medizin für hypoallergene Wundpflaster, dienen. Außerdem würde die Wiedergewinnung von Proteinfractionen aus Abwässern die Umweltbelastung reduzieren und einen wesentlichen Beitrag zum Umweltschutz in der Nahrungsmittelindustrie liefern. Hier könnte die Zerschäumung zur quantitativen Wiedergewinnung der Proteine dienen.

Obwohl dieses Verfahren seit 1920 bekannt ist, wurden die bisher entwickelten Apparaturen und Verfahren noch nicht ausreichend optimiert. Beispielsweise sollten die Möglichkeiten eines kontinuierlichen Betriebs einer Zerschäumungsanlage untersucht werden. Vor allem aber fehlen noch umfassende und zusammenhängende Untersuchungen zum Einfluss verschiedener Parameter (Gasflussgeschwindigkeit, Konzentration, Fremdstoffeinfluss u. a.) auf die Anreicherung von oberflächenaktiven Substanzen. Am dringendsten wären Arbeiten über die pH-abhängige, selektive Anreicherung bestimmter Proteinfractionen, da der pH-Wert für das Verhalten der Proteine von essentieller Bedeutung ist. Wegen der Vielzahl von Einflussfaktoren müssen die einzelnen Parameter separat variiert und ihre Auswirkung auf die Proteinanreicherung und -fraktionierung analysiert werden. Die technische Optimierung muss durch eine sowohl qualitative wie auch quantitative Analyse der erhaltenen Proben abgesichert werden. Hierzu bieten sich Methoden an wie beispielsweise SDS-PAGE, hochauflösende 2 D-Gelelektrophorese, Kapillarelektrophorese, Photometrie, HPLC und Atomabsorptionsspektroskopie (AAS).

Auf diese Weise kann ein Überblick über das Verhalten der einzelnen Fraktionen während einer Zerschäumung gewonnen werden, insbesondere über An- und Abreicherung von Inhaltsstoffen im Schaum und in der zurückbleibenden Restflüssigkeit. Nur so lässt sich beurteilen, ob, in welchem Umfang und bei welchen Matrices bzw. Inhaltsstoffen die Zerschäumung angewendet werden kann.

Aus den oben geschilderten offenen Fragen ergeben sich eine ganze Reihe möglicher Aufgabenstellungen. Von diesen wurde als Schwerpunkt die Untersuchung spezifischer Parameter der Zerschäumung am Beispiel von Kartoffelfruchtwasser als Modelllösung ausgewählt. Speziell sollte mit Hilfe der Zerschäumung untersucht werden, inwieweit die Proteine im Schaum angereichert oder eventuell auch fraktioniert werden könnten. Die Untersuchungen hierzu sollten mittels SDS-PAGE bzw. hochauflösender 2 D-Gelelektrophorese durchgeführt werden.

In einem ersten Schritt sollte anhand der Referenzproteine Rinderhämoglobin und Rinderalbumin das Zerschäumungsverfahren optimiert werden. Hierbei sollten die Einflüsse der Parameter Konzentration, Gasflussgeschwindigkeit, Zugabe von D-Fructose und NaCl sowie pH-Wert untersucht werden. Im zweiten Schritt sollte frisch hergestelltes Kartoffelfruchtwasser hinsichtlich seiner Zusammensetzung charakterisiert werden. Im dritten Teil sollte dann das Zerschäumungsverfahren auf das Kartoffelfruchtwasser angewendet werden. Betrachtet werden sollte hierbei neben der Gesamtproteinanreicherung auch eine selektive Anreicherung bestimmter Proteinfractionen. Dabei sollten Erkenntnisse über das Proteinanreicherungsoptimum und das Verhalten bestimmter Proteinfractionen gewonnen werden. Zusätzlich sollten diese Laborversuche Aufschluss über die Möglichkeiten einer Anwendung im Pilot- oder eventuell industriellen Maßstab geben. Abschließend sollte dann am Beispiel einer Kartoffelschlempe aus Brennereirückständen der Versuchs- und Lehrbrennerei Freising-Weihenstephan die Anwendbarkeit der Zerschäumung auf reale Abfalllösungen getestet werden.

2 THEORETISCHER TEIL

2.1 Zerschäumung

2.1.1 Vorgänge bei der Zerschäumung

Die Zerschäumung gehört zu den adsorptiven Blasentrennmethoden (engl.: *adsorptive bubble separation methods*). In Tabelle 2.1 sind die einzelnen Techniken zusammengestellt. Strenggenommen ist der Begriff adsorptiv im Zusammenhang mit der Zerschäumung zwar falsch gewählt, da es sich auf der molekularen Ebene nicht um eine Adsorption, sondern um eine Einlagerung in eine Schicht oberflächenaktiver Substanzen an der Grenzfläche Gas/Flüssigkeit (Grenzschicht) handelt. Trotzdem hat sich der Begriff Adsorption in diesem Zusammenhang in der Fachliteratur eingebürgert. Deshalb wird er auch in allen nachfolgenden Textstellen in diesem Sinne verwendet.

Tab. 2.1: Zusammenfassung der verschiedenen Zerschäumungstechniken

Technik	Prinzip	Abzutrennende Stoffe
Schaum-Flotation (froth flotation)	Oberbegriff für die Abtrennung molekularer oder ionisierter Stoffe (<i>Mahne, 1971</i>).	Molekulare und ionisierte Stoffe
Flüssig-Sublation (solvent sublation)	Oberflächenaktive Stoffe werden in die darüberliegende Schicht nichtflüchtiger, organischer Bestandteile in der Grenzschicht der aufsteigenden Blasen in der Zerschäumungssäule transportiert (<i>Sebba, 1962; Mahne, 1971; Sheu und Huang, 1987; Cheng und Hunag, 1988</i>).	Organische Komponenten
Blasen-Fraktionierung (bubble fractionation)	Abzutrennende Teilchen werden gelöst und mit den Gasbläschen abtransportiert (<i>Lemlich, 1968, 1972a, b; Maas, 1969</i>)	Verschiedene Substanzen
Mineral-Flotation (mineral flotation)	Zugabe spezifischer Chemikalien in die Flüssigkeit, welche die Mineralien an Luftblasen heften (<i>Mahne, 1971</i>)	Mineralische Partikel
Präzipitat-Flotation	Entfernung verschiedener Ionen aus stark	Verschiedene Ionen

Tab. 2.1: Fortsetzung

Technik	Prinzip	Abzutrennende Stoffe
(precipitate flotation)	verdünnten Flüssigkeiten durch einen Überschuss an $\text{Fe}(\text{OH})_3$ (<i>Lemlich, 1968, 1972a, b</i>).	
Kolloid-Flotation (colloid flotation)	Gleiches Prinzip wie die Präzipitat-Flotation. Der Unterschied liegt in der Größe der abzutrennenden Partikel (<i>Pinfeld, 1970, Somasundaran, 1972</i>).	Verschiedene Ionen
Adsorbierende Kolloid-Flotation (adsorbing colloid flotation)	Adsorption von gelösten Stoffen an kolloidalen Partikeln (<i>Sheu und Huang, 1987; Cheng und Huang, 1988</i>).	Gelöste Materialien
Ionen-Flotation (ion flotation)	Ionen können in der ionischen Form oder als Komplex abgetrennt werden (<i>Hofman, 1968; Pinfeld, 1970</i>).	Anorganische Ionen
Mikro-Flotation (microflotation)	Entfernung von Mikroorganismen (<i>Pinfeld, 1970; Somasundaran, 1972</i>).	Mikroorganismen
Makro-Flotation (macroflotation)	Abtrennen durch Anheften an Schaumblasen (<i>Lemlich, 1968, 1972a, b</i>).	Mikroorganismen, Kolloide
Erz-Flotation (ore flotation)	Selektives Anheften der Erzpartikel an die Schaumblasen (<i>Lemlich, 1968, 1972a, b</i>).	Erzpartikel
Molekular-Flotation (molecular flotation)	Durch den Einsatz eines oberflächenaktiven Stoffes entsteht ein unlösliches Produkt, welches abgetrennt werden kann (<i>Lemlich, 1968, 1972a, b</i>).	Oberflächeninaktive Moleküle
Zerschäumung (foam fractionation)	Oberflächenaktive Substanzen bilden einen Schaum und reichern sich in ihm an	oberflächenaktive Substanzen

Die Einordnung der Zerschäumung in diese Verfahren ist Abbildung 2.1 zu entnehmen.

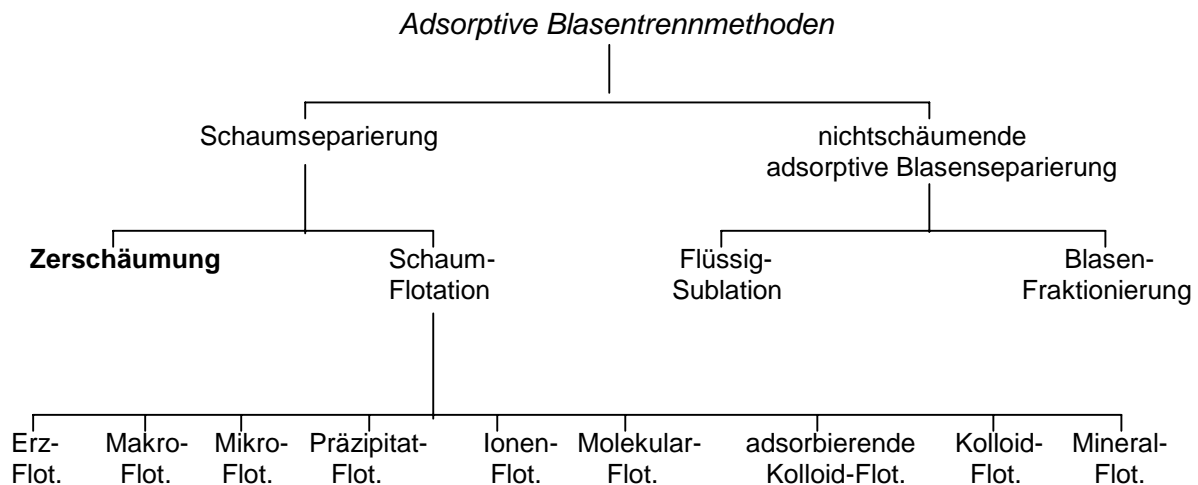


Abb. 2.1: Einordnung der Zerschäumung in die adsorptiven Blasen-trennmethode

Oberflächenaktive Substanzen besitzen einen polaren, wasserlöslichen und einen unpolaren, wasserunlöslichen Teil. An einer Gasblase, die in einer Flüssigkeit aufsteigt, lagern sich diese oberflächenaktiven Moleküle in der Grenzfläche Gas-Flüssigkeit so zusammen, dass der hydrophile Teil in der wässrigen Phase bleibt, der hydrophobe Teil jedoch in die unpolare Gasphase hineinragt (*Lemlich, 1972c*). Durch diesen Vorgang wird die Oberflächenspannung herabgesetzt und die Entstehung eines Schaums ermöglicht (*Maas, 1974*). Im Schaum selber laufen dann weitere Vorgänge ab, durch die eine Anreicherung oberflächenaktiver Substanzen ermöglicht wird. Abbildung 2.2 gibt einen Überblick über Austauschvorgänge zwischen Flüssigkeit und Gas in der Zerschäumungssäule.

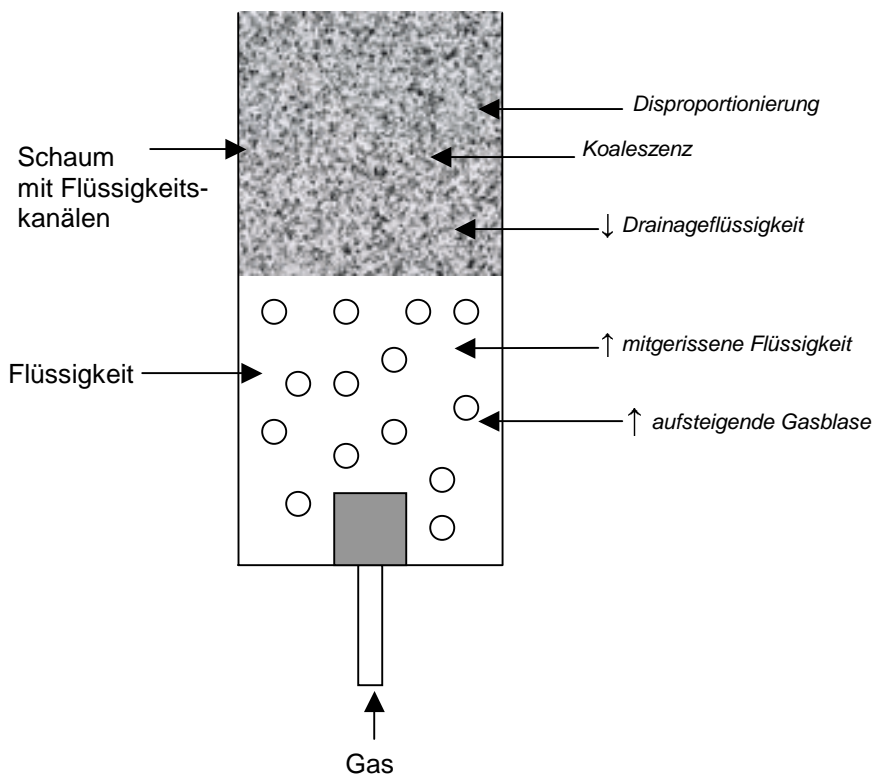


Abb. 2.2: Schematische Darstellung der Vorgänge während der Zerschäumung (Uraizee und Narsimhan, 1995a)

Die Flüssigkeit fließt auf Grund der Schwerkraft in den kapillaren Kanälen zwischen den Schaumblasen nach unten (Abbildung 2.3). Dieser Vorgang wird als Drainage bezeichnet. Dabei wirkt die Schwerkraft auf zwei Arten auf die Flüssigkeit: direkt auf die Schaumblase und indirekt durch den Sog der Kanäle. Die Grenzfläche (Flüssigkeit-Gas) verweilt nahezu regungslos. Dies bedeutet, dass die Flüssigkeit so abfließt, als befände sie sich zwischen zwei parallelen, festen Wänden (Prins, 1988).

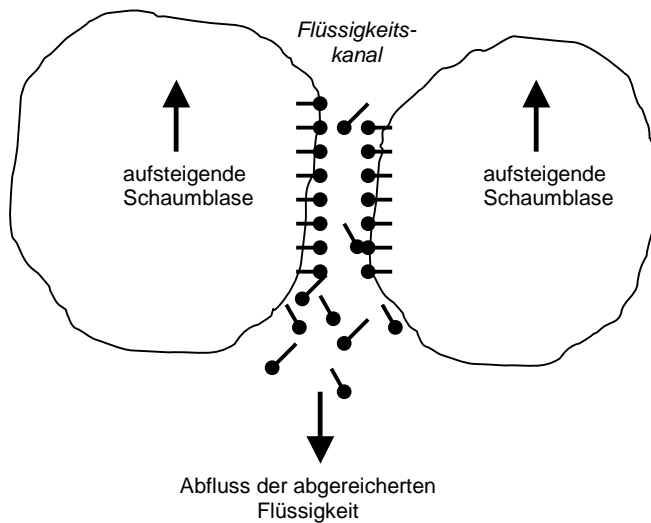


Abb. 2.3: Schematische Darstellung der Erhöhung der in der Grenzschicht vorhandenen Menge an oberflächenaktiven Substanzen während der Zerschäumung durch Drainage

Der sehr nasse Schaum im unteren Bereich der Säule ist mit einer großen Menge an Ausgangslösung beladen. Beim Aufsteigen des Schaums in der Säule fließt der Überschuss der auf Grund der Filmbildung abgereicherten Flüssigkeit durch die Kanäle ab. Dadurch wächst der relative Anteil an oberflächenaktiven Substanzen in den oberen Bereichen der Schaumsäule (Grieves, 1982). Eine weitere Verstärkung der Anreicherung dieser Substanzen ergibt sich aufgrund der folgenden Phänomene:

1. Vereinigung kleiner Blasen mit größerem Innendruck zu größeren Blasen,
2. Koaleszenz, d. h. Zusammenschluss zweier großer Blasen, und
3. teilweisem Zerfall des Schaums. Dabei fließt angereicherter kollabierter Schaum (Kollabat) durch den aufsteigenden Schaum in den unteren Teil der Säule zurück (Abbildung 2.4).

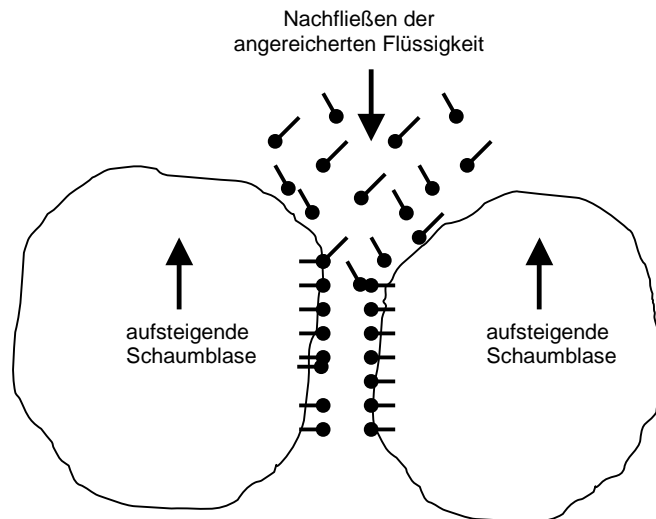


Abb. 2.4: Schematische Darstellung der Erhöhung der in der Grenzschicht vorhandenen Menge an oberflächenaktiven Substanzen während der Zerschäumung durch kollabierten Schaum

Die vorhandenen oberflächenaktiven Moleküle können nun nichtbesetzte Positionen in der Grenzschicht belegen. Dieser erwünschte Effekt durch internen Schaumrückfluss kann durch zusätzliche Rückführung des aus der Säule ausgetretenen und zerstörten Schaums (Foamat) in die Schaumsäule gesteigert werden (Grieves, 1982).

Die Koaleszenz, d. h. die Vereinigung zweier benachbarter Schaumblasen, bringt eine Verkleinerung der Phasengrenzfläche mit sich, denn im Verhältnis zum Volumen hat die neue Blase eine kleinere Oberfläche. Das bedeutet, dass innerhalb des stabilisierenden Films um die entstandene Blase eine Kompression durch die große Menge an oberflächenaktiver Substanz entsteht, falls das überschüssige Filmmaterial nicht an die Lösung abgegeben werden kann. Der Film setzt dieser Kompression einen Widerstand entgegen, der zu einer Wiederherstellung der kleineren Blasen führen und weiterer Koaleszenz entgegenwirken kann. Zurückströmendes Filmmaterial wird dann erneut eingelagert (Grieves, 1982). Ein Nebeneffekt der Koaleszenz ist die Verstärkung der Drainage, da bei größeren Schaumblasen die Flüssigkeit im Schaum besser abfließen kann (Rand und Kraynik, 1983).

2.1.2 Verfahren der Zerschäumung

Die Zerschäumung ist eine adsorptive Trenntechnik, mit der oberflächenaktive Substanzen mit Hilfe von Gasblasen aus einer Lösung entfernt werden können (Maas, 1974). Das Einleiten eines inerten Gases (z. B. N_2) bewirkt, dass die in der Flüssigkeit enthaltenen oberflächenaktiven Substanzen sich auf Grund ihrer polaren bzw. unpolaren Gruppen in der Grenzschicht zwischen Gas und Flüssigkeit anordnen und so einen Film bilden, der zur Blasen- und Schaumentstehung führt. Während der so entstandene Schaum im Zerschäumungsapparat (Abbildung 2.5) aufsteigt, nimmt der in ihm enthaltene Flüssigkeitsanteil durch Drainage ab. Entsprechend bildet der aufgestiegene Schaum nach seinem Zerfall eine mit oberflächenaktiven Substanzen angereicherte Lösung.



Abb. 2.5: Prinzip einer Zerschäumungsapparatur

Zur Zerschäumung von oberflächenaktiven Substanzen kann aus einer Anzahl unterschiedlicher Verfahren ein der jeweiligen Probe angepasstes gewählt werden. Maßgebend sind die Ziele der Fraktionierung, wie die anzureichernde Substanz, der

erforderliche Anreicherungsgrad oder die Trennschärfe und das Volumen der zu zerschäumenden Lösung. Diskontinuierliche Verfahren, allgemein als Batch-Zerschäumungsverfahren bezeichnet, werden zur Fraktionierung kleinerer, festgelegter Volumina an Ausgangslösung eingesetzt. Dagegen eignen sich kontinuierliche Verfahren, wenn große Mengen an Flüssigkeit zerschäumt werden sollen. Hier wird ein kontinuierlicher Strom an Ausgangslösung, die oberflächenaktive Substanzen sowie eventuelle Begleitstoffe enthält, der Zerschäumungssäule zugeführt. Der entstehende Schaum und die abgereicherte Lösung werden laufend entnommen (*Grieves, 1982*).

Die oberflächenaktiven Eigenschaften der Moleküle machen die Schaumfraktionierung vor allem in sehr verdünnten Lösungen zu einer effektiven Anreicherungs- und Trennmethode, da bei gegebener Gasflussrate (nach Gleichgewichtseinstellung) die Menge der in der Grenzschicht vorhandenen oberflächenaktiven Substanz fast unabhängig von der Konzentration der Ausgangslösung ist (*Spurný und Jakoubek, 1968; Brown, 1998*).

2.1.2.1 Apparaturen

Für den Aufbau von Zerschäumungsapparaturen bieten sich unterschiedliche Möglichkeiten, wobei deren Zusammenstellung und Gestaltung dem jeweiligen Verwendungszweck angepasst werden muss. Als Säulenmaterial wird hauptsächlich Glas verwendet.

Eine sehr einfache Zerschäumungsapparatur von *Schütz (1937)* zeigt Abbildung 2.6. Die Apparatur wird mit einer Halteklammer festgehalten. Die zu zerschäumende Flüssigkeit (C unten) bzw. der sich entwickelnde Schaum (C oben) befinden sich im Zerschäumungsgefäß B. Durch das Gaszuleitungsrohr A wird Gas in die Flüssigkeit geleitet. Bei der Verbindung E können verschiedene Einsätze angeschlossen werden. D ist der Auffangbehälter für den Schaum, und bei G kann dieser ausgetauscht werden.

Um einen guten Zerschäumungseffekt zu erreichen, werden für Laborversuche in der Regel Glassäulen von ca. 1-2 m Länge und ca. 3-6 cm Durchmesser verwendet (*Lucena et al., 1996; Schonfeld und Kibbey, 1967; Tharapiwattananon et al., 1996; Davis et al., 1949*). Je nach Bedarf können Einspeise- und Entnahmestellen sowie

sog. Krümmer am oberen Ende der Säule angeordnet werden. Für die Gasverteilung im Flüssigkeitspool gibt es unterschiedliche Ausführungen, wie Glasfritten, Verteilerplatten und Verteilungsröhre mit zirkulierendem Gasfluss (*Lima und Varley, 1994*). Außerdem ist es sinnvoll, mehrere Zerschäumungsröhre hintereinander zu schalten, um eine hohe Effektivität zu erzielen (*Kishimoto, 1962*).

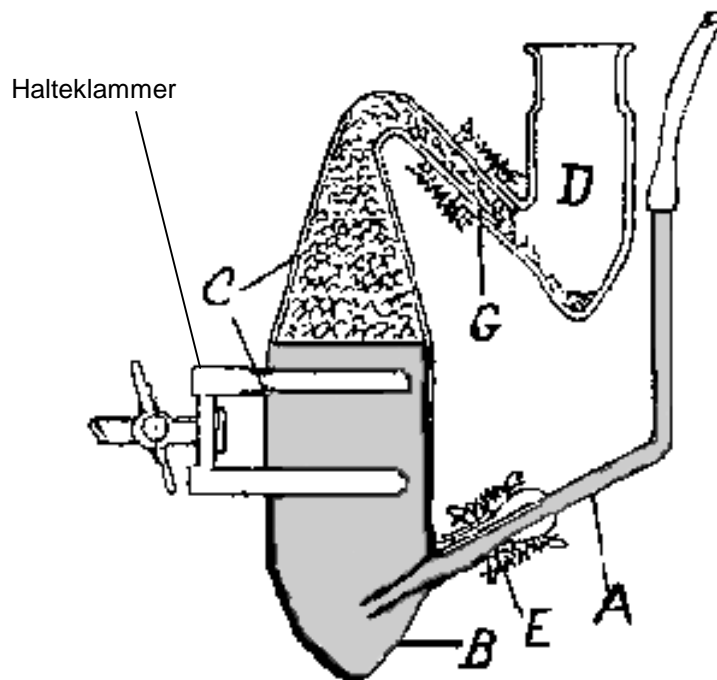


Abb. 2.6: Einfache Zerschäumungsapparatur nach *Schütz (1937)*. Mit: **A:** Rohr für Gaszufuhr; **B:** Zerschäumungsgefäß; **C:** unten Flüssigkeit, oben Schaum; **D:** Schaumsammelgefäß; **E:** Verbindung zum Wechseln der Gaszufuhr; **G:** Verbindung zu Wechsel der Schaumsammelgefäße

Zur Auswahl einer dem Verwendungszweck angepassten Zerschäumungsapparatur und einem optimalen Betrieb sind neben den physikalisch-chemischen Parametern folgende technische Einflussfaktoren zu beachten:

- **Durchmesser der Säule:** *Liu et al. (1995)* beobachteten, dass mit kleinem Durchmesser höhere Anreicherungsraten zu erzielen waren. Dies ist einerseits auf den höheren Druck, der in engeren Säulen auf die Gasblasen wirkt, zurückzuführen, andererseits bedingt der geringere Querschnitt einen besseren Kontakt der gegenläufigen Ströme und damit einen verstärkten Drainageeffekt. Einen entscheidenden Einfluss hat der Durchmesser möglicherweise auch auf die Wirtschaftlichkeit. So könnte mit Säulen größeren Durchmessers ein erhöhter Volumendurchsatz erzielt werden, was z. B. bei in großer Menge anfallenden Abwässern eine entscheidende Rolle für die Wirtschaftlichkeit des Verfahrens darstellen könnte.
- **Volumenvergrößernde Einbauten:** Für die Zerschäumung großer Flüssigkeitsmengen bei Batchprozessen kann der Flüssigkeitspool mit einem größeren Querschnitt ausgestattet werden. Allgemein gilt für Zerschäumungsprozesse, dass die Aufenthaltsdauer der Blasen im Schaumbereich wesentlich länger ist als die im flüssigen Bereich der Säule. Daher ist es für die Erhöhung des Trennungsgrades effektiver, die Abmessungen des oberen Säulenteils zu verändern. Dies sollte bei einer Verfahrensoptimierung berücksichtigt werden. Als Einbauteile können Rohrverlängerungsstücke, Zylinder- oder Kugeleinbauten eingesetzt werden. *Schonfeld und Kibbey (1967)* verwendeten beispielsweise einen zylinderförmigen Einsatz im oberen Teil der Säule zur Verbesserung der Drainage. *Banerjee et al. (1993)* gestaltete die gesamte Säule aus jeweils vier übereinandergesetzten trichterförmigen Teilstücken.
- **Gasart:** Für eine Zerschäumung ist CO₂-Gas ungeeignet, da dies zu einer Veränderung des pH-Wertes und damit zur Veränderung der Bedingungen führt. Ebenso liefert es einen instabilen Schaum. Das gleiche gilt für Luft. N₂-Gas ist am besten geeignet, da dadurch ein wesentlich stabilerer Schaum entsteht (*Thomas und Winkler, 1977; Montero et al., 1993*). Andere inerte Gase (z. B. Argon, Helium) unterscheiden sich zwar in ihren Eigenschaften kaum von N₂, sind aber wesentlich teurer, so dass es kaum sinnvoll ist, ein anderes Gas außer N₂ zu wählen.

- **Gasflussgeschwindigkeit:** Die gewählte Gasflussgeschwindigkeit hat einen entscheidenden Einfluss auf die Zerschäumung. Bei einer niedrigen Gasflussgeschwindigkeit erhält man eine bessere Anreicherung, da weniger Flüssigkeit in den Schaum mitgerissen wird. Auch ergibt sich eine längere Verweilzeit der Schaumblasen in der Säule. Dies erleichtert Drainage und Anreicherung durch Koaleszenz. Wird jedoch der Schaum zu trocken, kann ein Abreißen der Schaumsäule eintreten (*Brown et al., 1998; Ahmad, 1975a; Bhattacharya et al., 1991*). Bei hoher Gasflussrate ergibt sich der entgegengesetzte Effekt, d. h. große Mengen an Flüssigkeit gehen in den Schaum über, die Verweilzeit wird kürzer, die Drainage wird verringert und die Reinheit der Schaumphase wird durch den Anteil der mitgerissenen Flüssigkeit limitiert (*Varley et al., 1996; Noble et al., 1998; Brown et al., 19990*).
- **Höhe des Flüssigkeitsstandes:** Hält man die Schaumhöhe, den Gasfluss und die Produktzufuhr konstant, zeigt sich, dass sich die Veränderung des Flüssigkeitsstandes erheblich auswirkt (*Ahmad, 1975; Uraizee und Narsimhan, 1995b; Bhattacharjee et al., 1997*). Durch steigenden Flüssigkeitsstand kann die Proteinanreicherung weiter verbessert werden. Die Ursache dafür ist die längere Verweilzeit der Gasblasen in der Flüssigkeit, dadurch ein längerer Kontakt mit der Ausgangslösung und somit eine bessere Möglichkeit für oberflächenaktive Substanzen, an die Blasenoberfläche zu diffundieren und sich in die Grenzschicht einzulagern.
- **Höhe der Schaumsäule:** Durch internen Rückfluss nimmt mit der Höhe der Schaumsäule die Menge an oberflächenaktiver Substanz je Foamateinheit zu. Die herabfließende Flüssigkeit hat im Vergleich zum Schaum eine wesentlich geringere Konzentration, d. h. das Anreicherungsverhältnis in Bezug auf die Ausgangslösung steigt mit der Höhe der Schaumsäule (*Dorman und Lemlich, 1965; Liu et al., 1995*). Limitierend für diesen Effekt ist die Stabilität der Blasen. Je nach Eigenschaften der zerschäumten Lösung reißt die Schaumsäule bei einer bestimmten Höhe ab.

- **Schaumzerstörer:** Es sind verschiedene Methoden der Schaumzerstörung bekannt (Abbildung 2.7). *Banerjee et al. (1993)* verwendete als einfache Methode zur Verflüssigung des Schaums eine ca. 30 cm hohe Glassäule mit einem Durchmesser von 4 cm, die eine 2,5 cm hohe Glasperlenschicht enthielt. Mittels einer Pumpe wurde der Schaum durch die Glasperlen gezogen, dadurch verflüssigt und in einer Saugflasche gesammelt. Das Foamat konnte zur Analyse entnommen oder in die Säule zurückgeführt werden. Der Schaumzerstörer nach *Lucena et al. (1996)* besteht aus einem Glasgefäß und einem Motor mit Rührer. Der aus der Säule austretende Schaum wird in diesem Gefäß aufgefangen, durch die Rührerpaddel verflüssigt und weitergeleitet. Eine dritte Möglichkeit der Verflüssigung erläutert *Lemlich (1961)*. Hier wird der Schaum durch einen in einem trichterförmigen Schaumauffanggefäß rotierenden Drahtkorb zentrifugiert und verflüssigt.

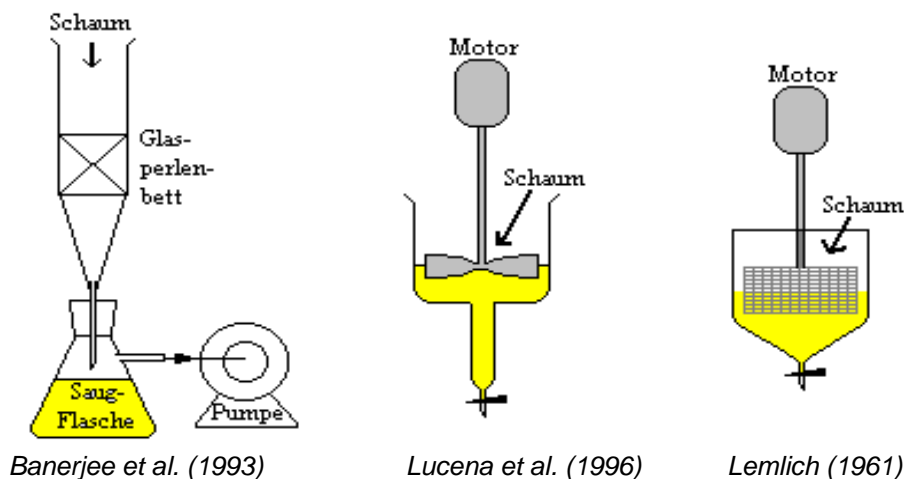


Abb. 2.7: Schematischer Aufbau von verschiedenen Schaumzerstörern

2.1.2.2 Batch-Zerschäumungsverfahren

Bei der diskontinuierlichen Zerschäumung (Batch-Verfahren) gibt es grundsätzlich zwei Möglichkeiten:

- Die Zerschäumung findet ohne Schaumrückführung statt.
- Der entstandene Schaum wird verflüssigt und teilweise oder ganz wieder dem Flüssigkeitspool zugeführt (*Lemlich, 1968a*).

1. Batch-Verfahren ohne Schaumrückführung (Abbildung 2.8a)

Dieses Verfahren wird zur Untersuchung der Anreicherung von oberflächenaktiven Substanzen an Gasblasen am häufigsten angewandt. Es besteht darin, ein gewisses Volumen einer Lösung über einen begrenzten Zeitraum zu zerschäumen. Die Ausgangslösung wird in die Säule gefüllt und der Prozess zum Zeitpunkt $t=0$ durch Einschalten des Gasflusses gestartet. Der sich bildende Schaum steigt in der Säule hoch, wobei mitgerissene Flüssigkeit teilweise wieder zurückläuft. Proben von Schaum und Restflüssigkeit werden in bestimmten Zeitabständen entnommen. Die gemessene Anreicherung kann als Funktion der Zerschäumungszeit aufgetragen werden und als Grad der Schaumfraktionierung angegeben werden. Eine andere Möglichkeit besteht darin, Messungen nur am Ende der Zerschäumungszeit vorzunehmen und so ausschließlich die Gesamtanreicherung des oberflächenaktiven Stoffes und entsprechend die maximale Abreicherung der Lösung zu ermitteln. Das mit dieser Methode gewonnene Ergebnis ist zeitabhängig, da sich kein Gleichgewichtszustand einstellt (*Grieves, 1982*).

2. Batch-Verfahren mit Schaumrückführung (Abbildung 2.8b)

Bei dieser Variante ist der Aufbau wie oben beschrieben. Der am oberen Ende der Säule aufgefangene Schaum wird aber durch einen Schaumzerstörer verflüssigt und wieder in den Flüssigkeitspool zurückgeführt. Dieses Vorgehen gewährleistet bei einem genügend großen Volumen an Zerschäumungsflüssigkeit, dass die Konzentration der oberflächenaktiven Substanz im Schaum gleich bleibt und sich ein Gleichgewichtszustand einstellt. Es wird sozusagen im Kreislauf zerschäumt. Proben können währenddessen entnommen werden. Ein Nachteil des Verfahrens besteht allerdings darin, dass zur Entnahme der

angereicherten Lösung der gesamte Prozess wie oben gestoppt werden muss (Ostwald und Mischke, 1940a; Grieves, 1982).

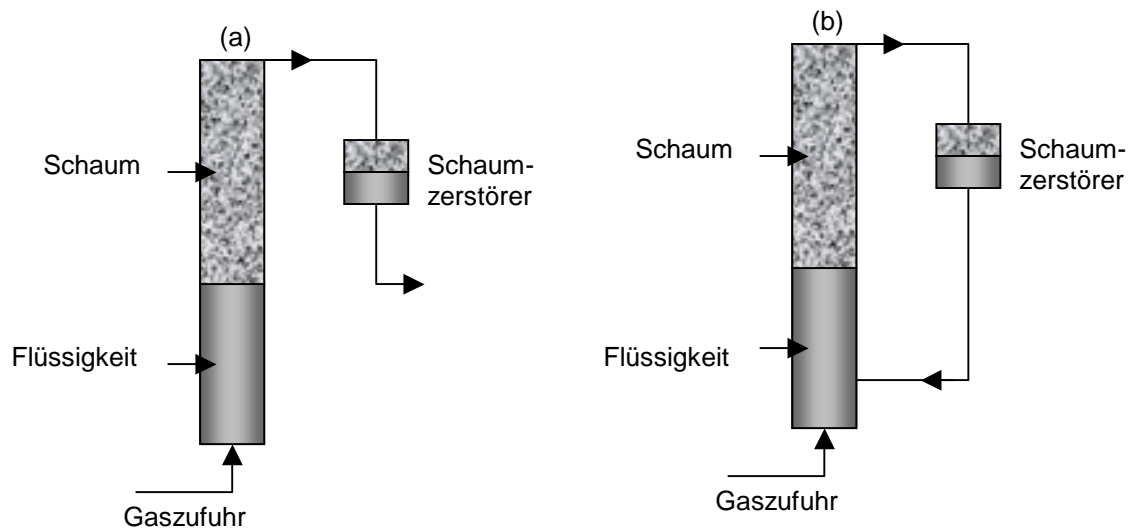


Abb. 2.8: Schematische Darstellung der Batchzerschäumung ohne (a) bzw. mit (b) Schaumrückführung.

Des Weiteren gibt es noch verschiedene andere Ausführungen von Zerschäumungsapparaturen, wie beispielsweise die Kolonnenzerschäumung (Abbildung 2.9), bei der verschiedene Zerschäumungsapparaturen hintereinandergeschaltet werden und der Schaum der vorhergehenden Zerschäumung als Flüssigkeit für die darauffolgende Zerschäumung dient (Ostwald und Mischke, 1940a).

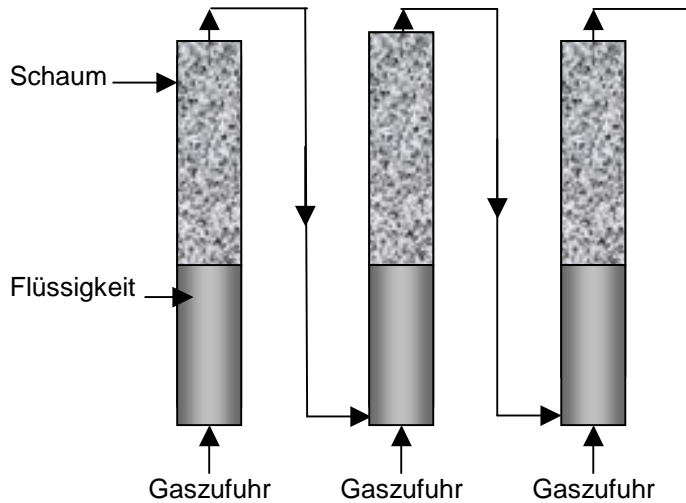


Abb. 2.9: Prinzip der Kolonnenzerschäumung

2.1.2.3 Kontinuierliche Zerschäumungsverfahren

Diese Technik kann bei der Zerschäumung größerer Volumina eingesetzt werden. Hierbei gibt es verschiedene Variationen, die im Nachfolgenden ausführlicher erläutert werden sollen:

- *Kontinuierliche Methode mit Einspeisung in die Flüssigkeit (Abbildung 2.10a)*
Dieses Verfahren entspricht dem Batch-Verfahren ohne Schaumrückführung mit dem Unterschied der kontinuierlichen Zufuhr der Ausgangslösung. Es bildet sich ein einfaches Fließgleichgewicht zwischen der Konzentration an oberflächenaktiver Substanz in der Grenzschicht und in der Ausgangslösung aus (Grieves, 1982).

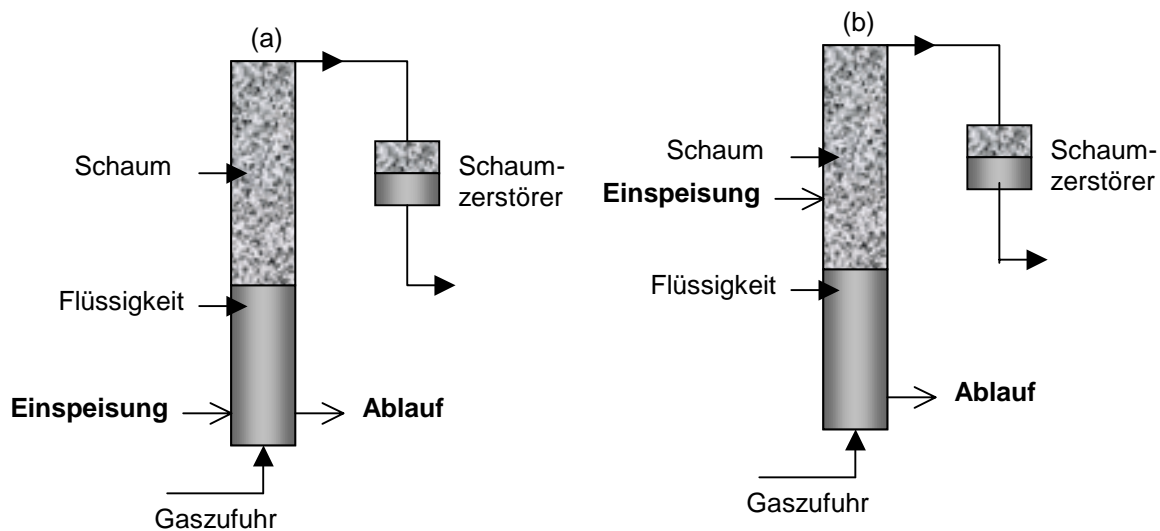


Abb. 2.10: Schematische Darstellung der kontinuierlichen Zerschäumung mit Einspeisung in die Flüssigkeit (a) bzw. Einspeisung in den Schaum (b)

- Kontinuierliche Methode mit Einspeisung in den Schaum (Abbildung 2.10b)*

Wird die Ausgangslösung nicht am Säulenboden, sondern in den Schaum eingespeist, kann ein größerer Anteil der oberflächenaktiven Substanz abgetrennt werden, da sich mehrere Fließgleichgewichte ausbilden. Es begegnen sich ein abwärtsgerichteter Flüssigkeitsstrom, der durch die Kapillaren herabfließt, und ein aufsteigender Schaumstrom mit angereicherter Flüssigkeit. Zwischen den beiden Strömen findet ein Transport der oberflächenaktiven Substanz statt (Grieves, 1982). Untersuchungen von Uraizee und Narsimhan (1995a) ergaben, dass der Übergang der oberflächenaktiven Substanz hauptsächlich in der Nähe der Einspeisestelle und in bzw. kurz über der Bodenflüssigkeit stattfindet.
- Kontinuierliche Methode mit Schaumrückführung und Einspeisung in die Flüssigkeit (Abbildung 2.11a)*

Eine externe Rückführung des Foamats liefert einen an oberflächenaktiver Substanz hochkonzentrierten neuen Schaumstrom. Das konzentrierte Kollat, das in den Kapillaren nach unten fließt, erhöht die Menge der oberflächenaktiven Substanz an den Gasblasen durch Einlagerung der Moleküle in noch nicht besetzte Positionen der Grenzschicht. Koaleszenz und Schaum-

zerfall innerhalb der Säule sorgen für zusätzlichen internen Rückfluss (Grieves, 1982).

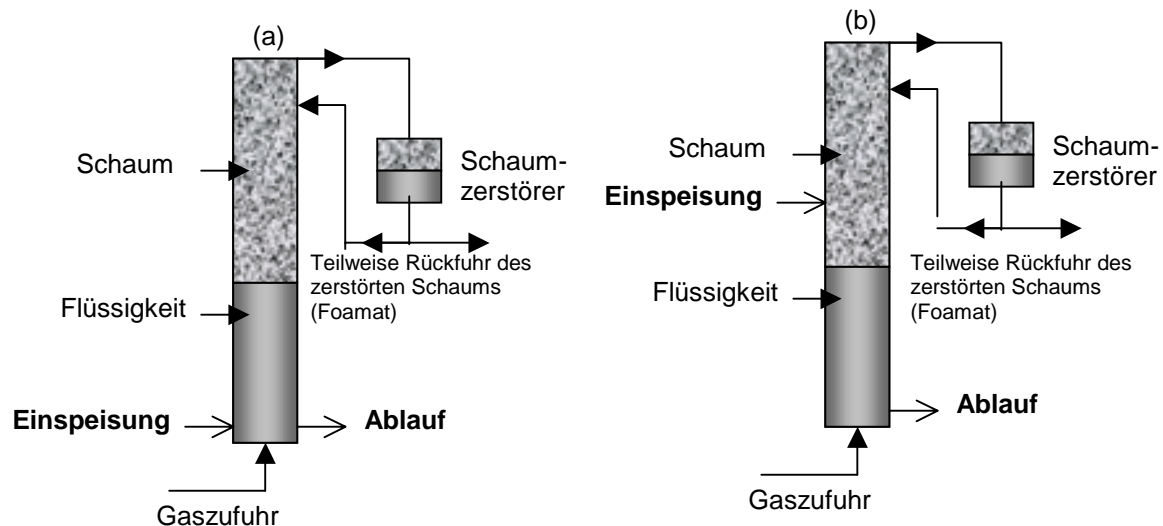


Abb. 2.11: Schematische Darstellung der kontinuierlichen Zerschäumung mit Einspeisung in die Flüssigkeit (a) bzw. Einspeisung in den Schaum (b) und gleichzeitiger Rückführung des Foamats.

- *Kontinuierliche Methode mit Schaumrückführung und Einspeisung in den Schaum (Abbildung 2.11b)*

Auch bei einer Produkteinspeisung kann die Schaumrückführung in den Schaum statt in die Flüssigkeit vorgenommen werden. Die Kombination der schon beschriebenen Effekte führt so zu einer optimalen Fraktionierung (Grieves, 1982).

Als weitere Modifikation ist eine mehrstufige Zerschäumungsapparatur (multistage bubble fractionator) bekannt, die einen stark erhöhten Massendurchsatz ermöglicht (Leonard und Blacyki, 1978).

2.1.2.4 Praktischer Einsatz der Verfahren

Bisherige Erfahrungen zeigen, dass die Auswahl des Verfahrens vom Ziel und vom zu verarbeitenden Volumen des Produktes abhängt. Bei kleinen Volumina ist das Batch-Verfahren zu bevorzugen. Durch den einfachen Aufbau sind der zeitliche Aufwand und die anfallenden Kosten begrenzt, und es treten weniger Probleme beim Betrieb auf; daher ist keine ununterbrochene Kontrolle des Betriebes nötig.

Dagegen können bei den hier genannten Modifikationen des kontinuierlichen Verfahrens bei Einspeisung in den Schaum kombiniert mit der Rückführung des zerstörten Schaums die besten Anreicherungsresultate erzielt werden (*Lemlich, 1961; de Lucena, 1996; Ahmad, 1975; Uraizee, 1995*).

Je mehr man aber vom einfachsten Aufbau, dem des Batch-Verfahrens, abweicht, umso mehr Probleme ergeben sich bei der Aufrechterhaltung und Überwachung des Betriebes bzw. bei der Optimierung der einzelnen zerschäumungsrelevanten Parameter. Nachteilig bei den kontinuierlichen Verfahren sind der relativ hohe Zeitaufwand für die ständige Überwachung des Prozesses, da es hier vor allem am Schaumzerstörer zu Schwierigkeiten kommen kann. Des Weiteren kommt ein großer Aufwand für die Reinigung der Apparatur hinzu (*Grieves, 1982*). Eine Übertragung auf den industriellen Maßstab bei beiden Verfahren noch nicht getestet worden.

Trotzdem zeigt der kritische Vergleich mit alternativen Verfahren wie Membrantrenntechniken, Koagulation etc., dass in der Zerschäumung ein großes Potential auf Grund der niedrigen Kosten steckt. Ebenfalls von Vorteil könnte die Selektivität des Verfahrens sein.

Bereits *Ostwald und Siehr (1937a, b)* erwähnten als mögliches Einsatzgebiet der Zerschäumung die Gewinnung des Eiweißes aus Kartoffelrohsaft. Hier eröffnen sich nun vielfältige Möglichkeiten. In den Kartoffelstärkefabriken und Kartoffelbrennereien fallen jährlich große Mengen an Kartoffelbruchwasser an, dessen Eiweiß qualitativ hochwertig ist (*Brown et al., 1990*). Allerdings wurden hier noch keine Versuche unternommen, eine industrielle Anwendung zu testen. Analog könnten einzelne Enzyme aufkonzentriert und gereinigt werden. Dabei ist jedoch zu bedenken, dass es durch eine verfahrensbedingte Denaturierung eventuell zu einer Verringerung bzw. einem völligen Verlust der Enzymaktivität kommen kann. Dies muss in Voruntersuchungen genau überprüft werden.

Die Zerschäumung stellt auch eine alternative Methode zur Zellgewinnung dar. Viele Mikroorganismen (z. B. Hefen) haben die Eigenschaft, sich im Schaum zu sammeln und sich dort anzureichern (*Ouchi und Akiyama, 1971; Bahr und Schügerl, 1992*). Bestimmte *Saccharomyces*-Stämme eignen sich auf Grund ihrer Hydrophobizität hervorragend für die Anreicherung durch Zerschäumungsverfahren (*Palmieri et al., 1996*). Hefen können nicht nur im Schaum angereichert werden, sondern es ist auch möglich, Hefen durch Kreislaufzerschäumung zu züchten und zu vermehren (*Ostwald und Mischke, 1940b*).

Ein Anwendungsgebiet, das bereits etabliert wurde, ist die Aquarientechnik. Hier müssen vor allem im Wasser vorhandene Schwebstoffe entfernt werden. Die Zerschäumung machte hier viele komplizierte Filtrationsmethoden überflüssig (*Hückstedt, 1965*). Diese Methode ist bereits soweit standardisiert, dass von einigen Firmen Apparaturen für diese Zwecke käuflich zu erwerben sind (z. B. Aquatic Eco-Systems Inc.; Emperor Aquatics Inc., USA).

Ähnliche Probleme stellen sich bei der Behandlung von öffentlichen und industriellen Abwässern. Allerdings fallen hier nicht nur zu entfernende Schwebstoffe an, sondern es müssten auch gelöste Stoffe aus dem Abwasser entfernt werden (*Jenkins et al., 1972*). Auch durch Koadsorption können weitere unerwünschte Moleküle mitabgetrennt werden. Ob die anfallenden Verunreinigungen nach Isolierungsschritten verwendbar sind, ist allerdings zweifelhaft, da in Abwässern ganz unterschiedliche oberflächenaktive Substanzen vorkommen, die nur unter großem Aufwand zu trennen sind.

Sowohl für die Reinigung von Wasser als auch für die Gewinnung der Inhaltsstoffe sollte ein Einsatz der verschiedenen Zerschäumungsverfahren getestet werden. Da Abwässer mit teilweise relativ hohen Gehalten an verwertbaren Inhaltsstoffen (z. B. Proteine) in verschiedensten Bereichen der Industrie in der Regel in großen Mengen anfallen, wäre es zuerst dringend geboten, das für größere Volumina geeignete kontinuierliche Zerschäumungsverfahren zu entwickeln und in den industriellen Maßstab zu übertragen. Relativ einfach zu handhaben ist die Einstellung einer definierten Gasflussgeschwindigkeit sowie die Regelung der verschiedenen Zu- und Abflüsse durch entsprechende Pumpen.

Tabelle 2.2 gibt einen Überblick über bisher veröffentlichte Einsatzgebiete der Zerschäumung.

Tab. 2.2: Überblick über die Einsatzgebiete der Zerschäumung

Einsatzgebiet der Zerschäumung	Autoren
Gewinnung des Eiweißes aus Kartoffelsaft	<i>Ostwald und Siehr (1937a, b)</i>
Aquarientechnik: Entfernung von Verschmutzungen	<i>Hückstedt (1965)</i>
Behandlung von Abwässern der Textilindustrie	<i>Lin und Lo (1996)</i>
Wasserreinigung in Fischfarmen	<i>Hussenot et al. (1998)</i>
Reinigung von industriellen und öffentlichen Abwässern	<i>Jenkins et al. (1972)</i>
Entfernung von Penicillin aus Abwässern mittels eines Kollektors	<i>Gehle und Schügerl (1984)</i>
Isolierung von Fruchtproteinen	<i>Davis et al. (1949)</i>
Gewinnung von rekombinanten Proteinen in der Pharmaindustrie	<i>Lockwood et al. (1997)</i>
Patent zur Trennung von Gluten und Stärke aus Weizen	<i>Rodgers (1972)</i>
Anreicherung von <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ; <i>S. carlsbergensis</i> Anreicherung von Sporen aus <i>B. subtilis var. niger</i>	<i>Gehle et al. (1991)</i> <i>Tybussek et al. (1994)</i> <i>Parthasarathy und Kumar (1988)</i> <i>Gaudin et al. (1960)</i>
Hefezüchtung durch Kreislaufzerschäumung	<i>Ostwald und Mischke (1940b)</i>
Reinigung und Aufkonzentrierung von Enzymen	<i>Ostwald und Siehr (1937)</i> <i>Ostwald und Mischke (1940b)</i> <i>Charm et al. (1966); Charm (1972)</i> <i>Ko et al. (1998)</i> <i>Loha et al. (1998)</i>
Anreicherung von Hopfenbitterstoffen	<i>Mischke (1940)</i>
Extraktionsverfahren von Muschelproteinen	<i>Holland et al. (1983)</i>

2.2 Zerschäumung von Proteinen

2.2.1 Aufbau von Proteinschäumen

In Schaum liegt eine Dispersion von Gasen in Flüssigkeiten vor. Dabei stabilisieren oberflächenaktive Proteine den Schaum durch die Bildung von flexiblen, kohäsiven Filmen um die Gasblasen. Dies wurde ansatzweise schon 1840 von *Ascherson* festgestellt. Lagern sich diese Substanzen über ihre hydrophoben Bereiche in die Grenzschicht ein, so folgt anschließend eine partielle Auffaltung (Oberflächendenaturierung). In der Schicht wechseln globuläre Proteine ihre Struktur hin zu einer kettenartigen (*Ramsden und Oxon, 1894; Kinsella, 1986; MacRitchie, 1987*).

Diejenige Proteinkomponente, welche als erste die Grenzschicht erreicht, lagert sich auch als erste ein; die später ankommenden Proteinkomponenten können das schon eingelagerte Molekül nicht verdrängen, ungeachtet der oberflächenaktiven Eigenschaften. Die Einlagerung dieser Proteine folgt einem kinetisch kontrollierten Mechanismus (*Cao und Damodaran, 1995; Anand und Damodaran, 1995*). Der Zustand des Moleküls hängt u. a. von der Konzentration in der jeweiligen Lösung ab. In verdünnten Lösungen sind alle Proteine in der Grenzschicht im gleichen aufgefalteten (denaturierten) Zustand, während bei konzentrierteren Lösungen die Proteine in verschiedenen Stadien vorkommen können (*Charm, 1972; Phillips, 1981*).

Bei der Zerschäumung wurde generell beobachtet, dass sehr nasse Schäume, wie sie im unteren Teil einer Zerschäumungssäule vorkommen, die Struktur eines Kugelschaums aufweisen, wo hingegen der Schaum im oberen Teil der Säule polyederartig aufgebaut ist (*Kitchener und Cooper, 1959; Vries, 1972*). Während ein Kugelschaum aus selbständigen Kugelblasen in einem flüssigen Dispersionsmittel besteht, welche nicht unbedingt von oberflächenaktiven Substanzen umgeben sein müssen, zeichnet sich ein Polyederschaum (Abbildung 2.12) durch einen Verband polyedrisch geformter Blasen aus, die ihre Selbständigkeit verloren haben und jeweils von Filmen aus oberflächenaktiven Substanzen umgeben sind. Dabei können zwischen den in den Grenzschichten nebeneinander liegenden oberflächenaktiven Substanzen intermolekulare Wechselwirkungen auftreten. Diese Erscheinung kann den Polyederschaum stabilisieren (*List, 1985*).

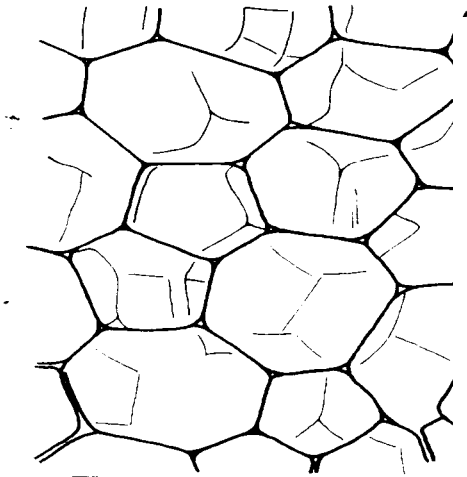


Abb. 2.12: Schematische Darstellung eines Polyederschaums.

Durch die in verschiedene Raumrichtungen wirkenden Kapillarkräfte können aber nur ganz bestimmte Polyederformen verwirklicht werden (*Manegold, 1953*). Innerhalb des Polyederschaums unterscheidet man zwischen Filmblasen, die von einer einfachen Schicht aus oberflächenaktiver Substanz umgeben sind, und Lamellenblasen, die durch das Aneinanderhaften mehrerer Filmblasen entstehen (Abbildung 2.13). Dabei besteht eine Lamelle aus einer Flüssigkeitsschicht von 10 nm bis 1 μm Dicke, die auf beiden Seiten von einem Film aus einer oberflächenaktiven Substanz begrenzt wird. Die Größe der Blasen und die Viskosität des Dispersionsmittels bestimmen die Beständigkeit solcher Schäume.

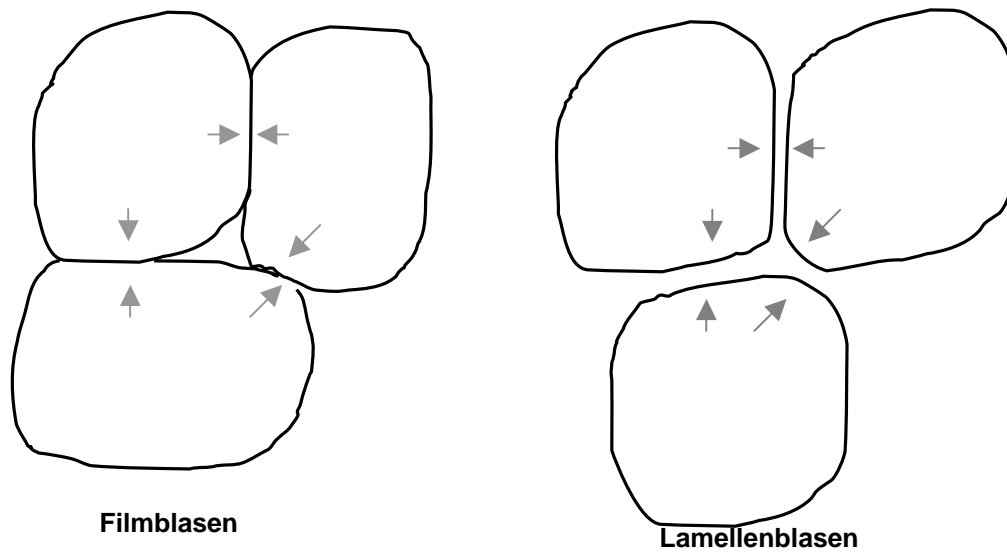


Abb. 2.13: Unterschied zwischen Film- und Lamellenblasen

Abbildung 2.14 zeigt schematisch den Querschnitt eines Polyederschaums mit seinen Flüssigkeitsfilmen (*Lima, 1994*). Die Summe der Kanäle stellt innerhalb des Schaums ein zusammenhängendes System dar, das mit interlamellarer Flüssigkeit gefüllt ist. Im Gleichgewichtszustand berühren sich nie mehr als drei Lamellen eines Polyederschaums, so dass sich Flächenwinkel von ca. 120° ergeben. In diesen Zwischenräumen bestehen Flüssigkeitssäulen mit dreieckigem Querschnitt, die beim Zusammenschluss der Gasblasen von drei dünnen Flüssigkeitsfilmen geformt werden.

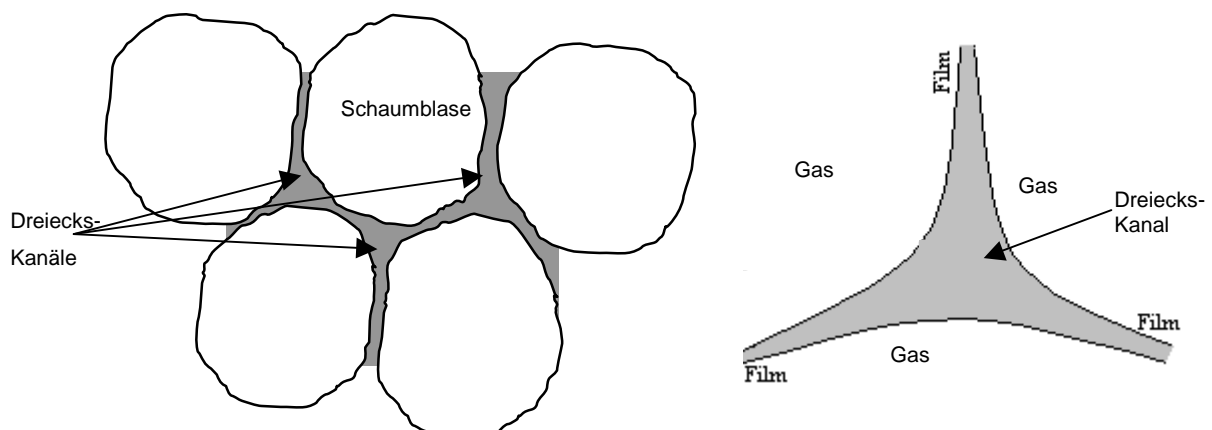


Abb. 2.14: Schematische Querschnittsdarstellung eines Polyederschaums (*Lima, 1994*)

Dieser Dreieckskanal wurde von Plateau und Gibbs im Zusammenhang mit dem Mechanismus der Schaumdrainage untersucht (*Adamson, 1990*) und wird als Gibbs-Kanal bezeichnet.

Analysen der dreidimensionalen Struktur von Schäumen zeigten allerdings, dass hier Voraussagen der Eigenschaften schwierig sind, da eine zu komplexe und dynamische Struktur vorliegt (*Weaire, 1989*).

2.2.2 Bildung und Stabilisierung von Proteinschäumen

Die Filmbildung durch Proteine an Grenzschichten (z. B. Gas-Flüssigkeit) beruht auf deren Oberflächenaktivität, also der Fähigkeit, die Grenzflächenspannung an der Phasengrenze zwischen Gas und Flüssigkeit herabzusetzen. Der Mechanismus der Einlagerung von oberflächenaktiven Substanzen in eine Grenzschicht ist meist thermodynamisch kontrolliert. Innerhalb der Proteinschicht richtet sich das Protein so aus, dass sich hydrophile Bereiche zur wässrigen Phase orientieren, während sich hydrophobe Regionen in Richtung der Gasphase ausrichten (*Maas, 1974; Phillips, 1981*). Dabei kommt es, wie schon erwähnt, zur partiellen Denaturierung. Dies kann zur Freilegung zusätzlicher Aminosäureseitenketten führen, wodurch dann neue intermolekulare Wechselwirkungen auftreten können (*Belitz und Grosch, 1992*). Die anschließende Assoziation der aufgefalteten Proteine, die durch eine möglichst geringe Nettoladung der Moleküle begünstigt wird, stabilisiert den Film. Je höher die Hydrophobizität eines Proteinmoleküls ist, umso besser ist dessen Schaumeigenschaft (*Phillips, 1981; Townsend und Nakai, 1983; Poole et al., 1984; Dickinson, 1989*).

Liegen andererseits im Proteinmolekül Disulfidbrücken oder andere starke intramolekulare Bindungen vor, kann die Auffaltung begrenzt und die Filmbildung verschlechtert sein (*Charm, 1972*).

Die Hydrophobizität kann durch den pH-Wert beeinflusst werden. Wenn die Nettoladung nach der Einstellung des pH-Wertes gegen null geht, so ist der isoelektrische Punkt (pI) des Proteinmoleküls erreicht, und es besitzt maximale Hydrophobizität (*Thomas und Willer, 1977; MacRitchie, 1987; Liu et al., 1995*). Dies bedeutet, dass ein Protein an seinem isoelektrischen Punkt die besten schaumbildenden und

schaumstabilisierenden Eigenschaften besitzt (*MacRitchie, 1987; DeSouza et al., 1991*). Ebenso kann dies bei pH-Werten höher als 12 bzw. kleiner als 2 beobachtet werden, was auf proteinstrukturabhängige Schaumbildungseigenschaften hindeutet. Auch wird bei Anwesenheit von Salzen die Schaumbildung im Alkalischen verbessert, im Säuren jedoch verschlechtert (*Thuman et al., 1949*). In einer Untersuchung wurde demonstriert, dass Serumalbumine ein Minimum der Schaumbildung an ihrem isoelektrischen Punkt zeigten, was jedoch im Widerspruch zu anderen Veröffentlichungen (s. o.) steht (*Peters, 1952b*).

2.2.3 Verfahren zur Proteinanreicherung

Wirtschaftlich einsetzbare Verfahren zur Gewinnung von Proteinen aus Abfällen mit geringem Proteingehalt sollten sowohl den physiologischen Wert der Eiweiße erhalten als auch eine Durchführung mit geringem Kosten- und Zeitaufwand ermöglichen. Hierfür stehen bisher unterschiedliche Technologien zur Verfügung, die im Folgenden kurz erläutert werden sollen.

Als produktschonendes Verfahren steht die Membrantrenntechnik zur Verfügung. Mit ihr können Bestandteile gemäß ihrer Teilchengröße getrennt werden (*Kessler, 1996*). Im Einzelnen kommen dabei in Frage: Umkehrosmose, Nanofiltration, Elektrodialyse, Ultrafiltration und Mikrofiltration. Je nach Art des Verfahrens können Wasser, Mineralsalze, verschiedene Proteine oder Mikroorganismen abgetrennt werden. Die Membrantrennverfahren zeichnen sich durch einen hohen Wirkungsgrad aus und können relativ leicht im großtechnischen Maßstab eingesetzt werden. Die Nachteile sind jedoch sowohl der relativ hohe apparative Aufwand als auch die vergleichsweise hohen laufenden Energiekosten (*Singh und Singh, 1996; Kessler, 1996*).

Eine weitere Möglichkeit der Gewinnung von Proteinen ist die Koagulation. Hier werden bestimmte chemische oder thermische Verfahren verwendet, um Proteine aus einer Lösung präzipitieren zu lassen, sie dann abzutrennen und später für bestimmte Zwecke einzusetzen. Es ist ein schnelles Verfahren, um den gesamten Proteinanteil einer Lösung zu entfernen. Allerdings liegen die Proteine nach der Koagulation nicht mehr in ihrer nativen Form vor, und eine Fraktionierung der Inhaltsstoffe ist nicht möglich. Des Weiteren müssen nach der Koagulation noch organische Säure-

ren und Salze entfernt werden (*Knorr, 1977, 1980; Wilhelm und Kempf, 1981; Belitz und Grosch, 1992; Singh und Singh, 1996*). Ähnliches gilt für das Eindampfen von eiweißhaltigen Lösungen, wobei zusätzliche hohe Energiekosten entstehen (*Singh und Singh, 1996; Kessler, 1996*).

Als Alternativverfahren käme hier die Zerschäumung in Frage. Allerdings bestehen bisher noch keine praktischen Erfahrungen zur Gewinnung von Proteinen. Die Anwendung war bisher beschränkt auf die Aquarientechnik (s. o.). Auch müsste bei der Gewinnung von aktiven Enzymen genau geklärt werden, in wie weit sich die mögliche Proteindenaturierung bei der Zerschäumung auf die Aktivität der Enzyme auswirkt.

Die Untersuchung des Proteinverhaltens wurde bisher nur in Laborversuchen durchgeführt (vgl. 2.2.3). Es liegen hierzu noch keine großtechnischen Untersuchungen vor. Hier besteht Handlungsbedarf. Zunächst müsste die Anwendbarkeit der Zerschäumung an sich untersucht werden. Dann sollte dieses Verfahren für eine optimierte Proteingewinnung eingesetzt werden und als letztes die Untersuchung anhand eines Abfallgemisches (z. B. Kartoffelschlempe) durchgeführt werden. Wichtig dabei ist auch die Art des Verfahrens. Dieses sollte speziell beim Einsatz in der Abfallverwertung große Volumendurchsätze erlauben.

Probleme bei der praktischen Durchführung der Zerschäumung können durch ein Abreißen der Schaumsäule in der Kolonne sowie auch am Schaumzerstörer (Überlaufen) auftreten. Bisher unterliegt das Verfahren noch einem relativ hohen Zeitaufwand, da ständige Beobachtung notwendig ist, um auf plötzlich auftretende Schwierigkeiten reagieren zu können.

2.3 Kartoffelproteine

2.3.1 Kartoffelinhaltsstoffe

Die Kartoffel (*Solanum tuberosum*) gehört zur Familie der *Solanaceae*. Sie besteht durchschnittlich zu 77,8 % aus Wasser. Insgesamt setzt sie sich aus den in Tabelle 2.3 aufgelisteten Inhaltsstoffen zusammen. Die Bestandteile des Kartoffelfruchtwassers sind in Tabelle 2.4 aufgeführt.

Tab. 2.3: Hauptinhaltsstoffe von 100 g essbarem Anteil der Kartoffel (*Scherz und Souci, 1994*)

Wasser	Eiweiß*	Fett	Kohlenhydrate	Organische Säuren	Ballaststoffe	Mineralstoffe
77,8 g	2,0 g	0,1 g	14,8 g	0,6 g	2,5 g	1,0 g

* berechnet als Gesamtstickstoff

Tab. 2.4: Zusammensetzung von Kartoffelfruchtwasser in % der Frischmasse (*Noord, 1976*)

Trockenmasse	Eiweiß*	Zucker	Kalium
5 %	1,3 %	0,76 %	0,51 %

* berechnet als Gesamtstickstoff

Der Hauptanteil der Kohlenhydrate besteht aus Stärke (*Kolbe, 1995*). Der Fettanteil der Kartoffeln setzt sich hauptsächlich aus Membranlipiden zusammen, wobei die wichtigsten vorkommenden Fettsäuren Myristin-, Palmitin-, Stearin-, Öl-, Linol- und Linolensäure sind (*Kolbe, 1996d*). An Zuckern sind hauptsächlich Glucose, Fructose und Saccharose enthalten, jedoch in stark schwankender Zusammensetzung (*Kolbe, 1996a*). Die vorkommenden organischen Säuren (hauptsächlich Zitronen-, Äpfel- und Oxalsäure) bewirken eine Stabilisierung des pH-Wertes zwischen 5,6 und 6,2. Des Weiteren tragen Mineralstoffe (Tabelle 2.5) wie Natrium, Kalium und Magnesium sowie Ballaststoffe und Vitamine (u. a. A, B, C, E) zur Erhöhung des ernährungsphysiologischen Wertes bei (*Kolbe, 1996e, 1997*).

Tab. 2.5: Mineralstoffzusammensetzung der Kartoffelknolle (*Scherz und Souci, 1994*)

Element	Konzentration [mg/1000 g Frischesubstanz]
Calcium	61,6
Eisen	4,0
Kalium	4110
Kupfer	0,90
Magnesium	202
Mangan	1,4
Natrium	34,0
Zink	3,5
Chlorid	450
Phosphor*	500

* berechnet als Hydrogenphosphat

Etwa die Hälfte des Gesamtstickstoffs entfällt auf das Reinprotein (*Schick und Klinkowski, 1961; Kolbe, 1996b*) und der übrige Teil auf den nicht-proteingebundenen Stickstoff, welcher sich aus freien Aminosäuren, Amiden, Nitrat und weiteren Basisstickstoffkomponenten zusammensetzt (*Woolfe, 1996; Kolbe, 1996c*). Von dem Reinprotein stellen Albumin, Globulin, Glutelin und Prolamin die wichtigsten Fraktionen dar (*Gorinstein et al., 1988*). Die qualitative Verteilung der einzelnen Proteinfractionen hängt von der Sorte und dem Entwicklungsstadium der Kartoffel ab, ist jedoch vom Standort, Jahrgang und Düngung unabhängig, so dass eine elektrophoretische Analyse ein sortenspezifisches Muster liefert (*Schick, 1961; Stegemann, 1969; Stegemann und Loeschke, 1977*). Das Gesamtprotein besteht auch zu einem Teil aus spezifischen Proteaseinhibitoren, die gegen Verdauungsenzyme wie Trypsin, Chymotrypsin und Carboxypeptidase A wirken (*Dao und Friedman, 1994*). Die Molekulargewichte dieser Inhibitoren liegen im Bereich von 17-22,5 kDa (*Kaiser und Belitz, 1972; Revina et al., 1995*). Ihr Anteil beträgt ca. 0,1-0,2 % des Gesamtproteins (*Belitz und Grosch, 1992*). Auch hier ist die Zusammensetzung bzw. die Menge spezifisch für die jeweilige Kartoffelsorte (*Kaiser et al., 1974*). Ein Unterschied zwischen den in der Knolle vorkommenden und den Fruchtwasserproteinen besteht fast nur quantitativ (*Stegemann et al., 1973*). Die im Fruchtwasser vorkommenden Proteinfractionen, welche qualitativ denen der Knolle entsprechen, besitzen isoelektrische Punkte zwischen 3 und 10 und Molekulargewichte zwischen 13,5 und 93 kDa. Sie sind besonders reich an Lysin und eignen sich daher besonders als Ergänzung für lysinarme Proteine, z. B. die in Getreide (*Horn, 1979*).

Die Kartoffel besitzt neben der Sojabohne den höchsten Ertrag an Proteinen und Aminosäuren je Hektar Anbaufläche (*Stegemann, 1978*). Dabei ist der ernährungsphysiologische Wert des Kartoffelproteins qualitativ dem aus Eiern und Fleisch gleichzusetzen (*Kofrányi und Jekat, 1964a und b; Stegemann, 1978*). Tabelle 2.6 zeigt die Aminosäurezusammensetzung.

Tab. 2.6: Durchschnittsgehalt an Aminosäuren in Kartoffelknollen (Mittelwert von 34 Kartoffelsorten) (*van Gelder und Vonk, 1980*)

Aminosäure	Gehalt [g/100 g Aminosäuren]
Threonin	5,42
Valin	6,42
Methionin	2,15
Isoleucin	5,29
Leucin	10,28
Phenylalanin	6,53
Lysin	7,64
Histidin	2,06
Arginin	4,95
Asparaginsäure	12,64
Serin	5,40
Glutaminsäure	10,23
Prolin	4,83
Glycin	5,03
Alanin	4,73
Tyrosin	5,62

Ein Nachteil von Kartoffelproteinen besteht jedoch darin, dass bestimmte Fraktionen Allergien beim Menschen hervorrufen können. Diese allergenen Fraktionen haben einen isoelektrischen Punkt zwischen 4,5 und 5,2 (*Wahl et al., 1990*).

2.3.2 Industrielle Verarbeitung

Die industrielle Gewinnung von Stärke aus Kartoffeln ist ein relativ einfaches Verfahren, da hier die Stärkekörner frei in den Zellen liegen. Das pflanzliche Material wird zerkleinert und die Stärke mit Wasser ausgeschwemmt, aus der Suspension (Stärkemilch) abgetrennt und getrocknet. Diese Stärke (Amylose, Amylopektin) lässt sich durch physikalische oder chemische Modifizierungen verbessern und bestimmten Verwendungszwecken anpassen (*Belitz und Grosch, 1992*).

Als Reste bei der Stärkegewinnung fallen große Mengen an Kartoffelrestmasse an, die hier analog zur Brennereitechnologie als Schlempe bezeichnet werden soll. Sie wird hauptsächlich zur Ergänzung des Milchpulvers zur Fütterung (Milchersatz) von jungen Kälbern verwendet (*Noord, 1976*). Außerdem fallen bei den verschiedenen Reinigungsschritten große Mengen an Abwasser an, die nicht genutzt werden können.

Auf Grund ihres relativ hohen Stärkegehalts ist die Kartoffel ebenfalls für die Alkoholherstellung in Brennereien interessant (*Kreipe, 1981*). Auch finden vermehrt speziell gezüchtete Stärkekartoffeln den Weg in die Brennereien (*Adam et al., 1995*). Um 100 L Weingeist zu erhalten, benötigt man ca. 850 kg Kartoffeln mit einem Stärkegehalt von ca. 18 % (*Wüstenfeld und Haeseler, 1996*).

In den Brennereien werden die bei 4-7 °C in Lagerhallen aufbewahrten Kartoffeln vom Schmutz (Sand, Erde, Steine etc.) befreit und gereinigt. Hier fällt ein Großteil des Abwassers an. Beim anschließenden mechanischen und thermischen Aufschluss wird die Stärke verkleistert und gelöst, um sie später verzuckern zu können. Heutzutage wird das Hochdruckdampfverfahren mit einem Henzedämpfer am häufigsten angewendet. Ein positiver Nebeneffekt beim Aufschluss ist ein gewisser Abbau des Eiweißes zu Aminosäuren und weiteren Inhaltsstoffen, die bei der Fermentation der Hefe als Nahrung dienen. Beim Hochdruckdämpfen werden Druckwerte bis zu 5 bar verwendet, um eine vollständige Zerkleinerung der Kartoffeln und eine Lösung der Stärke zu garantieren. Die Dämpfdauer beträgt ca. 1,5 h. Beim Ausblasen des Henzedämpfers kommt es auf Grund der schnellen Druckentlastung zum Auseinanderbrechen der Zellverbände. So wird die Stärke den Enzymen zugänglich. Danach gelangt die Masse in den mit Grünmalz (β -Amylase; zusätzlich: Verwendung von α -amylasenreichen mikrobiellen Enzymen) vorgelegten Maischebehälter, in dem sie bei 50-60 °C verzuckert wird. Hier wird ebenfalls ein Teil der Proteine durch Proteasen

zu Peptiden und Aminosäuren abgebaut. Die Gärdauer mit Hefe (obergärige Brennereihefe) beträgt meist ca. 68 h. Der pH-Wert sinkt dabei von anfangs 5,4-5,8 auf 4,6 ab und der Gehalt an vergärbaren Zuckern fällt von ca. 17 % auf 0,7-1,4 %. Anschließend wird der Alkohol in kontinuierlich arbeitenden Rektifizieranlagen (mehrstufige Destillation) extrahiert. Der Leichtsieder (Alkohol) reichert sich in der Kolonne im aufsteigenden Gemischdampf, der Schwersieder (Wasser) in der entgegenströmenden Flüssigkeit an. Die für Trinkzwecke unerwünschten Gärungsnebenprodukte können wegen ihrer unterschiedlichen Siedetemperaturen an entsprechender Stelle der Rektifiziersäule entnommen werden. Die vorgewärmte Maische gelangt in den obersten Boden der Maischekolonne und fließt nach unten. Im Sumpf wird die Schlempe mit einem Schlempenheber in den Schlempensammelbehälter gepumpt (Kreipe, 1981).

Diese Schlempe enthält noch eine Reihe von verwertbaren Inhaltsstoffen, wobei der relativ hohe Rohproteingehalt der Schlempe von der in der vorangegangenen Gärung zugegebenen Hefe rührt. Die Zusammensetzung der Schlempe ist Tabelle 2.7 zu entnehmen. Auf die Zusammensetzung von Schlempe der Kartoffelstärkeindustrie wird hier nicht näher eingegangen, da nur unzureichende Daten vorhanden sind.

Tab. 2.7: Zusammensetzung von Kartoffelschlempe von Brennereien (Pieper et al., 1993)

Inhaltsstoff	Menge [% der Frischmasse]
Wasser	94,4
Trockensubstanz	5,6
Rohprotein	1,5
Rohfett	0,04
Rohfaser	0,5
N-freie Extraktstoffe	2,9
Asche	0,5

Die Schlempe als Abfallprodukt dient im landwirtschaftlichen Brennereigewerbe meist als Krafftfutter mit hohem Nährwert, da bei der Gärung fast nur die Kohlenhydrate ausgenutzt werden. Deren Fütterung ermöglicht so eine ausgedehnte Viehhalt-

tung und eine Düngererzeugung, die wieder dem Boden zugute kommt. Gelegentlich wird sie auch auf Walzentrockner unter Zugabe von Kartoffelreißeln zu Flocken getrocknet und anderen Futtermitteln zugesetzt, was den Vorteil hat, dass sie auf diese Art und Weise haltbar gemacht und zu späteren Zeitpunkten verfüttert werden kann (*Sierp, 1967; Kreipe, 1981*). Auch kann sie auf geeigneten landwirtschaftlichen Flächen als Düngeranteil breitflächig ausgetragen werden (*Adam et al., 1995*).

Auch beim Brennereiverfahren fallen hohe Mengen an Abwasser an, durchschnittlich $6,22 \text{ m}^3$ je Tonne Kartoffeln. Auch hier ist eine Verwertung nicht möglich, sondern es bleibt nur eine Entsorgung. Probleme mit solchen Abwässern können bereits beim Ablassen in einen Vorfluter auftreten. Hier treten schon auf dem Wege zum Vorfluter erhebliche Geruchsbelästigungen durch Fäulnisprozesse auf.

2.3.3 Schlempeentsorgung (nach *Sierp, 1967*)

Da pro Jahr wesentlich mehr Schlempe produziert wird, als durch oben erwähnte Möglichkeiten wiederverwertet werden kann, muss ein Großteil auf verschiedene Art und Weise entsorgt werden.

Die Einleitung der Schlempe in die Kanalisation oder in öffentliche Gewässer ist im Hinblick auf deren hohen chemischen Sauerstoffbedarf (CSB) nach den geltenden Wasser- und Abwassergesetzen unzulässig (*Kreipe, 1981*). Dieses macht Alternativverfahren notwendig.

Eine biologische Methode ist das Rieselfverfahren. Hier wird die Schlempe vor der Verrieselung mit Kühl- oder Spülwasser verdünnt, durch Kalk oder ein gleichwertiges Neutralisationsmittel neutralisiert und auf Rieselfeldern oder Rieselwiesen ausgebracht. Dies bringt eine Steigerung der Ernteerträge mit sich. Allerdings ist infolge der Menge der anfallenden Abwässer der Bedarf an geeigneten Flächen sehr hoch. Außerdem können auch hier starke Geruchsbelästigungen durch die berieselten Flächen auftreten.

Ein weiteres biologisches Verfahren ist der Abbau der organischen Stoffe durch Belebtschlamm. Diesem sind jedoch durch den hohen Gehalt an organischen Stoffen Grenzen gesetzt. Der Abbau der Schlempe kann auch aerob in Teichen erfolgen. Auch ein anaerober Abbau ist möglich. Hierbei kann Biogas erzeugt werden, welches

in verschiedene Bereichen, beispielsweise zur Stromerzeugung, eingesetzt werden kann.

Das gründlichste Verfahren zur Beseitigung der Schlempe ist die Verdampfung und Veraschung. Die gewonnene Schlempekohle kann dann in der chemischen Industrie zu verschiedenen Chemikalien weiterverarbeitet werden. Allerdings entstehen hierbei ziemlich hohe Energiekosten, was dieses Verfahren relativ unwirtschaftlich macht.

Als Alternativverfahren zur Nutzung der noch vorhandenen Wertstoffe könnte man die Zerschäumung einsetzen. Mit ihr könnte es möglich sein, mit geringen Kosten und wenig Aufwand die vorhandenen Proteine bis zu einem gewissen Reinheitsgrad abzutrennen und weiterzuverwerten.

2.4 Proteinanalytik

2.4.1 Quantitative Proteinbestimmungsmethoden

Die Methoden zur quantitativen Bestimmung von Proteinen basieren auf verschiedenen Prinzipien. Zu diesen gehören die Erfassung des Stickstoffgehaltes, die photometrische Analyse der Proteine nach einer chemischen Reaktion der Peptidbindung oder bestimmter Aminosäuren, Messung der UV-Absorption bei Anwesenheit von aromatischen Aminosäuren und die Trübungsmessung durch Ausflockung des gelösten Eiweißes durch Proteinfällmittel. Drei für die Analytik der Lebensmittel besonders wichtig gewordene Methoden werden im folgenden beschrieben (*Matissek et al., 1992*).

1. Gesamtproteingehalt nach Kjeldahl

Hierbei wird in der Regel der Stickstoffanteil nach dem Aufschluss der organischen Substanz mit Schwefelsäure bestimmt und anschließend der Proteingehalt unter Zuhilfenahme eines Faktors ($F=6,25$ für Kartoffeln) berechnet. Es wird angenommen, dass sich das SO_3 , das sich während des Aufschlusses bei hohen Temperaturen bildet, als Lewis-Säure an die Aminogruppe der Peptidbindung des Proteins anlagert, so dass sich die entsprechende Amidosulfonsäure bildet. Diese ist beständig gegen weitere Oxidation und geht durch Zersetzung in Ammoniumsulfat über.

Letzteres kann nach Freisetzen des Ammoniaks und Destillation mittels Säure-Base-Titration erfasst werden.

Da beim Kjeldahl-Aufschluss nicht nur Proteine und freie Aminosäuren erfasst werden, sondern auch nicht-proteingebundener Stickstoff (z. B. Nukleinsäuren und Ammoniumsalze), erfolgt die Angabe des organisch gebundenen Stickstoffs als „Gesamtstickstoff, berechnet als Protein“.

2. Reinproteingehalt nach Barnstein

Um den „Reinproteingehalt“ zu bestimmen, werden die echten Proteine zuerst abgetrennt. Dazu wird ihre Eigenschaft ausgenutzt, mit Schwermetallsalzen Fällungsreaktionen einzugehen, was zur Denaturierung führt. Die übrigen Stickstoffverbindungen bleiben in Lösung. Im Isolat wird der Stickstoffgehalt wie bei Kjeldahl bestimmt.

3. Protein-Bestimmung nach Lowry

Hierbei handelt es sich um ein sehr verlässliches und häufig angewandtes Verfahren zur quantitativen Bestimmung von löslichen Proteinen (*Bensadoun und Weinstein, 1976*), das es ermöglicht, sehr verdünnte Lösungen nach Eliminierung von störenden Substanzen auf ihren Proteingehalt zu untersuchen (*Peterson, 1977*). Die Methode beruht darauf, dass das sogenannte *Lowry-Reagenz*, eine Lösung aus Natriumcarbonat und Kupfersulfatartrat, mit den Peptidketten Komplexe bildet und sich nach Zugabe von Phenol-Reagenz violett färbt. Einflüsse durch andere Inhaltsstoffe werden durch Zugabe weiterer Reagenzien ausgeschaltet. Die Absorption der Flüssigkeit kann im Wellenlängenbereich von 500 bis 800 nm gemessen werden. Zur Auswertung ist es nötig, mittels verschiedener Verdünnungen eines Proteinstandards (meist Rinderalbumin) eine Kalibrierkurve zu erstellen, mit Hilfe derer dann der Proteingehalt der zu untersuchenden Lösungen ermittelt werden kann.

2.4.2 Gelelektrophoretische Trennmethoden

Die Elektrophorese, bei der sich geladene Teilchen in einem elektrischen Gleichstromfeld bewegen, wird in erster Linie für die qualitative Charakterisierung von Substanzgemischen, aber auch für die Reinheitskontrolle, die quantitative Bestimmung und zu Vorbereitungszwecken verwendet. Sie kann zur Analyse von ganzen Zellen, Nukleinsäuren, Proteinen, Peptiden, Aminosäuren, organischen Säuren und Basen, Arzneimitteln, Pestiziden und anorganischen Anionen und Kationen angewendet werden. Mit ihr kann alles getrennt werden, was eine Ladung trägt.

Für die Auftrennung von Proteinen eignen sich besonders elektrophoretische Techniken wegen ihrer Schnelligkeit, des relativ geringen apparativen Aufwandes und ihrer Trennleistung. Diese wird von keinem anderen physikalisch-chemischen Trennverfahren übertroffen.

Trägt man, wie in Abbildung 2.15 gezeigt, die Nettoladung eines Proteins gegen den pH-Wert auf, entsteht eine Titrationskurve, die die Abszisse am isoelektrischen Punkt schneidet. Hier besitzen Proteine eine Nettoladung von ~ 0 , was zur Folge hat, dass sie im elektrischen Feld nicht mehr wandern.

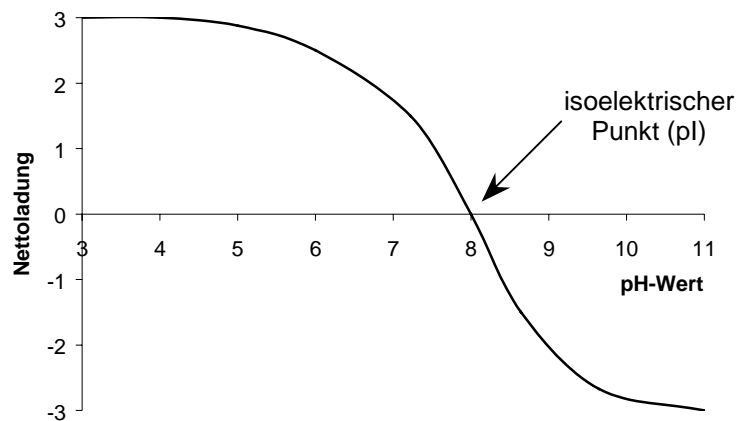


Abb. 2.15: Schematische Darstellung der Abhängigkeit der Nettoladung vom pH-Wert

Diese Probleme konnten im zweiten Fall beim Einsatz von immobilisierten pH-Gradienten (IPG) weitestgehend gelöst werden (*Bjellqvist et al., 1982*). Ein immobilisierte pH-Gradient wird durch Copolymerisation von Acrylamidmonomeren und Acrylamidderivaten mit puffernden Gruppen, den Immobilinen, erzeugt (allg. Formel: $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{R}$, wobei R entweder eine Carboxyl- oder tertiäre Aminogruppe ist). Das reaktive Ende ($\text{CH}_2=\text{CH}-$) wird mit Acrylamid fest in der Matrix verankert, während durch das puffernde Ende (R) der entsprechende pH-Wert gebildet wird. Diese so erzeugten immobilisierten pH-Gradienten sind von Beginn an kovalent an die Acrylamidmatrix gebunden. Der Vorteil dabei ist, dass dieser zeitstabil ist, womit jetzt eine echte Gleichgewichtsfokussierung aller Proteine möglich ist, d. h. nach Erreichen eines Endpunkts findet keine Verschiebung mehr statt. Somit sind die Trennungen sehr gut reproduzierbar. Ein weiterer Vorteil der isoelektrischen Fokussierung mit immobilisierten pH-Gradienten ist, dass sehr enge pH-Gradienten in den meisten Regionen des pH-Bereichs verwirklicht werden können (*Görg et al., 1988*). Die isoelektrische Fokussierung ist die zur Zeit leistungsfähigste eindimensionale elektrophoretische Trennmethode. Zur Differenzierung genügen Unterschiede in den isoelektrischen Punkten von 0,001 pH-Einheiten (*Righetti, 1987*).

Damit wurden neue Maßstäbe hinsichtlich Auflösungsvermögen und Reproduzierbarkeit gesetzt, die sich auch auf die zweidimensionale Technik auswirken. Bei letzterer werden zur weiteren Erhöhung der Trennleistung zwei Elektrophoresemethoden, die isoelektrische Fokussierung und die SDS-Polyacrylamidelektrophorese, kombiniert. Mit der hochauflösenden zweidimensionalen Elektrophorese können komplexe Proteingemische einer Zelle, eines Gewebes oder biologischen Flüssigkeit in hunderte oder gar tausende von Polypeptiden aufgetrennt werden. Die Auftrennung der Proteine erfolgt dabei nach zwei voneinander unabhängigen Parametern, den isoelektrischen Punkten in der ersten Dimension und den Molekulargewichten in der zweiten Dimension. Dabei entsteht ein Proteinphorogramm, aus dem wie aus einem Koordinatensystem das Molekulargewicht und der isoelektrische Punkt des jeweiligen Proteinspots abgelesen werden kann. Zur Beurteilung werden die Gele so betrachtet, dass der pH-Wert von links nach rechts und das Molekulargewicht von unten nach oben ansteigt.

In Tabelle 2.8 sind die verschiedenen Methoden der Gelelektrophorese und ihre Trennprinzipien zusammengefasst. Bei der Wahl der Elektrophoresetechnik muss der entsprechende Zweck festgelegt werden. So wird die hochauflösende 2 D-Gelelektrophoresetechnik in ihrer Trennleistung zwar von keinem anderen Elektrophoreseverfahren übertroffen, aber dafür erfordert sie auch einen sehr hohen Aufwand an Arbeit und Zeit.

Nach beendeter Elektrophorese müssen die Proteine sichtbar gemacht werden. Die Detektion kann direkt im Elektrophoresegel durch Anfärbung mit anionischen Farbstoffen (z. B. Coomassie Blau) oder mit Silbersalzen erfolgen. Die Nachweisempfindlichkeit der aufwendigeren Silberfärbungen (ca. 1-10 ng Protein je mm² Geloberfläche) liegt etwa 10-100 mal höher als die der Coomassiemethoden.

Tab. 2.8: Überblick über verschiedene Elektrophoresetechniken (*Westermeier, 1997*)

Methode	Trennprinzip	Sonstiges
SDS-Polyacrylamid-gelelektrophorese (SDS-PAGE)	Nach Molekülgröße (Molekulargewicht)	<ul style="list-style-type: none"> • Methode der Wahl für Molekulargewichtsbestimmungen • Molekularsiebeffekt kann durch Variation der Acrylamidkonzentration gesteuert werden • kann mit Porengradienten kombiniert werden • keine Enzymanfärbungen aufgrund der Proteindenaturierung möglich
Isoelektrische Fokussierung (IEF)	Nach isoelektrischem Punkt (pI)	<ul style="list-style-type: none"> • Elektrophorese in pH-Gradienten
Hochauflösende 2 D-Gelelektrophorese	1. Dimension nach pI (IPG) 2. Dimension nach Molekulargewicht	<ul style="list-style-type: none"> • Kombination aus IEF-IPG und SDS-PAGE • Trennung nach voneinander unabhängigen Parametern • Methode mit dem höchsten Auflösungsvermögen • ideal für die Auftrennung komplexer Proteingemische

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Materialien und Geräte

3.1.1 Materialien

Falls nicht ausdrücklich erwähnt, wurden analysenreine Chemikalien verwendet (p.a.-Qualität). Das Wasser war destilliert.

- Acrylamid, Amersham Pharmacia
- Ammoniumpersulfat, Serva
- L-Ascorbinsäure Testkombination, 409 677, Boehringer
- CHAPS, Sigma
- Dithiothreitol (DTT), Sigma
- Essigsäure, Merck
- Ethanol 96%, Merck 159010
- Formaldehydlösung (37%ig), Merck
- D-(-)-Fructose, 47739, Fluka
- Glycerin, Merck
- Glycin, Serva
- Harnstoff, Merck
- Immobiline mit $pK = 1,0; 10,3$ und 13 (käuflich nicht erhältlich); Geschenk von B. Bijellqvist, Amersham Pharmacia
- Immobiline II mit $pK = 3,6; 4,6; 6,2; 7,0; 8,5$ und $9,3$; Amersham Pharmacia
- Jodacetamid, Sigma
- Kaliumhexacyanoferrat (II) Trihydrat, P 9387, Sigma
- Kaliumhydroxid Plätzchen, 60130, Fluka
- Magnesiumacetat-Tetrahydrat, M 0631, Sigma
- 2-Mercaptoethanol, Serva
- Mischbettionenaustauscher MB3, Serva
- N,N-Methylenbisacrylamid, Amersham Pharmacia
- Natriumcarbonat (reinst), Merck
- Natriumchlorid (99,5 %), S 7653, Sigma
- Natriumdodecylsulfat (SDS), 20763, Serva

- Natriumthiosulfat-Pentahydrat, Merck
- Natronlauge 1 N, 106839, Merck
- Nitrat Test-Kombination, 905 658, Boehringer
- N-Octanol, O 4500, Sigma
- PefablockSC (4-(2-aminoethyl)-benzolsulfonylfluoridhydrochlorid), Merck
- Pharmalyte pH 3-10, Amersham Pharmacia
- Phosphorsäure (85%), Merck
- Meta-Phosphorsäure, M 5043, Sigma
- Protein Assay Kit P5656, Sigma
- Repel Silane, Amersham Pharmacia
- Rinderalbumin, A 3294, Sigma, in Wasser gelöst in den Konzentrationen 0,01-0,5 %
- Rinderhämoglobin, H 2500, Sigma, in Wasser gelöst in den Konzentrationen 0,01-0,5 %
- Saccharose/D-Glucose-/D-Fructose Test-Kombination, 716 260, Boehringer
- Salzsäure 1 N, 159415, Merck
- Seesand, 84880, Fluka
- Serva Blau G, Serva
- Silbernitrat, Merck
- Stärke Test-Kombination, 409 677, Boehringer
- Tetramethylethyldiamin (TEMED), Serva
- Titriplex III, Merck
- Trichloressigsäure (TCA) 10%-ig, V27242, Riedel-de Haën
- Tris(hydroxymethyl)-aminoethan (Tris), Sigma
- Zinksulfat-Heptahydrat, Z 4750, Sigma

3.1.2 Geräte und Hilfsmittel

- Deckglasplatte 125x250x3 mm mit U-förmigem Abstandshalter (0,5 mm stark), Amersham Pharmacia
- Elektroden-Wicks Ultrapur, Bio Rad
- Elektrophoresekammer Multiphor II, Amersham Pharmacia
- Faltenfilter (Ø110), Schleicher & Schuell
- Färbeschalen aus Glas (300x250 mm Innengröße), Pyrex-Glasschalen
- Flowmeter, Porter Instrument Company
- Gelträgerfolien (125x260 mm bzw. 203x260 mm) GelBond PAG Film FMC, BIOzym
- Glasplatte 125x260x3 mm, Amersham Pharmacia
- Gradienten- und Rehydratisierkit (Glasplatten m. Dichtung 125x260 mm bzw. 203x260 mm), Amersham Pharmacia
- Gradientenmischer (2x15 ml), Amersham Pharmacia
- Photometer Uvicon, Biotek Kontron
- Probenapplikationsstreifen aus Silikon, Amersham Pharmacia
- Speidel-Hydro-Press-90 L, Speidel
- Stromversorgungsgerät Macrodrive 5, Amersham Pharmacia

3.1.3 Kartoffelproben

Als Modellproteinlösung für Pflanzen wurde Kartoffelfruchtwasser hergestellt. Die Kartoffelknollen (*Solanum tuberosum* var. *agria*) wurden auf dem lokalen Markt erworben (Grassl, Mintraching-Grüneck).

Zur Fruchtwassergewinnung wurden 50 kg Kartoffeln gewaschen und ausgepresst. Das gewonnene Fruchtwasser wurde filtriert und in 20 ml-Portionen bei -50 °C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

Als Realprobe wurde Kartoffelschlempe verwendet. Dazu wurden 20 L Kartoffelschlempe aus dem Sumpf der Rektifikationskolonne der Staatlichen Versuchs- und Lehrbrennerei Weißenstephan entnommen, ca. 100 °C heiß in einen sterilen Behälter

gefüllt, nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur in 200 ml-Portionen in Plastikbeuteln eingeschweißt und bis zur weiteren Verwendung bei -50°C aufbewahrt.

3.2 Methoden

3.2.1 Analyse von Kartoffelfruchtwasser und Kartoffelschlempe

In einem ersten Schritt wurde das Kartoffelfruchtwasser hinsichtlich seiner Proteinfractionen mittels SDS-PAGE und hochauflösender 2 D-Gelelektrophorese charakterisiert (vgl. 3.2.4). Außerdem wurde der Einfluss des pH-Wertes des eingesetzten Kartoffelfruchtwassers auf die Gelelektrophorese untersucht.

Zur Bestimmung des Stärkegehalts wurde 1:10 verdünntes Kartoffelfruchtwasser herangezogen. Es wurden jeweils 100 μl eingesetzt. Ansonsten wurde genau nach der Testvorschrift (Stärke Test-Kombination, 409 677 von Boehringer) vorgegangen.

Zur Herstellung des Bestimmungsansatzes für die Nitratbestimmung wurden 15,00 g des Kartoffelfruchtwassers in einen 100 ml Messkolben eingewogen und mit ca. 20 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ gemischt. Anschließend wurden jeweils 5 ml Carrez I-Lösung (3,60 g Kaliumhexacyanoferrat-II-Trihydrat/100 ml) und Carrez II-Lösung (7,20 g Zinksulfat-Heptahydrat/100 ml) zugefügt, gemischt und mit 1 N NaOH auf pH 8 eingestellt. Danach wurde die Probe filtriert und 100 μl zum Test eingesetzt. Danach wurde genau nach Vorschrift (Nitrat Test-Kombination, 905 658 von Boehringer) vorgegangen.

Bei der Bestimmung von Saccharose/D-Glucose/D-Fructose wurden zur Herstellung des Bestimmungsansatzes 50 g Kartoffelfruchtwasser in ein 250 ml-Becherglas eingewogen und mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ auf ca. 150 ml aufgefüllt. Dann wurden nacheinander je 5 ml Carrez I und Carrez II-Lösung (s.o.) zugegeben. Nach dem Mischen wurde mit 0,1 N NaOH ein pH-Wert von 7,0-7,5 eingestellt und der Inhalt des Becherglases in einen 250 ml-Messkolben gegossen; danach wurden 0,3 ml n-Octanol zugefügt. Das Gemisch wurde so lange geschüttelt, bis der sich bildende Schaum verschwunden war. Dann wurde auf 250 ml aufgefüllt, gemischt und filtriert. Hiervon wurden 100 μl für den Test (Saccharose/D-Glucose-/D-Fructose Test-Kombination, 716 260 von Boehringer) eingesetzt.

Für den L-Ascorbinsäurenachweis wurden 50 g des Fruchtwassers mit 50 ml meta-Phosphorsäure (15 % w/v) und 1 ml n-Octanol gemischt. Mit 2 N KOH wurde pH 3,5-4,0 eingestellt, die Mischung quantitativ in einen 500 ml-Messkolben überführt und mit H₂O_{dest.} auf 500 ml aufgefüllt. Nach der Filtration wurden 500 µl für den Test eingesetzt (L-Ascorbinsäure Testkombination, 409 677 von Boehringer).

Die Trockenmasse wurde nach §35 LMBG 06.00-3 (1980) durchgeführt und die Aschebestimmung nach §35 LMBG 06.00-4 (1980). Die Analyse der Mineralstoffe erfolgte mit Atomabsorptionsspektroskopie (AAS) nach den folgenden Methoden: Calcium nach DIN 38406-E3-1, Eisen nach MEBAK III 8.4.1, Kalium nach DIN 38406-E13, Kupfer nach DIN 38406-E7-1, Magnesium nach DIN 38406-E3-1, Mangan nach MEBAK III 8.4.5, Natrium nach DIN 38406-E14, Zink nach DIN 38406-E8-1 sowie Chlorid und Hydrogenphosphat nach DIN EN ISO 10304-1. Diese Messungen wurden von der staatlichen brautechnischen Prüf- und Versuchsanstalt der Technischen Universität München–Weihenstephan durchgeführt.

Die Kartoffelschlempe wurde mit einem Standard-Protein-Assay (vgl. 3.2.3) hinsichtlich des Gesamtproteins und mit AAS hinsichtlich der Mineralstoffzusammensetzung untersucht.

3.2.2 Zerschäumung

Es wurden, falls nicht ausdrücklich anders erwähnt, wegen des hohen zeitlichen Aufwands lediglich Doppelbestimmungen durchgeführt. Als Gas wurde ausschließlich N₂ verwendet. Es wurde bei der Probenahme t=0 gesetzt, wenn der erste Schaum das Zerschäumungrohr verließ. Die Probenahme erfolgte durchwegs durch Sammeln über bestimmte Zeitintervalle so, dass ca. 5 ml Foamat für die nachfolgenden Analysen zur Verfügung standen. Nach Ende der letzten Schaumprobenahme wurde der Versuch abgebrochen und der gesamte Rückstand analysiert. Der Versuchsablauf der Zerschäumung ist in Abbildung 3.1 dargestellt.

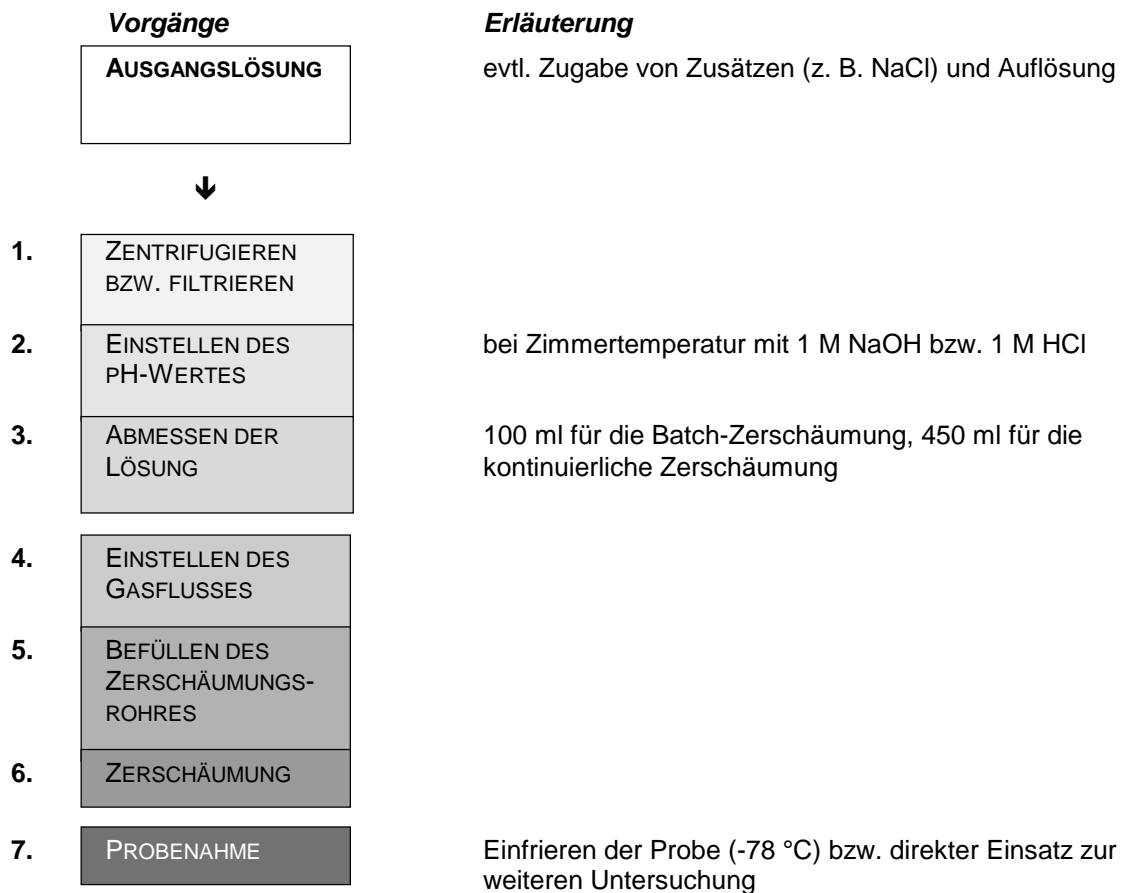


Abb. 3.1: Einzelne Schritte der Zerschäumung

3.2.2.1 Batch-Verfahren

Es wurden verschiedene Proteine hinsichtlich ihrer Eignung zur Zerschäumung getestet. Vorversuche ergaben, dass von diesen nur Rinderhämoglobin und Rinderalbumin eine akzeptable Zerschäumung ergaben. Hämoglobin war zwar nicht besonders geeignet, da es im Kartoffelfruchtwasser nicht vorhanden und auf Kartoffeln nicht übertragbar ist, aber es war trotzdem geeignet, um das Verfahren als solches zu untersuchen. Im Rahmen der Optimierung der Verfahrensweise anhand der Referenzproteine Rinderhämoglobin und Rinderalbumin wurden die folgenden Parameter untersucht, wobei der anfängliche Gasfluss 50 ml/min betrug:

1. Konzentration: 0,010-0,500 g/100 ml Protein
2. Gasflussgeschwindigkeit: 20-100 ml/min
3. NaCl-Zugabe: 0,001-1,00 g/100 ml
4. D-(-)-Fructose-Zugabe: 0,001-1,00 g/100 ml
5. pH-Wert: pH 3-11

Dabei wurde die Gesamtproteinanreicherung im Schaum untersucht. Bei der Bestimmung des Einflusses der Parameter 2 bis 5 wurde eine Proteinkonzentration von 0,05 g/100 ml gewählt. Die Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration der Zerschäumungsproben von Rinderhämoglobin und Rinderalbumin erfolgte photometrisch bei 405 nm bzw. 280 nm anhand einer Eichgeraden (Verdünnungsreihe zwischen 0,001 und 1 % der jeweiligen Proteinlösung).

Anschließend wurden die Parameter für die Batch-Zerschäumung von Kartoffelfruchtwasser optimiert. Dieses wurde in den Verhältnissen 1:1, 1:10, 1:20 und 1:100 mit H₂O_{dest.} verdünnt und in der Zerschäumungsapparatur mit 18 mm Durchmesser (Abbildung 3.2) beim natürlichen pH-Wert (ca. 5,9) zerschäumt. Die Gesamtproteine wurden mit einem Standard-Protein-Assay (vgl. 3.2.3) untersucht.

Für die weiteren Versuche erwies sich 1:20 verdünntes Kartoffelfruchtwasser als am besten geeignet. Folgende Parameter wurden variiert:

1. Gasflussgeschwindigkeit: 10-100 ml/min (pH 5,9)
2. Kochsalzzugabe: 0,001-1,00 g/100 ml (pH 5,9)
3. pH-Wert: pH 2-12

Die Abhängigkeit der Zerschäumung vom pH-Wert wurde zusätzlich mit einem großen Zerschäumungsrohr (gleicher Aufbau, aber Durchmesser 40 mm und Gasfluss 500 ml/min) untersucht. Dazu wurde 1:10 bzw. 1:20 verdünntes Kartoffelfruchtwasser bei pH-Werten von 3 bis 11 zerschäumt und eine mögliche fraktionierte Anreicherung der Proteine mittels SDS-PAGE (vgl. 3.2.4) analysiert. Die bei pH 3 und pH 9 erhaltenen Zerschäumungsproben ohne Salzzugabe sowie Zerschäumungsproben mit 0,1 bzw. 1,0 g/100 ml NaCl-Zugabe (1:20 verdünntes Kartoffelfruchtwasser) wurden außerdem mit Hilfe der 2 D-Gelelektrophorese (IPG 3-12) untersucht. Die Gesamtproteinbestimmung erfolgte wie oben angegeben. Die Analyse der Zusammensetzung der Proteine erfolgte bei einigen Zerschäumungsproben gelelektrophoretisch (vgl. 3.2.4):

- SDS-PAGE mit den Proben von pH 3-9 (jeweils 1:10 und 1:20 verdünnt)
- hochauflösende 2 D-Gelelektrophorese mit den Proben von pH 3 und 9 ohne und mit NaCl-Zugabe.

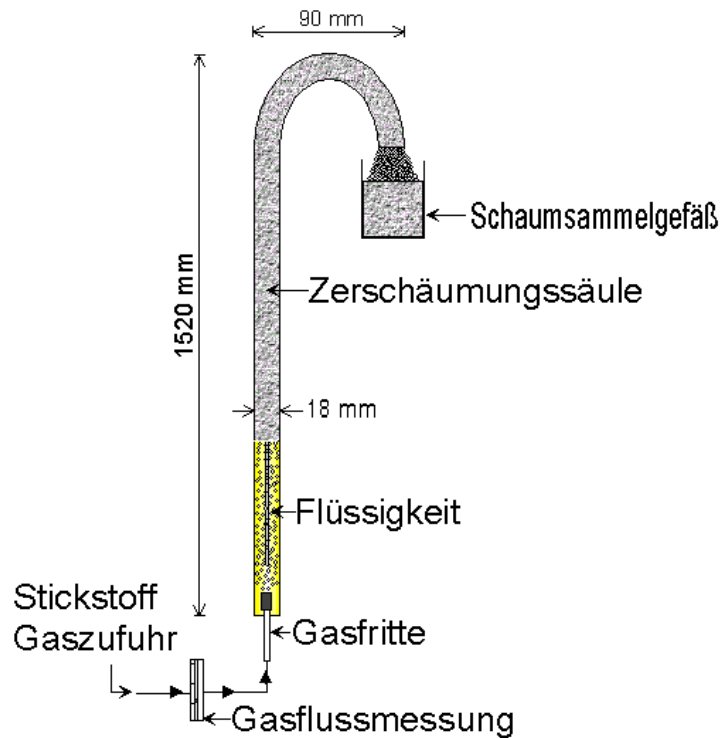


Abb. 3.2: Schema der Batch-Zerschäumungsapparatur.

Die Kartoffelschlempe wurde mit einem Faltenfilter filtriert und 1:4 mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ verdünnt. Die pH-Werte von 2-12 wurden mit 1 N NaOH bzw. 1 N HCl eingestellt. Anschließend wurden 100 ml der verdünnten Schlempe für die Batch-Zerschäumung (vgl. 3.2.2.1) in das Zerschäumungsrohr überführt und der Gasfluss von 80 ml/min gestartet. Es wurden zwei Schaumproben im Abstand von 8 min genommen.

3.2.2.2 Kontinuierliches Verfahren

Die kontinuierliche Zerschäumung (Abbildung 3.3) wurde mit einem konstanten Flüssigkeitszulauf von 15 ml/min in den Flüssigkeitsbereich der Säule vorgenommen. Durch dosiertes Abfließen (8 ml/min) der abgereicherten Lösung konnte der Flüssigkeitsspiegel konstant bei 450 ml gehalten werden. Der N₂-Gasfluss betrug durchgehend 500 ml/min. Die Säule wurde zunächst mit 450 ml Ausgangslösung aufgefüllt. Insgesamt wurden 2 L Ausgangslösung (Verdünnung von Kartoffelfruchtwasser mit H₂O_{dest.} im Verhältnis 1:20) zerschäumt.

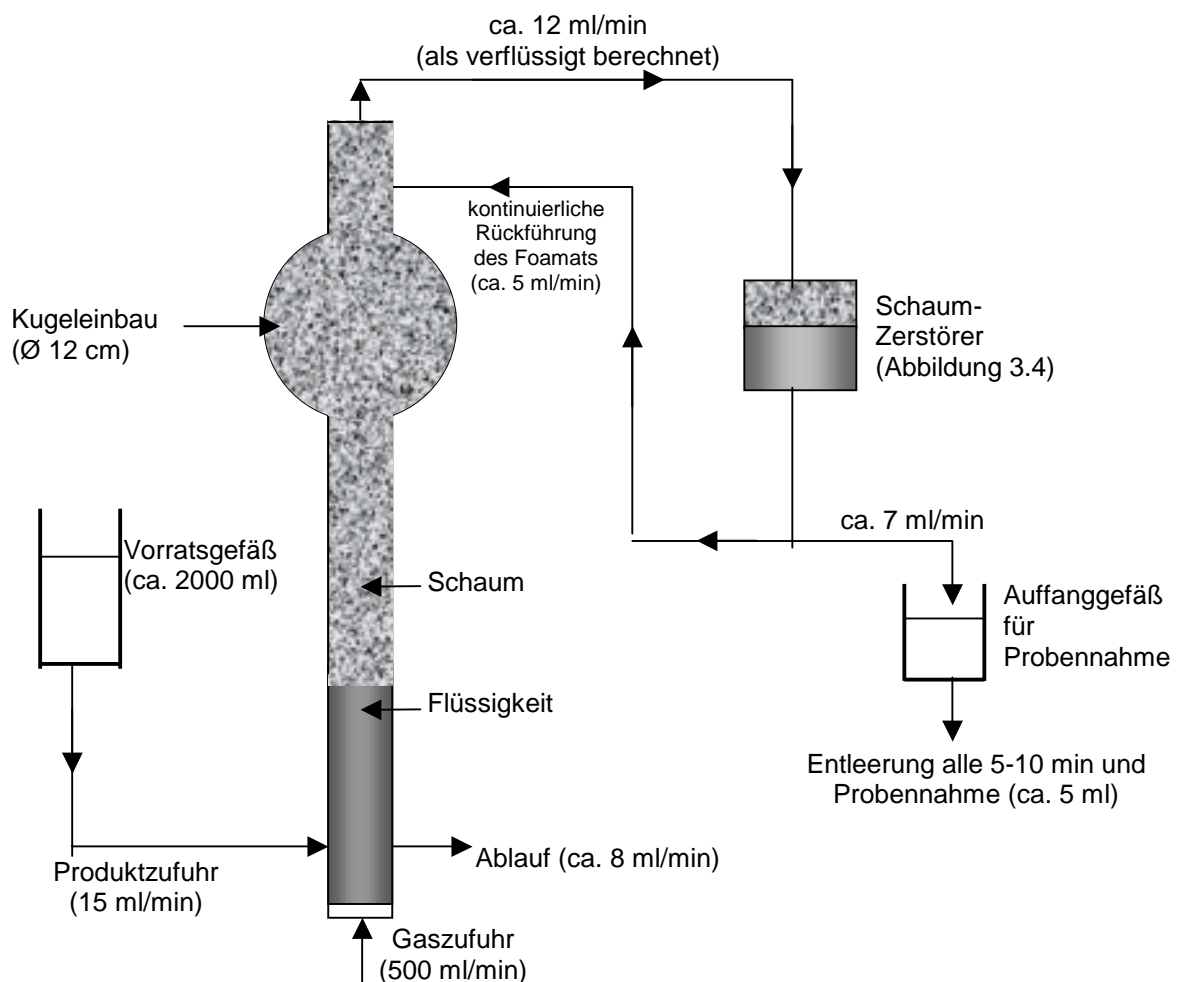


Abb. 3.3: Prinzip der kontinuierlichen Zerschäumungsapparatur;
Rohrdurchmesser 40 mm, Rohrlänge 940 mm

Ferner wurde ein Teil des gewonnenen Foamats (ca. 12 ml/min) in den oberen Teil der Zerschäumungssäule zurückgeführt (ca. 5 ml/min). Das übrige Foamat (ca. 7 ml/min) wurde in einem Auffanggefäß gesammelt. Die Probenahme lief immer so ab, dass dieses Gefäß alle 5-10 min komplett entleert wurde und daraus für die anschließenden Analysen ca. 5 ml Probenflüssigkeit entnommen wurden.

Der Schaum wurde mittels eines variierten Nachbaus des Schaumzerstörers nach *Banerjee et al. (1993)* (Abbildung 2.7) verflüssigt. Diese Apparatur (Abbildung 3.4) bestand aus einer 100 ml-Saugflasche, die mit zwei Teflonhähnen versehen war, aus einer Keramiknutsche, einem Glasrohr, Glasperlen und einem Gummistopfen. Die Nutsche wurde mit dem Gummistopfen dicht auf die Saugflasche gepresst. Das Glasrohr wurde in die Nutsche gesteckt und mit einem Parafilm am oberen Ende der Nutsche stabilisiert.

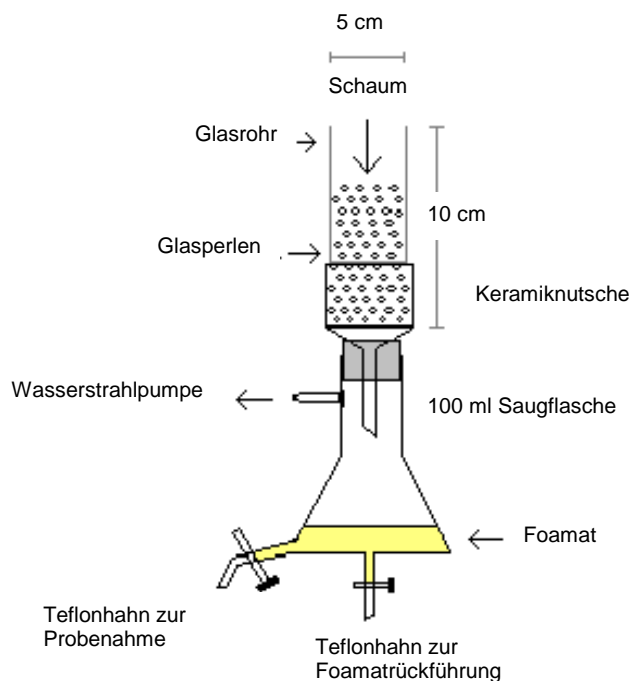


Abb. 3.4: Schematischer Aufbau des eingesetzten Schaumzerstörers

Zur Inbetriebnahme wurden die Glasperlen eingefüllt, die Teflonhähne geschlossen und die Wasserstrahlpumpe gestartet. Durch den Unterdruck wurde der Schaum durch die Glasperlen in die Saugflasche gezogen und dadurch zerstört. Das Foamat

sammelte sich am Boden der Flasche. Dieses wurde sowohl zur Rückführung in die Säule als auch zur Probennahme verwendet.

In einem ersten Schritt wurde der Probenahmezeitpunkt optimiert. Hierzu wurde 240 min lang ohne Schaumrückführung zerschäumt. In Zeiträumen von 10 min wurde das Auffanggefäß entleert und daraus die Gesamtproteinanreicherung untersucht (pH 5,9). Im nächsten Schritt wurde eine kugelförmige Erweiterung zur Verbesserung der Drainage in die Apparatur eingebaut (Abbildung 3.3). Es wurde erst 30 min lang zerschäumt (pH 5,9). Danach wurde das Auffanggefäß über einen Zeitraum von 25 min alle 5 min entleert und wiederum hinsichtlich der Gesamtproteinanreicherung untersucht. Des weiteren wurde untersucht, wie stark sich eine teilweise Rückführung des Foamates in den Schaum auf die Proteinanreicherung auswirkt. Dabei wurden pH-Werte von 3, 5, 7, 9 und 11 eingestellt. Es wurde wiederum erst 30 min lang zerschäumt, und anschließend wurde das Auffanggefäß über einen Zeitraum von 60 min alle 10 min entleert und hinsichtlich der Gesamtproteinanreicherung untersucht.

Der Einfluss des pH-Wertes wurde im Bereich 3 bis 11 mit einer Zerschäumungsdauer von 70 min getestet, wobei die Ausgangslösung in den Schaum zugeführt wurde. Bei der Variante mit Kugeleinbau und Produktzufuhr in die Flüssigkeit bzw. in den Schaum wurde ein pH von 2-12 eingestellt und zusätzlich eine mögliche Proteinfractionierung mittels SDS-PAGE (vgl. 3.2.3) untersucht. Die Proben bei pH 3 und pH 9 mit Produktzufuhr in die Flüssigkeit wurden außerdem mittels 2 D-Gelelektrophorese (IPG 3-12) analysiert (vgl. 3.2.3).

Für die kontinuierliche Zerschäumung der Kartoffelschlempe wurden 3 L an 1:4 verdünnter Kartoffelschlempe hergestellt. Nach Befüllen des Vorratsbehälters wurde die Gaszufuhr (ebenfalls 500 ml/min) gestartet. Es wurde der Aufbau mit Kugeleinsatz und Einspeisung in den Schaum verwendet (Abbildung 3.3, jedoch ohne Rückführung des Kopfproduktes). Das Auffanggefäß wurde alle 10 min entleert (Gesamtzerschäumungsdauer von 50 min) und daraus die Gesamtproteinanreicherung untersucht.

3.2.3 Gesamtproteinbestimmung

Die Gesamtproteinbestimmung der Referenzproteine Rinderhämoglobin und Rinderalbumin erfolgte photometrisch bei 405 bzw. 280 nm anhand einer Eichgeraden, erstellt mit denselben Proteinen.

Zur Bestimmung des Proteingehaltes in den Kartoffelfruchtwasserproben wurde ein Standard-Protein-Assay verwendet, bestehend aus einem alkalischen Kupfertartrat-Reagens, das mit Protein nach der Zugabe einer phenolischen Lösung einen farbigen Komplex bildet. Die Extinktion wurde bei 540 nm gemessen.

Um den Einfluss von unterschiedlichen Konzentrationen der Ausgangslösung auf die Zerschäumung zu eliminieren, wurde für Vergleiche das Proteinanreicherungsverhältnis, definiert als R , berechnet:

$$R = \frac{c_E}{c_0}$$

c_E : Proteinkonzentration der Schaumprobe
 c_0 : Proteinkonzentration der Ausgangslösung

Von einer Anreicherung wird dann gesprochen, wenn die Proteinkonzentration des Schaums größer ist als die der Ausgangslösung ($R > 1$).

3.2.4 Gelelektrophorese

Die Methoden zur Durchführung der Elektrophorese nach *Görg et al. (1988, 1995, 1999, 2000)*, *Görg und Weiss (1998)* und *Görg (1991, 1998)* wurden zugrundegelegt.

1. Herstellung von SDS-Gelen für die eindimensionale SDS-PAGE und die zweite Dimension der 2D-Elektrophorese

Reagenzlösungen:

Acrylamid-Bisacrylamid Lösung: (30 % T, 4 % C)

28,8 g Acrylamid und 1,2 g Bisacrylamid wurden in etwa 80 ml $H_2O_{\text{dest.}}$ gelöst, auf 100 ml aufgefüllt, 1 g Mischbettionenaustauscher Amberlite MB-1 zugeben, 10 min gerührt und anschließend filtriert. Die Lösung war max. zwei Wochen bei 4 °C haltbar.

Gelpuffer: (1,5 M Tris-HCl pH 8,8; 0,4 % SDS)

18,2 g Tris-Base und 0,4 g SDS wurden in etwa 80 ml H₂O_{dest.} gelöst, mit 4 N HCl auf pH 8,8 titriert und mit H₂O_{dest.} auf 100 ml aufgefüllt. Die Lösung war bei 4 °C zwei Wochen haltbar.

Ammoniumpersulfatlösung: (40 % APS)

0,4 g Ammoniumpersulfat wurden in 1 ml H₂O_{dest.} gelöst. Die Lösung war 2-3 Tage bei 4 °C haltbar.

Durchführung:

Die Sammelgel- und Trenngellösung wurden nach den in den Tabellen 3.1 bzw. 3.2 beschriebenen Schemata hergestellt.

Tab. 3.1: Pipettierschema für ein SDS-Gel für die eindimensionale SDS-PAGE

	Sammelgel 4,5% T	Trenngel 12% T
Acrylamid/Bisacrylamid	1,50 ml	8,00 ml
Gelpuffer	2,50 ml	5,00 ml
Glycerin	3,75 g	2,50 g
Dest. Wasser	3,00 ml	5,00 ml
<i>Vermischung und Katalysatorzugabe (kurz vor dem Gießen)</i>		
TEMED	5 µl	10 µl
APS-Lösung	10 µl	20 µl
Endvolumen	10,0 ml	20,0 ml

Tab. 3.2: Pipettierschema für ein SDS-Gel für die zweite Dimension der 2D-Elektrophorese

	Sammelgel 6% T	Trenngel 12% T
Acrylamid/Bisacrylamid	2,00 ml	12,0 ml
Gelpuffer	2,50 ml	7,50 ml
Glycerin	3,75 g	5,00 g
Dest. Wasser	2,50 ml	6,50 ml
<i>Vermischung und Katalysatorzugabe (kurz vor dem Gießen)</i>		
TEMED	5 µl	15 µl
APS-Lösung	10 µl	30 µl
Endvolumen	10,0 ml	30,0 ml

Anschließend wurde die Sammelgellösung zügig in die gekühlte Gießkassette eingefüllt. Bei den Gelen für die eindimensionale SDS-PAGE sollte das Sammelgel etwa 1 cm über den Slotformern enden (entspricht ca. 4,5 ml), bei den Gelen für die zweite Dimension sollte es $\frac{1}{4}$ der gesamten Gellänge betragen. Anschließend wurde vorsichtig mit der Trenngellösung überschichtet. Nach weiterem 10-minütigem Stehen bei Raumtemperatur wurde das Gel bei 50 °C polymerisiert. Anschließend konnte das Gel entweder unmittelbar für die Elektrophorese eingesetzt oder bis zu 24 h im Kühlschrank gelagert werden.

2. Herstellung der SDS Gele für das ISO-Dalt Vertikalsystem

Reagenzlösungen:

Bromphenolblaulösung:

Zur Herstellung von 10 ml Lösung wurden 25 ml Bromphenolblau in 10 ml Trenngelpuffer gelöst. Die Lösung war bei 4 °C mehrere Wochen haltbar.

Ammoniumpersulfatlösung: (10 %)

1 g Ammoniumpersulfat wurde in 10 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ gelöst. Bei 4 °C war die Lösung 2-3 Tage haltbar.

Acrylamid-Lösung: (30,8 % T; 2,6 % C)

300 g Acrylamid und 8 g Bisacrylamid wurden in 500 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ gelöst, mit einer Spatelspitze Mischbettionenaustauscher versetzt, gerührt, filtriert und auf 1000 ml aufgefüllt.

Gelpuffer: (1,5 M Tris pH 8,6; 0,4 % SDS)

90,83 g Tris-Base und 2 g SDS wurden in etwa 300 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ gelöst, mit 4N HCl auf pH 8,6 titriert und mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ auf 500 ml aufgefüllt.

Gelpuffergesättigtes 2-Butanol:

20 ml Gelpuffer wurden mit 30 ml 2-Butanol geschüttelt. Nachdem sich die Phasen wieder getrennt hatten, wurde die 2-Butanolphase abdekantiert.

Glycerinlösung: (50 % Glycerin)

Eine 50%ige Lösung wurde mit 0,001 % Bromphenolblau versetzt.

Gellösung:

Es wurden 591 ml Acrylamidlösung, 350 ml Gelpuffer, 396 ml H₂O_{dest.} und 70 g Glycerin (100 %) gemischt und kurz vor dem Gießen 7 ml APS-Lösung (10 %) und 66 µl TEMED zugegeben.

Tankpuffer:

19,9 g SDS, 300 g Glycin, 58,0 g Tris wurden in 3 L H₂O_{dest.} gelöst. Kurz vor Gebrauch wurde mit H₂O_{dest.} auf 19,6 L aufgefüllt.

Agaroselösung: (0,5 %)

100 ml Tankpuffer wurden mit 500 mg Agarose und 300 µl Bromphenolblau aufgekocht und im Wasserbad auf 80 °C temperiert.

Durchführung:

Jeweils zwei durch ein Scharnier verbundene Glasplatten bildeten eine Gießkassette, in welche die 200 x 237 x 1 mm³ großen SDS-Gele hergestellt wurden. Die gesamte Füllhöhe der Kassette konnte nicht genutzt werden, da 2 cm für den IPG-Streifen und die Agaroselösung frei bleiben mussten. Daraus ergab sich eine tatsächliche Gelhöhe von 18 cm. Insgesamt wurden 22 Gießkassetten alternierend mit einem Stück Klarsichtfolie in die Gießkammer eingeordnet.

Zuerst wurde das Gießreservoir, dessen Auslauf mit einem Trichter verschlossen war, mit der Glycerinlösung befüllt und dann die mit Katalysatoren versetzte Gellösung über den Trichter in die Gießkammer luftblasenfrei eingefüllt. Anschließend wurde der Trichter herausgezogen, wodurch die Gellösung von der Glycerinlösung unterschichtet wurde. Der untere Spiegel der Gellösung reichte dadurch genau bis zur Unterkante der Gießkassetten. Um nach der Polymerisation eine waagrechte Oberkante der Gele zu erhalten, musste jedes Gel mit 1 ml Gelpuffer-gesättigtem

2-Butanol überschichtet werden. Die anschließende Polymerisation fand über Nacht statt.

Nach beendeter Polymerisation wurde die Gießkammer in eine Wanne gestellt und geöffnet. Die Glasplatten wurden entnommen und von außen gründlich mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ gewaschen, wobei auch das Butanol von der Geloberkante entfernt wurde. Um die noch enthaltene Waschflüssigkeit ablaufen zu lassen, wurden die Glaskassetten mit der Oberkante nach unten in ein Drahtgestell (Geschirrtrockner) gestellt. Die beiden äußeren Gele mussten verworfen werden, da bei ihnen keine gleichmäßige Dicke gewährleistet war. Nicht sofort benötigte Gele konnten in Frischhaltefolie eingepackt bis zu zwei Tage bei 4 °C aufbewahrt werden.

3. Herstellung der IEF-Gele mit immobilisierten pH-Gradienten

Reagenzlösungen:

Acrylamid-Bisacrylamid Lösung: (30 % T; 4 % C)

28,8 g Acrylamid und 1,2 g Bisacrylamid wurden in etwa 80 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ gelöst, auf 100 ml aufgefüllt, 1 g Mischbettionenaustauscher Amberlite MB-1 zugegeben, 10 min gerührt und filtriert. Die Haltbarkeit betrug ca. eine Woche bei 4 °C

Ammoniumpersulfatlösung (APS): (40 %)

Es wurden 0,4 g Ammoniumpersulfat in 1 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ gelöst. Die Haltbarkeit war 2-3 Tage bei 4 °C

Immobiline-Starterlösungen: (Immobiline pK 1; pK 3,6; pK 4,6; pK 6,2; pK 7,0; pK 8,5; pK 9,3; pK 10,3; pK 13)

Durchführung:

Die IEF-Gele mit immobilisierten pH-Gradienten wurden mit Hilfe eines Mikrogradientenmischers auf einen GelBond PAG-Film in einer Vertikalgießkassette polymerisiert. Diese bestand aus zwei Glasplatten, von denen die Deckplatte eine 0,5 mm dicke Silikondichtung trug, wodurch $190 \times 250 \times 0,5 \text{ mm}^3$ große Gele gegossen werden konnten.

Für die Gelherstellung wurden zwei Immobiline-Starterlösungen benötigt, die unterschiedliche Mengen an Glycerin enthielten (saure Lösung mit höherer Dichte bzw. basische Lösung mit geringerer Dichte), um einen Dichtegradienten aufzubauen, der den pH-Gradienten vor der Polymerisation des Gels stabilisierte. Beide Starterlösungen enthielten gleiche Konzentrationen an Acrylamid und Bisacrylamid, wobei deren Konzentration relativ niedrig gehalten wurde (4% T, 4 %C), um den Molekularsiebefekt der Matrix möglichst gering zu halten.

Die pH-Werte der beiden Starterlösungen entsprachen dem Anfangs- und Endpunkt der gewünschten pH-Gradienten (4-9; 3-12) und wurden durch Zugabe der in Tabelle 3.3 angegebenen Immobilingehalten eingestellt. Zur Verbesserung der Polymerisation wurden beide Starterlösungen mit 1N Natronlauge bzw. 1 N Essigsäure auf pH 7,0 titriert. Die IPG-Gele wurden mit Hilfe der Gradientengießtechnik hergestellt. Dazu wurde der Gradientenmischer auf einen Magnetrührer gestellt und ein Magnetrührstäbchen in die Mischkammer gegeben. Die Öffnung des Auslaufschlauches wurde in den Spalt am oberen Rand der Gießkassette gesteckt und das Ventil des Auslaufschlauches geschlossen. Für ein Gel der Größe 190 x 250 x 0,5 mm³ wurden je 12 ml der beiden Immobiline-Starterlösungen benötigt.

Die saure Lösung wurde in die Mischkammer des Gradientenmischers pipettiert. TEMED und Ammoniumpersulfat wurden zugegeben und der Magnetrührer eingeschaltet (ca. 500 U/min), um die Lösungen zu durchmischen. Das Durchlassventil wurde kurz geöffnet und sofort wieder geschlossen, um den Verbindungstunnel zu entlüften. Eventuell in das Reservoir eingeflossene Lösung wurde wieder in die Mischkammer zurückpipettiert. Nun wurde die basische Lösung in das Reservoir pipettiert, die Katalysatoren wurden zugegeben und mit Hilfe eines Spatels gemischt. Nach Öffnen des Durchlassventils und der Auslaufklemme wurde die vorgekühlte Gießkassette bis zur Oberkante gefüllt. Hierbei war besonders auf ein gleichmäßiges Absinken der Flüssigkeitspegel in der Mischkammer und im Reservoir des Gradientenmischers zu achten. Die Auslaufgeschwindigkeit sollte so gewählt sein, dass der Gießvorgang nach 2-3 min beendet ist.

Tab. 3.3: Pipettierschema für IEF-IPG-Gele mit linearen pH-Gradienten

linearer pH Gradient	pH 4-9		pH 3-12	
	saure Lösung	basische Lösung	saure Lösung	basische Lösung
Immobiline pK 1,0	-	-	1287 µl	-
Immobiline pK 3,6	829 µl	147 µl	306 µl	-
Immobiline pK 4,6	235 µl	424 µl	413 µl	-
Immobiline pK 6,2	232 µl	360 µl	557 µl	335 µl
Immobiline pK 7,0	22 µl	296 µl	496 µl	168 µl
Immobiline pK 8,5	250 µl	71 µl	112 µl	698 µl
Immobiline pK 9,3	221 µl	663 µl	84 µl	157 µl
Immobiline pK 10,3	-	-	25 µl	342 µl
Immobiline pK 13	-	-	1 µl	258 µl
Acryl-amid/Bis (28,8/1,2)	2,0 ml	2,0 ml		
Acryl-amid/Bis (29,1/0,9)	-	-	2,25 ml	2,25 ml
Dest. Wasser	8,3 ml	11,1 ml	6,45 ml	10,75 ml
Glycerin (100%)	3,75 g	-	3,75 g	-
<i>Titration der Lösungen vor Zugabe der Polymerisationskatalysatoren mit 1 N Natronlauge bzw. 1 N Essigsäure auf pH 7; Vermischung und Katalysatorzugabe (erst in der Mischkammer)</i>				
TEMED (100%)	10,0 µl	10,0 µl	9,0 µl	9,0 µl
APS (40%)	15,0 µl	15,0 µl	15,0 µl	15,0 µl
Endvolumen	15,0 ml	15,0 ml	15,0 ml	15,0 ml

Um den Dichtegradienten (pH-Gradienten) exakter ausbilden zu lassen, wurde die Gießkassette 15 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Dann wurde das Gel 60 min bei 50 °C im Trockenschrank auspolymerisiert. Nachdem das Gel auf Zimmertemperatur abgekühlt war, wurde es vorsichtig aus der Kassette genommen und 6 x 15 min in H₂O_{dest.} und anschließend 30 min in 2%iger Glycerinlösung gewaschen. Danach wurde es über Nacht in einem staubfreien Schrank mit einem Ventilator getrocknet, die Geloberfläche mit einer Klarsichtfolie abgedeckt und in eine Plastikfolie eingeschweißt. Darin konnte es bei -20 °C bis zum weiteren Gebrauch gelagert werden (maximal 1 Jahr).

4. Durchführung der elektrophoretischen Trennung

Eindimensionale SDS-PAGE

Reagenzlösungen:

Elektrodenpuffer: (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1 % SDS)

Zur Herstellung von 1 L einer 10-fach konzentrierten Stammlösung wurden 30,3 g Tris-Base, 144 g Glycin, 10,0 g SDS und 100 mg Natriumazid in etwa 800 ml H₂O_{dest.} gelöst, auf 1 L aufgefüllt und filtriert (Haltbarkeit: zwei Wochen bei Zimmertemperatur). Vor Gebrauch wurden 100 ml der Stammlösung mit 900 ml H₂O_{dest.} verdünnt.

Die SDS-PAGE wurde in einer Horizontalelektrophoresekammer (*Multiphor*) durchgeführt. In jeden der beiden Puffertanks wurde 1 L verdünnter Elektrodenpuffer gegeben. Die Elektrodenbrücken (*Ultra Wicks*) wurden ebenfalls mit Elektrodenpuffer getränkt. Um etwaige Verunreinigungen aus den Elektrodenbrücken zu entfernen, wurde zunächst ein Reinigungslauf durchgeführt. Hierzu wurden zwei Lagen Filterpapier auf Gelgröße zugeschnitten, mit Elektrodenpuffer getränkt, auf die Kühlplatte gelegt und durch die Ultra Wicks mit den Pufferkammern verbunden. Dieser Reinigungsschritt dauerte 2,5 h bei 600 V, 30 mA und 20 °C. Danach konnten die Elektrodenbrücken, die in den Puffertanks verblieben, für mehrere Dutzend Elektrophoreseläufe verwendet werden.

Zur Entnahme des Gels aus der Gießkassette wurden die Klammern entfernt und die Kassette mit Hilfe eines Messers oder Spatels geöffnet. Das Gel wurde nun luftblasenfrei mit der Trägerfolie nach unten auf die mit einigen Millilitern Kerosin befeuchtete und auf 20 °C temperierte Kühlplatte so aufgebracht, dass das Sammelgel mit den Probenauftragetaschen zur Kathodenseite (-) zeigte.

Dann wurden die Ultra Wicks parallel zu den Probeauftrageslots so auf die Geloberfläche gelegt, dass sie die Gelenden je ca. 10 mm überlappten. Um Kontaminationen mit Hautproteinen zu vermeiden, waren dabei unbedingt Einmalhandschuhe zu tragen. Anschließend konnten die Proben in die Geltaschen einpipettiert werden. Die Probenmenge richtete sich nach dem Verwendungszweck der Gele. Für eine anschließende Silberfärbung wurden 5 µl pro Slot, für Coomassieblaufärbung 10 µl benötigt.

Nach dem Schließen der Kammer und dem Anschluss an das Netzgerät konnte mit der Elektrophorese begonnen werden. Dies geschah nach den in Tabelle 3.4 be-

schriebenen Bedingungen. Wurden zwei Kammern gleichzeitig an einen Stromversorger angeschlossen, waren die angegebenen Stromwerte zu verdoppeln. Die ersten 60 min bei reduzierten Parametern sollten einen besseren Probeneintritt in das Gel gewährleisten. Hatte die Bromphenolblaubande das Gelende erreicht, war die Elektrophorese beendet. Anschließend wurde mit der Proteinfärbung begonnen.

Tab. 3.4: Bedingungen für die SDS-PAGE

Zeit	Spannung	Stromstärke
60 min	200 V	20 mA
120 min	500 V	35 mA

5. 2D-Elektrophorese mit immobilisierten pH-Gradienten in der ersten Dimension (IPG-Dalt)

Erste Dimension: IEF-IPG

Rehydratisierlösung für die IPG-Gelstreifen: (8 M Harnstoff, 0,5 % CHAPS, 0,2 % Pharmalyte pH 3-10)

Zur Herstellung von 50 ml Rehydratisierlösung wurden 25,0 g Harnstoff in etwa 25 ml H₂O_{dest.} gelöst und auf 50 ml aufgefüllt. Eine Spatelspitze Mischbettionenaustauscher MB-1 wurde zugeben, 10 min gerührt und filtriert. Zu 48 ml des Filtrats wurden 0,25 g CHAPS, 0,25 ml Pharmalyte und 100 mg DTT gegeben und mit H₂O_{dest.} auf 50 ml aufgefüllt. Die Rehydratisierlösung wurde unmittelbar vor Gebrauch hergestellt und nicht über 37 °C erwärmt.

Durchführung:

Zur Herstellung der IPG-Gelstreifen wurde das gewaschene und getrocknete IPG-Gel mit Hilfe einer Papierschneidemaschine in 4 mm breite Einzelstreifen geschnitten.

Die Rehydratisierung der IPG-Gelstreifen erfolgte in einer Quellkassette (modifizierte Gelgießkassette), um die Streifen wieder auf die ursprüngliche Dicke von 0,5 mm zu bringen. Die Dichtung der Kassette musste hierfür 0,7 mm dick sein. Dies wurde erreicht, indem die 0,5 mm starke Silikondichtung mit zwei ebenfalls U-

förmigen, je 0,1 mm dicken Lagen Parafilm unterlegt wurden. Die IPG-Streifen wurden vorsichtig in die bis oben mit Rehydratisierlösung gefüllte Quellkassette eingeführt und dort für 16-18 h belassen.

Nach dem Öffnen der Kassette wurden die gequollenen Streifen kurz in $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ eingetaucht und die Geloberfläche mit einem feuchten Filterpapier abgetrocknet. Anschließend wurden die IPG-Streifen in 1-2 mm Abstand zueinander auf die mit Kerosin benetzte Kühlplatte der Fokussierkammer gelegt, wobei darauf zu achten war, dass die sauren Gelenden zur Anode zeigen. Zwei etwa 5 mm breite Elektrodenstreifen (aus 2 mm starkem Filterkarton MN 440) wurden auf eine Länge zurechtgeschnitten, die der Gesamtbreite aller auf der Kühlplatte liegenden IPG-Gelstreifen entsprachen. Die Elektrodenstreifen wurden mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ angefeuchtet, auf das kathodische und anodische Ende der IPG-Streifen gelegt und leicht angedrückt.

Die Probenapplikationsstückchen aus Silikongummi (Innengröße $2 \times 5 \text{ mm}^2$) 5 mm wurden vom anodischen Elektrodenstreifen entfernt, mit einer Pinzette auf die Oberfläche der IPG-Gelstreifen gebracht, angedrückt und die Proben (30 μl) einpipettiert. Die Proteinbeladung betrug etwa 60-100 μg je IPG-Gelstreifen (in Abhängigkeit von der Länge des IPG-Gelstreifens und von der Steilheit der pH-Gradienten) bei anschließender Silberfärbung. Nach der Probenauftragung wurden die beweglichen Elektroden ausgerichtet, auf die Oberfläche der Elektrodenstreifen gesenkt und die IEF gestartet. Die Laufbedingungen sind Tabelle 3.5 zu entnehmen.

Die optimale Fokussierungstemperatur betrug 20 °C. Die benötigte Voltstundenzahl bis zum Erreichen eines konstanten Proteinmusters hing vom pH-Gradienten und der Trenndistanz ab. Nach beendeter IEF wurden die augenblicklich nicht benötigten IPG-Gelstreifen in eine Klarsichthülle eingeschweißt und bei -78 °C gelagert.

Tab. 3.5: Fokussierungsparameter für die IEF von 11 cm langen IPG-Streifen 4-9 (20 °C; $V_{\text{Probe}}=30 \mu\text{l}$).

	Spannung	Stromstärke je IPG-Gelstreifen	Leistung	Zeitdauer
Probeneintritt IPG 4-9	150 V	0,05 mA	5 W	30 min
	300 V	0,05 mA	5 W	60 min
	600 V	0,05 mA	5 W	30 min
Fokussierung IPG 4-9	3500 V	0,05 mA	5 W	12250 Vh

Bei sehr basischen Gradienten (3-12) wurde der DryStrip-Kit verwendet. Über eine Brücke wurden konisch zulaufende Probenauftragswannen mit Hilfe von Schablonen auf dem IPG-Gelstreifen positioniert. Desweiteren konnte die Fokussierung unter Silikonöl durchgeführt werden, um bei sehr langen Fokussierungszeiten ein Austrocknen der Geloberfläche und ein Auskristallisieren von Harnstoff zu verhindern.

Die Fokussierung der 18 cm langen Streifen fand bei 20 °C statt; alle weiteren Parameter sind in Tabelle 3.6 zusammengefasst.

Nach beendeter IEF wurden die nicht sofort benötigten IPG-Streifen in einer Klarsichthülle bis zur weiteren Verwendung bei -78 °C gelagert.

Tab. 3.6: Fokussierparameter für die erste Dimension (IEF-IPG 3-12) 18 cm langer Streifen.

	Spannung	Stromstärke je IPG-Gelstreifen	Leistung	Zeitdauer
Probeneintritt IPG 3-12	50 V	0,05 mA	5 W	1 h
	150 V	0,05 mA	5 W	1 h
	300 V	0,05 mA	5 W	2-12 h
	500 V	0,05 mA	5 W	2 h
Fokussierung IPG 3-12	3500 V	0,05 mA	5 W	22000 Vh

Äquilibrieren der IPG-Gelstreifen

Reagenzlösungen:

Trenngelpuffer: (1,5 M Tris-HCl, pH 8,8)

18,2 g Tris-Base und 0,4 g SDS wurden in etwa 80 ml H₂O_{dest.} gelöst. Mit 4 N HCl wurde auf pH 8,8 titriert und mit H₂O_{dest.} auf 100 ml aufgefüllt und filtriert. Diese Lösung war bei 4 °C zwei Wochen haltbar.

Äquilibrierpuffer: (6 M Harnstoff, 50 mM Tris-HCl, pH 8,8, 30 % Glycerin, 2 % SDS)

Zur Herstellung von 100 ml Äquilibrierpuffer wurden 36 g Harnstoff, 30 g Glycerin, 4 g SDS und 3,3 ml Trenngelpuffer in H₂O_{dest.} gelöst und auf 100 ml aufgefüllt. Der Puffer war bei Raumtemperatur zwei Wochen haltbar.

Durchführung:

Zur Äquilibrierung wurden die IPG-Gelstreifen mit 50 µl Bromphenolblaulösung und 10 ml Äquilibrierpuffer, in dem zuvor 100 mg Dithiothreitol (DTT) gelöst wurden, in ein 200 mm langes Reagenzglas überführt, dieses mit Parafilm verschlossen und 15 min auf dem Horizontalschüttler bewegt. Dann wurden die Streifen in ein weiteres Reagenzglas gegeben, in dem sich 400 mg Jodacetamid gelöst in 10 ml Äquilibrierpuffer sowie 50 µl Bromphenolblaulösung befanden, und dieses ebenfalls 15 min geschüttelt. Anschließend wurden die IPG-Gelstreifen mit einigen ml H₂O_{dest.} abgespült und mit der Längskante kurz auf ein Filterpapierblatt gestellt, um überschüssige Flüssigkeit abtropfen zu lassen.

Zweite Dimension: SDS-Elektrophorese mit dem Horizontalsystem

Das SDS-Gel wurde mit der GelBond-Seite nach unten luftblasenfrei auf die mit Kerosin benetzte Kühlplatte (20 °C) der Horizontalelektrophoresekammer gelegt. Die mit Elektrodenpuffer getränkten und durch einen Vorlauf gereinigten Elektrodenbrücken (Ultra Wicks) wurde so auf die Geloberfläche gelegt, dass sie die Gelenden jeweils 10 mm überlappten. Anschließend wurden sie glattgestrichen. Die äquilibrierten IPG-Gelstreifen wurden mit der Gelseite nach unten entlang der Kante der katho-

dischen Elektrodenbrücke auf die Oberfläche des Gels gelegt und zur Entfernung von Luftblasen leicht angedrückt. Falls M_r -Markerproteine mit aufgetrennt werden sollten, wurden 5 μ l der in SDS-Puffer gelösten Markerproteine in ein Silikonrähmchen neben dem IPG-Gelstreifen einpipettiert.

Als Molekulargewichtsmarker dienen: Phosphorylase: 94 kDa; BSA: 67 kDa; Ovalbumin: 43 kDa; Carbo-Anhydrase: 30 kDa; Soja Trypsin Inhibitor: 20,1 kDa; α -Lactalbumin: 14,4 kDa.

Die Elektrophorese wurde mit den in Tabelle 3.7 beschriebenen Probeneintrittsbedingungen gestartet.

Sobald die Bromphenolblaufront 4-5 mm aus dem IPG-Gelstreifen herausgewandert war, wurde die Elektrophorese unterbrochen und der IPG-Gelstreifen (und die Silikonrähmchen) von der Oberfläche des SDS-Gels entfernt. Dann wurde die kathodische Elektrodenbrücke 4-5 mm in Richtung Anode verschoben, so dass sie die ursprüngliche Probenauftragestelle überlappte. Anschließend wurden die Elektrodenbrücken mit einer Glasplatte beschwert und die Elektrophorese bei 600 V (maximal 30 mA) fortgesetzt, bis die Bromphenolblaufront das anodische Gelende erreicht hatte. Anschließend wurde mit der Silberfärbung fortgefahren.

Tab. 3.7: Bedingungen für die Elektrophorese

Zeit	Spannung	Strom
60 min	200 V	20 mA
ca. 4 h	600 V	30 mA

Durchführung der vertikalen SDS-Elektrophorese

Die ISO-Dalt Elektrophoresekammer wurde mit 15 L $H_2O_{dest.}$ gefüllt und eine Umwälzpumpe eingeschaltet. Anschließend wurden 3 L Tankpuffer zugeben und mit 1,9 L $H_2O_{dest.}$ nachgespült. Zur gründlichen Durchmischung waren die Barrierekämme für ca. 1 h hochzuziehen und der Thermostat auf 20 °C einzustellen. Sollten zusätzlich zu den IPG-Streifen Molekulargewichtsmarker mit aufgebracht werden, so waren diese, in kleinen Filterpapierstücken aufgesaugt, vor den IPG-Streifen in die Kassetten einzubringen. Der äquilibrierte IPG-Gelstreifen wurde kurz in den anodischen Teil des Tankpuffers getaucht und dann mit einem Spatel soweit wie möglich

in die Kassette geschoben, ohne dabei die Oberfläche des IPG-Streifen zu verletzen. Anschließend wurden ca. 4 ml 80 °C heiße Agaroselösung in die Kassette gegeben, der IPG-Streifen mit einem Spatel an die Oberkante des SDS-Gels gedrückt und die Lösung erstarren gelassen. Nachdem dieser Vorgang für alle zehn Gelkassetten durchgeführt worden war, wurden sie mit dem Scharnier nach unten in die Halterungen gesteckt. Der überschüssige Tankpuffer wurde abgesaugt und der Kammerdeckel mit den Kontakten verschlossen.

Die Elektrophorese wurde mit folgenden den Parametern durchgeführt:

Stromstärke: 150 mA
Spannung: 200 V
Dauer: ca. 16 h

Nach Beendigung des Laufs wurden die Gelkassetten entnommen, mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ kurz abgespült und mit einem Spatel vorsichtig geöffnet. Danach wurde der IPG-Streifen zusammen mit der Agaroseüberschichtung entfernt, und es wurde mit der Färbung der Gele fortgefahren. Dabei war zu beachten, dass die Gele des Vertikal-systems nicht auf einer Trägerfolie polymerisierten, somit unstabiler waren und dementsprechend vorsichtig behandelt werden mussten.

6. Proteindetektionsverfahren

Silberfärbung nach *Blum et al. (1987; modifiziert)*

Reagenzlösungen:

Fixierlösung: (40 % Ethanol; 10 % Eisessig)

Es wurden 400 ml Ethanol mit 100 ml Essigsäure (100 %) und 500 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ gemischt.

Thiosulfatlösung: (0,2 % Natriumthiosulfat-Pentahydrat)

200 mg Natriumthiosulfat-Pentahydrat wurden in 1,0 L $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ gelöst.

Silbernitratlösung: (0,2% Silbernitrat; 0,02% Formaldehyd)

2,0 g Silbernitrat wurden in 1 L H₂O_{dest.} gelöst und unmittelbar vor Gebrauch 200 µl Formaldehyd (37 %) zugefügt.

Entwickler: (3 % Natriumcarbonat; 0,05 % Formaldehyd; 0,0005 % Natriumthiosulfat-Pentahydrat)

Es wurden 30 g Natriumcarbonat in 1 L H₂O_{dest.} gelöst und unmittelbar vor Gebrauch 500 µl Formaldehyd (37 %) und 5 mg Natriumthiosulfat-Pentahydrat zugefügt und vermischt.

Stopplösung: (0,5 % Glycin)

5,0 g Glycin wurden in 1,0 L H₂O_{dest.} gelöst.

Imprägnierlösung: (30 % Glycerin)

Es wurden 30 g Glycerin mit H₂O_{dest.} auf 100 ml aufgefüllt.

Durchführung:

Alle Arbeitsschritte mussten mit Einweghandschuhen oder Pinzetten durchgeführt werden. Nach Abschluss der Elektrophorese wurde das Gel von der Kühlplatte genommen und in einer Schale auf einem Linearschüttler bei niedriger Schüttelfrequenz, wie in Tabelle 3.8 beschrieben, gefärbt. Die Färbereaktion wurde gestoppt, sobald die Proteinbanden deutlich sichtbar waren. Dabei war eine zu starke Hintergrundfärbung, bedingt durch Überentwicklung, zu vermeiden. Das Gel wurde dann gescannt, anschließend in einer 30%igen Glycerinlösung für 30 min imprägniert und in eine Plastikfolie eingeschweißt.

Tab. 3.8: Silberfärbung nach *Blum et al.* (mod.)

Schritt	Reagenz	Dauer
Fixierung	Fixierlösung	> 1h
Waschen	30 % Ethanol	2 x 20 min
	H ₂ O _{dest.}	1 x 20 min
Reduktion	Thiosulfatlösung	1 min
Waschen	H ₂ O _{dest.}	3 x 20 s
Inkubation	Silbernitratlösung	20 min
Waschen	H ₂ O _{dest.}	3 x 20 s
Entwickeln	Entwickler	3 - 5 min
Waschen	H ₂ O _{dest.}	2 x 30 s
Stop	Stoplösung	5 min
Waschen	H ₂ O _{dest.}	2 x 30 min

Siberfärbung nach *Heukeshoven und Dernick (1988; modifiziert)*

Reagenzlösungen:

Fixierlösung I: (40 % Ethanol/10 % Eisessig)

Es wurden 400 ml Ethanol mit 100 ml Eisessig gemischt und mit H₂O_{dest.} auf 1000 ml aufgefüllt.

Fixierlösung II: (30 % Ethanol, 0,2 % Natriumthiosulfat-Pentahydrat, 0,5 % Glutardialdehyd in Natriumacetat-Puffer)

2 g Natriumthiosulfat-Pentahydrat und 78 g Natriumacetat wurden in ca. 500 ml H₂O_{dest.} gelöst, 300 ml Ethanol und 20 ml Glutardialdehyd (25 %) zugegeben und auf 1000 ml aufgefüllt.

Fixierlösung III: (30 % Ethanol, 5 % Eisessig)

300 ml Ethanol wurden mit 50 ml Eisessig gemischt und mit H₂O_{dest.} auf 1000 ml aufgefüllt.

Silbernitratlösung: (0,1 % Silbernitrat, 0,05 % Formaldehyd (37 %))

1 g Silbernitrat wurde in 1000 ml H₂O_{dest.} gelöst, unmittelbar vor Gebrauch 500 µl Formaldehyd (37 %) zugefügt und vermischt.

Entwickler: (3 % Natriumcarbonat; 0,025 % Formaldehyd (37 %))

Es wurden 30 g Natriumcarbonat in 1000 ml $H_2O_{\text{dest.}}$ gelöst, unmittelbar vor Gebrauch 250 μ l Formaldehyd (37 %) zugefügt und vermischt.

Stopplösung: (0,5 % Glycin)

5,0 g Glycin wurden in 1000 ml $H_2O_{\text{dest.}}$ gelöst.

Durchführung:

Alle Arbeitsschritte mussten mit Einweghandschuhen oder Pinzetten durchgeführt werden. Nach Abschluss der Elektrophorese wurde das Gel von der Kühlplatte bzw. aus den Glasplatten genommen und in einer Schale auf einem Linearschüttler bei niedriger Schüttelfrequenz, wie in Tabelle 3.9 beschrieben, gefärbt. Die Färbereaktion wurde gestoppt, sobald die Proteinbanden deutlich sichtbar waren. Dabei war eine zu starke Hintergrundfärbung, bedingt durch Überentwicklung, zu vermeiden. Das Gel wurde dann in einer Schrumpflösung (30 % Glycerin, 30 % Ethanol) für 7 min geschrumpft, dann gescannt und in eine Plastikfolie eingeschweißt.

Tab. 3.9: Silberfärbung nach *Heukeshoven und Dernick* (mod.)

Schritt	Reagenz	Dauer
Fixierung	Fixierlösung I	30 min
	Fixierlösung II	1 h
	Fixierlösung III	mind. 1,5 h
Waschen	$H_2O_{\text{dest.}}$	4 x 15 min
Inkubation	Silbernitratlösung	30 min
Waschen	$H_2O_{\text{dest.}}$	3 x 20 s
Entwickeln	Entwickler	3 - 5 min
Waschen	$H_2O_{\text{dest.}}$	2 x 30 s
Stop	Stopplösung	5 min
Waschen	$H_2O_{\text{dest.}}$	mind. 30 min

7. Densitometrie

Zur Dokumentation der SDS-Gele wurde der Farbscanner ScanJet 3C (Hewlett Packard) eingesetzt.

Die Digitalisierung der silbergefärbten 1 D- und 2 D-Gele erfolgte mit dem MD 300A Laserdensitometer (Molecular Dynamics). Die erhaltenen Daten wurden mittels Quantity One™- bzw. PDQuest™-Software bearbeitet.

8. Probenvorbereitung für die Gelelektrophorese

Eindimensionale Elektrophorese (SDS-PAGE)

Reagenzlösungen:

Tris-HCl Puffer: (0,5 M; pH 7,5)

6,05 g Tris wurden in ca. 80 ml H₂O_{dest.} gelöst und mit 4 N HCl auf pH 7,5 titriert und mit H₂O_{dest.} auf 100 ml aufgefüllt (im Kühlschrank 2-3 Wochen haltbar).

Probenpuffer: (50 mM Tris-HCl pH 7,5; 5 % SDS; 30 % Glycerin; 1 % DTT)

Es wurden 10 ml Tris-HCl Puffer (0,5 M; pH 7,5), 5,0 g SDS und 30 g Glycerin in 80 ml H₂O_{dest.} gelöst und auf 100 ml aufgefüllt (im Kühlschrank 2-3 Wochen haltbar). Kurz vor Gebrauch wurden 1,0 g DTT hinzugefügt.

Bromphenolblaulösung: (0,25 % Bromphenolblau in 0,5 M Tris-HCl; pH 7,5)

Zur Herstellung von 10 ml Lösung wurden 25 mg Bromphenolblau in 10 ml Tris-HCl Puffer gelöst (bei 4 °C mehrere Wochen haltbar).

Durchführung:

20 µl Probenflüssigkeit wurden in einem Eppendorffgefäß (1,5 ml) mit 180 µl Probenpuffer und 2 µl Bromphenolblaulösung versetzt und gut durchmischt. Die Lösung wurde 5 min bei 95°C erhitzt, anschließend 10 min bei 16000 g zentrifugiert und der Überstand entweder direkt zur SDS-PAGE eingesetzt oder dekantiert und bei -78°C in einem weiteren Eppendorffgefäß gelagert.

Probenaufarbeitung für die 2 D-Elektrophorese

In 1,0 ml Probenflüssigkeit wurden 0,91 g Harnstoff gelöst, 40 mg CHAPS, 40 µl Pharmalyte 3-10 und eine Spatelspitze PefablockSC hinzugefügt und 5 min geschüttelt. Anschließend wurden 20 mg DTT gelöst. Nun konnten die Proben entweder direkt für die erste Dimension (IPG-IEF) eingesetzt oder bei -78 °C gelagert werden.

4 ERGEBNISSE

4.1 Zerschäumung von Referenzproteinen

In einem ersten Schritt wurde die Zerschäumung hinsichtlich ihrer Durchführbarkeit und der Beeinflussung durch verschiedene Parameter untersucht. Das Verfahren wurde hinsichtlich der Gesamtproteinanreicherung im Schaum optimiert, um für nachfolgende Zerschäumungsversuche Orientierungspunkte hinsichtlich der Versuchsdurchführung zu haben. Es wurden hierzu zwei Proteine mit unterschiedlichen isoelektrischen Punkten gewählt, nämlich Rinderhämoglobin (pI ca. 7,3) und –albumin (pI ca. 4,8). Um ein genügend großes Probenvolumen zu erhalten, mussten die Schaumproben über die angegebenen Zeitintervalle gesammelt werden. Eine Bodensatzbildung konnte bei allen Zerschäumungen nicht beobachtet werden. Die Zeitdauer, bis der gebildete Schaum aus dem Zerschäumungsrohr austrat ($t=0$), lag im Bereich von ca. 2 bis 30 min. Ab diesem Zeitpunkt wurde sofort mit der Proben-sammlung begonnen.

4.1.1 Einfluss der Konzentration auf die Proteinanreicherung

Eine Zerschäumung (Gasfluss: 50 ml/min) war bei fast allen Konzentrationen möglich. Erstaunlicherweise kam es bei der höchsten Konzentration an Hämoglobin (0,500 g/100 ml) zu keiner ausreichenden Schaumbildung. Bei der niedrigsten Hämoglobinkonzentration (0,010 g/100 ml) konnte keine zweite Schaumprobe genommen werden, da hier der Schaum im Zerschäumungsrohr nach ca. 8 min zusammenfiel. Eine gute Schaumstabilität war ab 0,050 g/100 ml zu erreichen. Die erhaltenen Ergebnisse sind in Tabelle 4.1a und b dargestellt.

Der Vergleich der Ausgangslösung mit dem Rückstand hinsichtlich der Gesamtproteinkonzentration ergab bei beiden Proteinlösungen (Hämoglobin und Albumin) bei fast allen Zerschäumungen eine leichte Anreicherung der Proteine im Schaum, d. h. der Rückstand wies mit Ausnahme bei 0,250 g/100 ml eine geringere Proteinkonzentration als die Ausgangslösung auf.

Eine signifikante Proteinanreicherung im Schaum fand nur bei Albumin statt; bei Hämoglobin war sie vernachlässigbar gering. Wie schon früher festgestellt, hing die Proteinkonzentration im Schaum von der in der Ausgangslösung ab. Bei Abnahme der Konzentration der Ausgangslösung nahm das Anreicherungsverhältnis zu. Ein maximales Proteinanreicherungsverhältnis konnte bei der geringsten Konzentration (0,010 g/100 ml) erzielt werden (Abbildung 4.1).

Bei fast allen Versuchen mit Albumin war das Anreicherungsverhältnis R der ersten gezogenen Schaumprobe höher als das der zweiten. Es nahm mit höher werdender Proteinkonzentration der Ausgangslösung stetig ab und näherte sich dem Wert $R=1$. So stellte sich heraus, dass mit länger werdender Zerschäumungsdauer keine Proteinanreicherung im Schaum mehr stattfand.

Tab. 4.1a: Einfluss der Konzentration der Ausgangslösung auf die Zerschäumung des Referenzproteins Rinderhämoglobin. n. d.: nicht durchführbar wegen unzureichender Schaumbildung

Proteinkonzentration Ausgangslösung [g/100 ml]	Proteinkonzentration Schaum $t=0-7$ min [g/100 ml] R1		Proteinkonzentration Schaum $t=7-14$ min [g/100 ml] R2		Proteinkonzentration Rückstand [g/100 ml]
0,010	0,015	1,50	n. d.	n. d.	0,008
0,025	0,026	1,04	0,021	0,84	0,018
0,050	0,051	1,02	0,049	0,98	0,039
0,075	0,076	1,01	0,074	0,99	0,073
0,100	0,105	1,05	0,097	0,99	0,098
0,250	0,250	1,00	0,250	1,00	0,250
0,500	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.

Tab. 4.1b: Einfluss der Konzentration der Ausgangslösung auf die Zerschäumung des Referenzproteins Rinderalbumin

Proteinkonzentration Ausg.lsg. [g/100 ml]	Proteinkonzentration Schaum $t=0-7$ min [g/100 ml] R1		Proteinkonzentration Schaum $t=7-14$ min [g/100 ml] R2		Proteinkonzentration Rückstand [g/100 ml]
0,010	0,075	7,50	0,053	5,30	0,003
0,025	0,060	2,40	0,031	1,24	0,018
0,050	0,073	1,46	0,057	1,14	0,041
0,075	0,078	1,04	0,078	1,04	0,073
0,100	0,112	1,12	0,119	1,19	0,097
0,250	0,242	0,97	0,241	0,96	0,241
0,500	0,498	1,00	0,499	1,00	0,485

Mit Rinderalbumin war mit stark verdünnten Ausgangslösungen ein wesentlich höheres Anreicherungsverhältnis ($R_{\max}=7,5$) zu erzielen als mit Rinderhämoglobin. Das maximal erzielbare Anreicherungsverhältnis bei der Zerschäumung von Rinderhämoglobin lag bei $R=1,5$ (Ausgangslösung: 0,010 g/100 ml). Bei Albumin nahm das Anreicherungsverhältnis mit steigender Konzentration der Ausgangslösung nahezu exponentiell ab, wobei R1 und R2 einen ähnlichen Verlauf zeigten. Dagegen war bei Hämoglobin keine signifikante Änderung der Anreicherung zu erkennen; sie lag immer bei ca. 1.

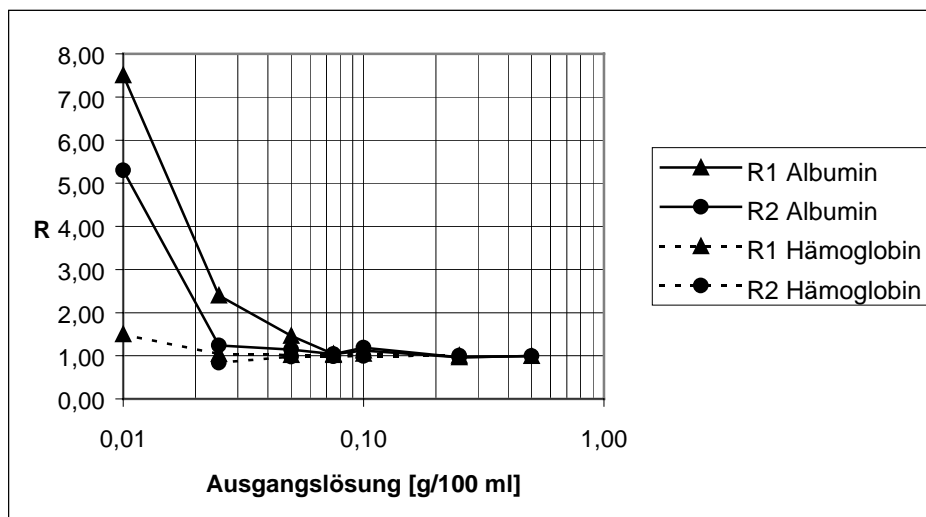


Abb. 4.1: Einfluss der Proteinkonzentration der Ausgangslösung auf das Anreicherungsverhältnis R verschiedener Schaumproben

Für alle weiteren Versuche wurde zur Gewährleistung einer ausreichenden Schaumstabilität eine Proteinkonzentration der Ausgangslösung von 0,050 g/100 ml gewählt.

4.1.2 Einfluss der Gasflussgeschwindigkeit

Mit beiden Proteinlösungen kam es bei allen eingestellten Gasflussgeschwindigkeiten zu einer ausreichenden Schaumbildung. Allerdings war die Schaumstabilität bei 20 ml/min relativ gering. Der Vergleich der Ausgangslösung mit den Rückstandsproben zeigte wieder einen teilweisen Übergang der Proteine in den Schaum (Tabel-

le 4.2a und b). Eine Proteinanreicherung im Schaum konnte bei Albumin überall und bei Hämoglobin bis auf die Werte bei 75 ml/min beobachtet werden.

Tab. 4.2a: Einfluss der Gasflussgeschwindigkeit auf die Zerschäumung des Referenzproteins Rinderhämoglobin (Proteinkonzentration der Ausgangslösung: 0,050 g/100 ml)

Gasfluss [ml/min]	Proteinkonzentration Schaum $t=0-7$ min		Proteinkonzentration Schaum $t=7-14$ min		Proteinkonzentration Rückstand [g/100 ml]
	[g/100 ml]	R1	[g/100 ml]	R2	
20	0,072	1,44	0,048	0,96	0,034
50	0,058	1,16	0,049	0,98	0,043
75	0,048	0,96	0,049	0,98	0,043
100	0,060	1,20	0,051	1,02	0,043

Tab. 4.2b: Einfluss der Gasflussgeschwindigkeit auf die Zerschäumung des Referenzproteins Rinderalbumin (Proteinkonzentration der Ausgangslösung: 0,050 g/100 ml)

Gasfluss [ml/min]	Proteinkonzentration Schaum $t=0-7$ min		Proteinkonzentration Schaum $t=7-14$ min		Proteinkonzentration Rückstand [g/100 ml]
	[g/100 ml]	R1	[g/100 ml]	R2	
20	0,110	2,20	0,096	1,92	0,038
50	0,073	1,46	0,057	1,14	0,041
75	0,087	1,74	0,062	1,24	0,042
100	0,062	1,24	0,049	0,98	0,043

Wie in Abbildung 4.2 zu erkennen ist, zeigt sich bei einer Verringerung der Gasflussrate eine Erhöhung der Proteinanreicherung.

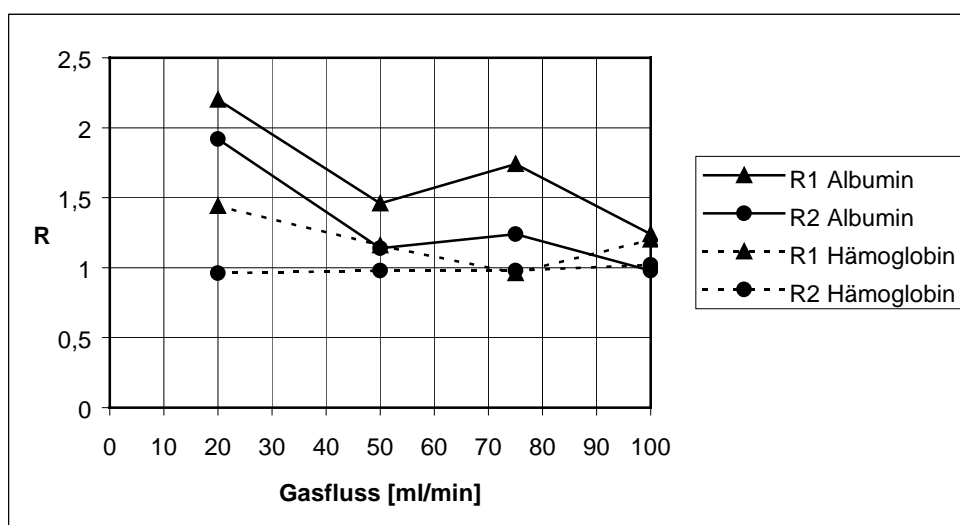


Abb. 4.2: Einfluss des Stickstoff-Gasflusses auf das Anreicherungsverhältnis R verschiedener Schaumproben

Jedoch konnte keine direkte lineare Abhängigkeit festgestellt werden. Das Maximum des Proteinanreicherungsverhältnisses lag bei $R=2,20$ bei der am niedrigsten

untersuchten Gasflussgeschwindigkeit von 20 ml/min. Ein Minimum wurde bei 100 ml/min (höchste untersuchte Gasflussgeschwindigkeit) erreicht. Bei Albumin wurde ein Nebenmaximum bei 75 ml/min gemessen.

Auch hier wurden mit Rinderalbumin höhere Anreicherungsverhältnisse erzielt als mit Rinderhämoglobin.

Mit Albumin konnten in der ersten Schaumprobe höhere Proteinanreicherungsverhältnisse erzielt werden als in der zweiten, wobei die beiden Kurven einen ähnlichen Verlauf zeigten. Etwa das gleiche galt für Hämoglobin, wobei allerdings R2 annähernd konstant blieb.

Für alle nachfolgenden Versuche wurde eine Gasflussgeschwindigkeit von 50 ml/min gewählt, um eine ausreichende Stabilität des Schaums mit einer möglichst hohen Anreicherung zu verbinden.

4.1.3 Einfluss der Zugabe von NaCl

Bei der Untersuchung des Einflusses von Kochsalz als wichtige Komponente physiologischer Lösungen kam es bei allen NaCl-Konzentrationen zu einer ausreichenden Schaumbildung, so dass eine Zerschäumung immer möglich war. Die Abnahme der Proteinkonzentration der Ausgangslösung im Vergleich zum Rückstand lag bei 0,015-0,036 g/100 ml (Tabelle 4.3a und b).

Tab. 4.3a: Einfluss der NaCl-Zugabe auf die Zerschäumung des Referenzproteins Rinderhämoglobin (Proteinkonzentration der Ausgangslösung: 0,050 g/100 ml)

NaCl-Zugabe [g/100 ml]	Proteinkonzentration Schaum $t=0-7$ min		Proteinkonzentration Schaum $t=7-14$ min		Proteinkonzentration Rückstand [g/100 ml]
	[g/100 ml]	R1	[g/100 ml]	R2	
0,001	0,064	1,28	0,047	0,94	0,045
0,005	0,062	1,24	0,047	0,94	0,040
0,01	0,063	1,26	0,050	1,00	0,043
0,05	0,058	1,16	0,048	0,96	0,043
0,10	0,045	0,90	0,045	0,90	0,040
0,50	0,049	0,98	0,048	0,96	0,036
1,00	0,049	0,98	0,048	0,96	0,029

Entsprechend hatte bei allen Zerschäumungen eine Proteinanreicherung im Schaum stattgefunden, und zwar vor allem in der ersten Schaumprobe bis zu einer Salzzugabe von 0,05 g/100 ml. Das maximale Anreicherungsverhältnis von $R=1,36$ wurde bei einer Salzzugabe von 0,010 g/100 ml erreicht.

Tab. 4.3b: Einfluss der NaCl-Zugabe auf die Zerschäumung des Referenzproteins Rinderalbumin (Proteinkonzentration der Ausgangslösung: 0,050 g/100 ml)

NaCl-Zugabe [g/100 ml]	Proteinkonzentration Schaum $t=0-7$ min [g/100 ml] R1		Proteinkonzentration Schaum $t=7-14$ min [g/100 ml] R2		Proteinkonzentration Rückstand [g/100 ml]
	0,001	0,063	1,26	0,061	
0,005	0,063	1,26	0,060	1,20	0,040
0,01	0,068	1,36	0,062	1,24	0,037
0,05	0,058	1,16	0,055	1,10	0,040
0,10	0,052	1,04	0,045	0,90	0,034
0,50	0,051	1,02	0,049	0,98	0,030
1,00	0,052	1,04	0,049	0,98	0,014

Wie Abbildung 4.3 zeigt, fand bis zu einer NaCl-Zugabe von 0,05 g/100 ml eine Proteinanreicherung im Schaum statt. Höhere NaCl-Konzentrationen bewirkten eine Abnahme des Anreicherungsverhältnisses von $R < 1$.

Auch zeigte sich bei allen Versuchen eine höhere Proteinkonzentration in der ersten Schaumprobe.

Die Zerschäumung von Albumin wies ein Minimum der Proteinanreicherung bei Zugabe von 0,10 g/100 ml auf. Der Verlauf von R1 und R2 war fast gleich. Bei einer vergleichbaren Zerschäumung von Albumin ohne Salzzugabe konnte ein Proteinanreicherungsverhältnis von $R=1,46$ erzielt werden (vgl. 4.1.2). Hier wurde mit Salzzugabe von 0,010 g/100 ml ein Anreicherungsverhältnis von $R=1,36$ erreicht.

Bei der Zerschäumung von Rinderhämoglobin ließ sich nur bei Salzkonzentrationen $\leq 0,05$ g/100 ml in der jeweils ersten Schaumprobe eine Proteinanreicherung nachweisen, und auch da nur bis zu einem Anreicherungsverhältnis von $R=1,28$. Bei der zweiten Schaumprobe lagen die Proteinkonzentrationen im Bereich der Ausgangslösung. Ab NaCl-Mengen von 0,1 g/100 ml war die Proteinkonzentration im Schaum geringer als in der Ausgangslösung. Die zweite Schaumprobe hatte annähernd konstante Proteinkonzentrationen im Bereich von 0,045-0,050 g/100 ml. Dagegen wichen die Hämoglobinkurven bis 0,050 g/100 ml an NaCl signifikant voneinander ab. Von 0,1-1,0 g/100 ml NaCl war der Kurvenverlauf identisch. Die Zerschäu-

mung von Hämoglobin konnte im Vergleich zu der ohne NaCl sogar verbessert werden. Ohne Salzzugabe wurde bei sonst konstanten Bedingungen ein Anreicherungsverhältnis von $R=1,16$ erreicht (vgl. 4.1.2). Durch eine Salzzugabe (0,001-0,010 g/100 ml) konnte das Anreicherungsverhältnis in der ersten Schaumprobe auf $R\sim 1,26$ gesteigert werden.

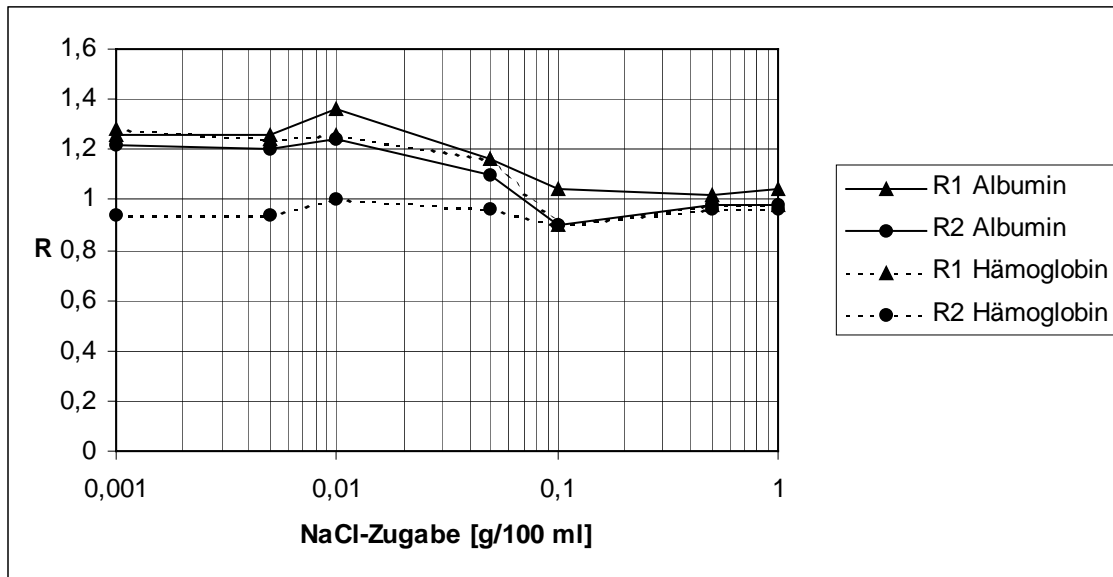


Abb. 4.3: Einfluss der NaCl-Zugabe auf das Anreicherungsverhältnis verschiedener Schaumproben

4.1.4 Einfluss der Zugabe von Fructose

Bei der Untersuchung des Einflusses von Fructose als Beispiel eines in der Natur häufig vorkommenden Zuckers kam es bei allen Zuckerkonzentrationen zu einer ausreichenden Schaumbildung, so dass auch hier eine Zerschäumung immer möglich war. Die Proteinkonzentration der Ausgangslösung lag durchgehend bei 0,050 g/100 ml, die des Rückstands im Bereich von 0,037-0,043 g/100 ml, was auf einen Proteinübergang in den Schaum bei allen Versuchen schließen ließ (Tabelle 4.4a und b). Eine Proteinanreicherung im Schaum wurde aber nur in sehr geringem Ausmaß festgestellt. Ein maximales Proteinanreicherungsverhältnis von $R=1,18$ konnte bei einer Fructose-Zugabe von 0,005 g/100 ml beobachtet werden (Abbildung 4.4).

Tab. 4.4a: Einfluss der Fructose-Zugabe auf die Zerschäumung des Referenzproteins Rinderhämoglobin (Proteinkonzentration der Ausgangslösung: 0,050 g/100 ml)

Fructose-Zugabe [g/100 ml]	Proteinkonzentration Schaum $t=0-7$ min [g/100 ml] R1		Proteinkonzentration Schaum $t=7-14$ min [g/100 ml] R2		Proteinkonzentration Rückstand [g/100 ml]
0,001	0,050	1,00	0,047	0,94	0,043
0,005	0,049	0,98	0,048	0,96	0,040
0,01	0,046	0,92	0,046	0,92	0,043
0,05	0,044	0,88	0,043	0,86	0,041
0,10	0,047	0,94	0,048	0,96	0,041
0,50	0,045	0,90	0,048	0,96	0,043
1,00	0,047	0,94	0,048	0,96	0,043

Tab. 4.4b: Einfluss der Fructose-Zugabe auf die Zerschäumung des Referenzproteins Rinderalbumin (Proteinkonzentration der Ausgangslösung: 0,050 g/100 ml)

D-(-)-Fructose- Zugabe [g/100 ml]	Proteinkonzentration Schaum $t=0-7$ min [g/100 ml] R1		Proteinkonzentration Schaum $t=7-14$ min [g/100 ml] R2		Proteinkonzentration Rückstand [g/100 ml]
0,001	0,052	1,04	0,044	0,88	0,037
0,005	0,059	1,18	0,047	0,94	0,037
0,01	0,054	1,08	0,045	0,90	0,040
0,05	0,057	1,14	0,043	0,86	0,040
0,1	0,052	1,04	0,047	0,94	0,040
0,5	0,058	1,16	0,050	1,00	0,043
1,0	0,053	1,06	0,053	1,06	0,043

Bei der Zerschäumung von Albumin konnte eine geringfügige Proteinanreicherung in der ersten Schaumprobe festgestellt werden; der Kurvenverlauf zeigte ein leichtes Schwanken um einen mittleren Wert von $R \sim 1,1$. Dagegen lag die Proteinkonzentration in der zweiten Schaumprobe bei Zuckerkonzentrationen bis zu 0,1 g/100 ml stets geringfügig unter der der Ausgangslösung. Erst bei der höchsten Fructosegabe von 1,0 g/100 ml wurde auch in der zweiten Schaumprobe eine minimale Proteinanreicherung im Schaum gemessen.

Bei der Zerschäumung von Rinderhämoglobin konnte in beiden Schaumproben keine Proteinanreicherung festgestellt werden. Der Schaum hatte stets eine geringere Proteinkonzentration als die Ausgangslösung. Lediglich bei der geringsten Fructose-Zugabe wies die erste Schaumprobe die gleiche Proteinkonzentration wie die Ausgangslösung auf. Der Kurvenverlauf war bei beiden Schaumproben ähnlich.

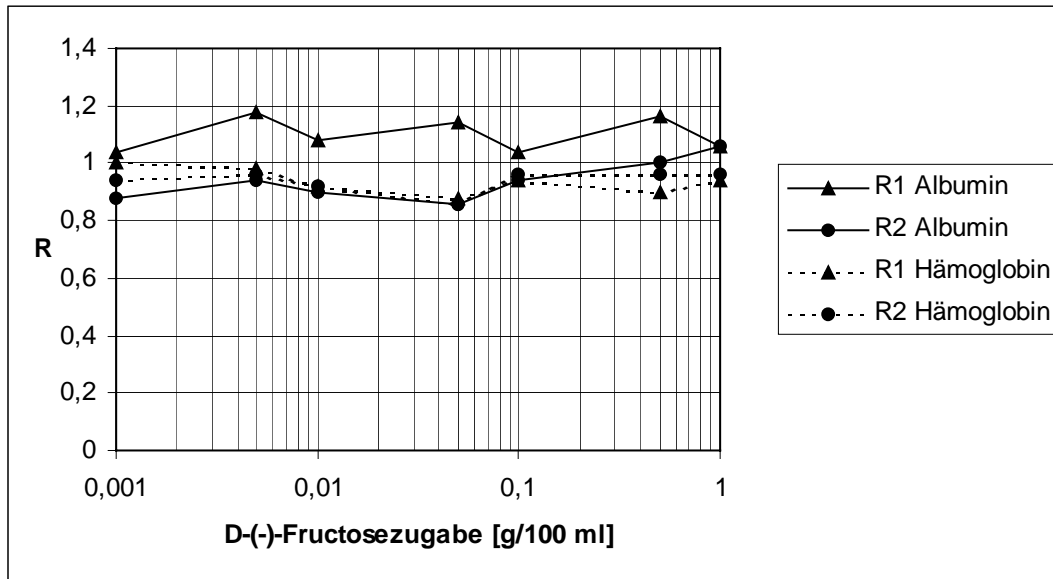


Abb. 4.4: Einfluss der Fructose-Zugabe auf das Anreicherungsverhältnis verschiedener Schaumproben

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Proteinanreicherung im Schaum hier generell von einer Fructose-Zugabe verschlechtert wurde. Zum Vergleich: bei der Zerschäumung von Albumin ohne Fructose-Zugabe konnte unter sonst gleichen Bedingungen ein Proteinanreicherungsverhältnis von $R=1,46$ erzielt werden, während der Faktor bei Anwesenheit von Zucker 1,18 betrug. Bei der Zerschäumung von Hämoglobin fand ohne Zuckerzugabe eine geringe Proteinanreicherung im Schaum statt ($R=1,18$), bei Vorhandensein von Zucker nicht.

4.1.5 Einfluss des pH-Wertes

Bei der Zerschäumung von Hämoglobin mit Variation des pH-Wertes von 3-11 kam es in allen Versuchen zu einer ausreichenden Schaumbildung, wodurch durchgehend eine Zerschäumung möglich war. Im Gegensatz dazu war bei Albumin bei pH 10 keine Zerschäumung auf Grund einer fehlenden Schaumbildung möglich, und bei pH 11 konnte keine zweite Schaumprobe genommen werden (Tabelle 4.5a und b), da der Schaum nach ca. 8 min in sich zusammenfiel. Der pH-Wert im Schaum änderte sich nicht.

Tab. 4.5a: Einfluss des pH-Wertes auf die Zerschäumung des Referenzproteins Rinderhämoglobin (Proteinkonzentration der Ausgangslösung: 0,050 g/100 ml)

pH-Wert	Proteinkonzentration Schaum $t=0-7$ min [g/100 ml] R1		Proteinkonzentration Schaum $t=7-14$ min [g/100 ml] R2		Proteinkonzentration Rückstand [g/100 ml]
	3	0,052	1,04	0,048	
4	0,066	1,32	0,033	0,66	0,045
5	0,052	1,04	0,052	1,04	0,047
6	0,048	0,96	0,049	0,98	0,047
7	0,061	1,22	0,048	0,96	0,040
8	0,053	1,06	0,050	1,00	0,046
9	0,058	1,16	0,060	1,20	0,048
10	0,080	1,60	0,081	1,62	0,049
11	0,086	1,72	0,087	1,74	0,045

Tab. 4.5b: Einfluss des pH-Wertes auf die Zerschäumung des Referenzproteins Rinderalbumin (Proteinkonzentration der Ausgangslösung: 0,050 g/100 ml). n. d.: nicht durchführbar, da keine ausreichende Schaumbildung

pH-Wert	Proteinkonzentration Schaum $t=0-7$ min [g/100 ml] R1		Proteinkonzentration Schaum $t=7-14$ min [g/100 ml] R2		Proteinkonzentration Rückstand [g/100 ml]
	3	0,120	2,40	0,093	
4	0,077	1,54	0,065	1,30	0,040
5	0,067	1,34	0,061	1,22	0,039
6	0,085	1,70	0,061	1,22	0,035
7	0,105	2,10	0,079	1,58	0,046
8	0,087	1,74	0,079	1,58	0,042
9	0,093	1,86	0,076	1,52	0,041
10	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
11	0,104	2,08	n. d.	n. d.	0,045

Beim Vergleich der Ausgangslösung mit den Rückstandsproben konnte festgestellt werden, dass ein teilweiser Proteinübergang in den Schaum bei allen Zerschäumungen stattgefunden hat, da die Rückstände meist geringere Proteinkonzentrationen (0,040-0,049 g/100 ml) aufwiesen als die Ausgangslösung (0,050 g/100 ml). Eine signifikante Proteinanreicherung im Schaum war bei Albumin bei fast allen Schaumproben (Ausnahme: pH 5), bei Hämoglobin nur im Basischen bei pH 10 und 11 zu beobachten.

Das höchste Proteinanreicherungsverhältnis mit $R=2,40$ wurde bei der Zerschäumung von Albumin bei pH 3 in der ersten Schaumprobe erhalten (Abbildung 4.5). Zwei Maxima wurden bei pH 7 ($R=2,10$) und pH 11 ($R=2,08$) festgestellt. In Richtung des Basischen war ein leichter Anstieg des Anreicherungsverhältnisses zu erkennen. Der Tiefpunkt lag bei pH 5 mit $R=1,34$.

Die Zerschäumung von Hämoglobin brachte lediglich ein höchstes Anreicherungsverhältnis von $R=1,74$ bei pH 11, wobei ebenfalls ein leichter Anstieg zum Basischen hin erkennbar war. Im Sauren und Neutralen war jedoch keine signifikante Proteinanreicherung zu erkennen.

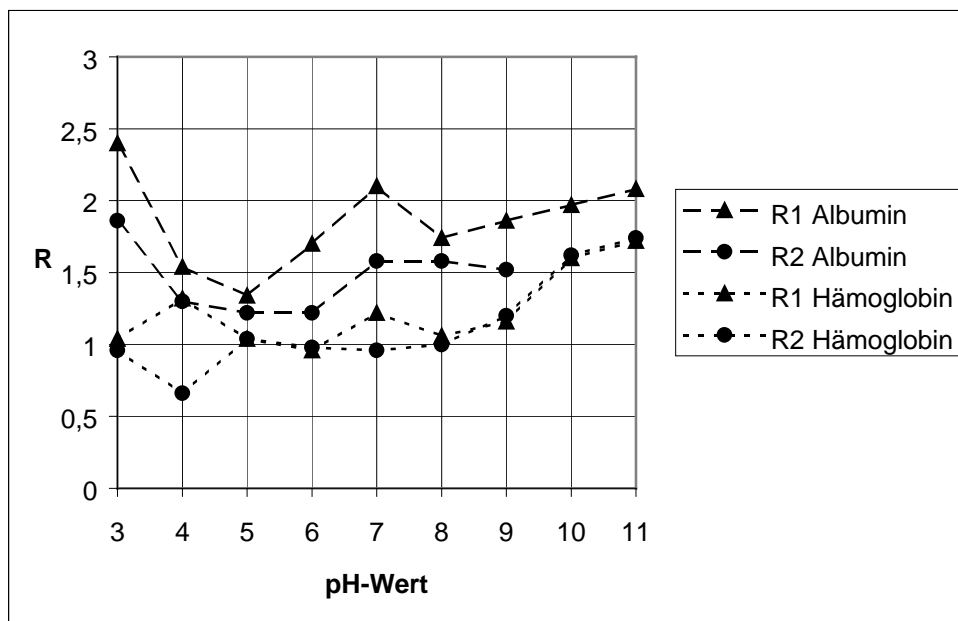


Abb. 4.5: Einfluss des pH-Wertes auf das Anreicherungsverhältnis R verschiedener Schaumproben

Ein Vergleich der Anreicherung in den beiden Zeitintervallen ergab, dass bei Albumin der R2-Wert generell niedriger lag, der Kurvenverlauf aber annähernd dem von R1 entsprach. Dagegen waren bei Hämoglobin die beiden Kurven im Basischen und über einen Teil des sauren Bereichs fast identisch; lediglich bei pH 4 und 7 war die Anreicherung im ersten Zeitintervall höher.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass zwar ein Einfluss des pH-Wertes auf die Gesamtproteinanreicherung der Zerschäumung erkennbar war, dass jedoch Maxima und Minima nicht mit den isoelektrischen Punkten der jeweiligen Proteine übereinstimmten.

4.2 Zerschäumung von Kartoffelfruchtwasser

4.2.1 Zusammensetzung des Fruchtwassers der Kartoffelproben

4.2.1.1 Proteinfractionen

Bei der Charakterisierung des verwendeten Kartoffelfruchtwassers mittels SDS-PAGE (Gesamtproteingehalt: 0,95 g/100 ml), welches sowohl beim ursprünglichen pH-Wert von 5,9 aufgetragen bzw. auf den pH-Werte 3 titriert wurde, um eventuelle Bandenverschiebungen bzw. Intensitätsunterschiede zwischen der SDS-PAGE bei den beiden pH-Werten erkennen zu können, zeigte sich eine Verteilung der Proteine primär zwischen ca. 17 und 45 kDa (Abbildung 4.6), sowie einige Minorkomponenten im höhermolekularen Bereich.

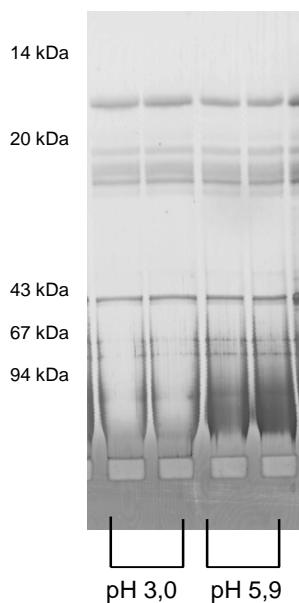


Abb. 4.6: SDS-PAGE des verwendeten Kartoffelfruchtwassers bei zwei verschiedenen pH-Werten (Probenauftragsmenge 10 μ l)

Qualitative Unterschiede in der Bandenverteilung waren nicht zu erkennen. Der pH-Wert des Kartoffelfruchtwassers hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Proteinbanden der SDS-PAGE.

Die Proteinverteilung zeigte eine charakteristische Bande bei etwa 17 kDa. Des Weiteren lagen Banden im Bereich von 20-25 kDa vor. Im höhermolekularen Bereich

zeichneten sich Banden bei 45, sowie 70 und 80 kDa ab. Über 80 kDa konnte keine weitere Trennung erzielt werden.

Um eine zusätzliche Trennung der Fraktionen sowohl nach ihren isoelektrischen Punkten als auch nach ihren Molekulargewichten zu erhalten, wurde eine 2 D-Gel-elektrophorese mit einer IEF-IPG (isoelektrischen Fokussierung mit immobilisierten pH-Gradienten) bei 3-12 durchgeführt.

Abbildung 4.7 bestätigt die Resultate der SDS-PAGE (vgl. Abbildung 4.6) mit der Verteilung der Hauptproteinfraktionen von 14-80 kDa, wobei die Hauptfraktionen von 45 kDa isoelektrische Punkte zwischen 4 und 5 aufwiesen, und der 25 kDa Bande ein isoelektrischer Punkt von pH 9 zuzuordnen war.

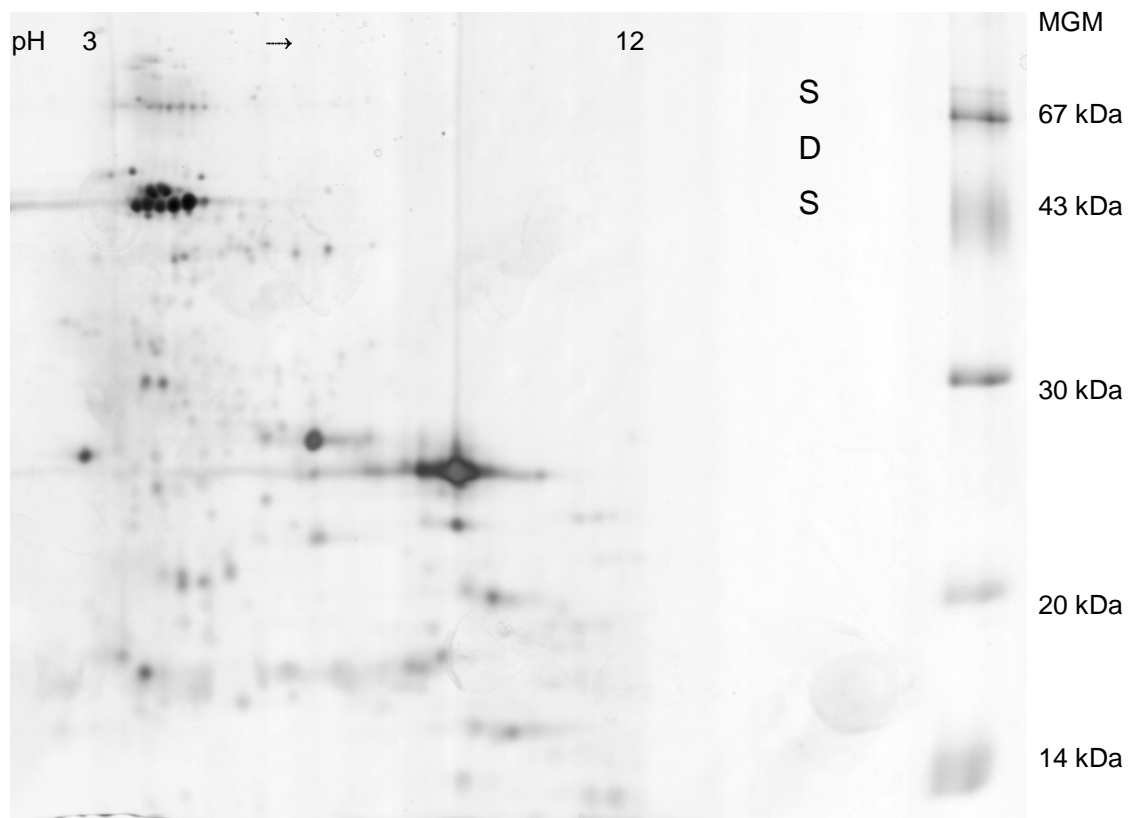


Abb. 4.7: IPG-Dalt des Kartoffelfruchtwassers (IPG 3-12; 18 cm). MGM: Molekulargewichtsmarker

Das Kartoffelfruchtwasser besaß auffällige Proteinspots im Bereich des pI 3-5 (43-65 kDa) und etwa pI 9 (25 kDa). Proteine geringerer Konzentration waren über den gesamten Bereich von pI 3-12 (14-80 kDa) zu erkennen.

4.2.1.2 Weitere Inhaltsstoffe

Die Gehalte an einzelnen Inhaltsstoffen des verwendeten Kartoffelfruchtwassers sind in Tabelle 4.6 und 4.7 zusammengefasst.

Tab. 4.6: Inhaltsstoffe des verwendeten Kartoffelfruchtwassers

	Stärke [g/l]	L-Ascorbinsäure [g/l]	Nitrat [g/l]	Saccharose [g/l]	D-Fructose [g/l]	D-Glucose [g/l]	Wassergehalt [%]	Asche [g/100 g]
Wert 1	1,380	0,004	0,010	0,560	0,150	0,150	89,100	1,030
Wert 2	1,440	0,003	0,001	0,550	0,150	0,140	89,000	1,010
Wert 3	1,430	0,010	0,020	0,500	0,150	0,140	89,100	1,010
Standardabweichung	0,032	0,004	0,010	0,032	0,000	0,006	0,058	0,012
Mittelwert	1,417	0,006	0,010	0,537	0,150	0,143	89,067	1,017

Die Schwankungen der Messwerte der Dreifachbestimmung waren relativ gering; jedoch traten bei der Nitratbestimmung hohe Schwankungen auf.

Tab. 4.7: Mineralstoffzusammensetzung des Kartoffelfruchtwassers, gemessen mit AAS

Element	Konzentration [mg/l]
Calcium	96,3
Eisen	4,99
Kalium	5003
Kupfer	1,22
Magnesium	241
Mangan	1,09
Natrium	31,3
Zink	4,71
Chlorid	450
Phosphor*	702

* berechnet als Hydrogenphosphat

4.2.2 Batch-Zerschäumung

In einem nächsten Schritt sollten die mit den Referenzproteinen gewonnenen Erkenntnisse auf ein komplexeres Proteingemisch übertragen werden. Als Beispiel diene hierbei Kartoffelfruchtwasser aus *Solanum tuberosum var. agria*, wobei ebenfalls die Zerschäumung hinsichtlich ihrer Durchführbarkeit und der Beeinflussung verschiedener Parameter verifiziert werden sollte. Zusätzlich zur Verfahrensoptimierung sollte eine mögliche selektive Anreicherung bestimmter Proteinfractionen untersucht werden.

4.2.2.1 Gesamtproteinanreicherung

Einfluss der Verdünnung

Bei der Untersuchung des Einflusses der Verdünnung des Kartoffelfruchtwassers zeigte sich, dass bis einschließlich einer Verdünnung von 1:20 (0,05 g/100 ml) eine ausreichende Schaumbildung vorhanden war und somit die Zerschäumung durchgeführt werden konnte. Bei der Verdünnung von 1:100 (0,01 g/100 ml) war dies auf Grund der ungenügenden Schaumbildung nicht mehr möglich (Tabelle 4.8).

Der Vergleich der Ausgangslösung mit dem Rückstand ergab bei fast allen Verdünnungen einen teilweisen Übergang der Proteine in den Schaum. Jedoch bei 1:10 verdünnter Ausgangslösung zeigte der Rückstand die gleiche Proteinkonzentration. Dieses konnte auch durch die Untersuchungen der Schaumproben bestätigt werden. Bis auf die zweite Schaumprobe der 1:10 verdünnten Lösung war immer eine Proteinanreicherung zu erkennen.

Tab. 4.8: Zerschäumung bei Variation der Verdünnung der Ausgangslösung (Mittelwerte der Doppelbestimmung). n. d.: nicht durchführbar, da keine ausreichende Schaumbildung

Verdünnung	Proteinkonzentration Ausgangslösung [g/100 ml]	Proteinkonz. Schaum $t=0-15$ min		Proteinkonz. Schaum $t=15-30$ min		Proteinkonz. Rückstand [g/100 ml]
		[g/100 ml]	R1	[g/100 ml]	R2	
unverdünnt	1,00	1,20	1,26	1,25	1,32	0,80
1:1	0,50	0,65	1,30	0,60	1,20	0,45
1:10	0,10	0,15	1,50	0,10	1,00	0,10
1:20	0,05	0,10	2,00	0,20	3,00	0,03
1:100	0,01	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.

Auch bei Kartoffelfruchtwasser stieg die Proteinanreicherung im Schaum mit zunehmend verdünnteren Ausgangslösungen bei den untersuchten Verdünnungsstufen zuerst leicht und dann sprunghaft an. Optimal war eine Zerschäumung mit einer Verdünnung von 1:20, bei der ein Anreicherungsverhältnis von $R=3,0$ (Abbildung 4.8) erzielt werden konnte.

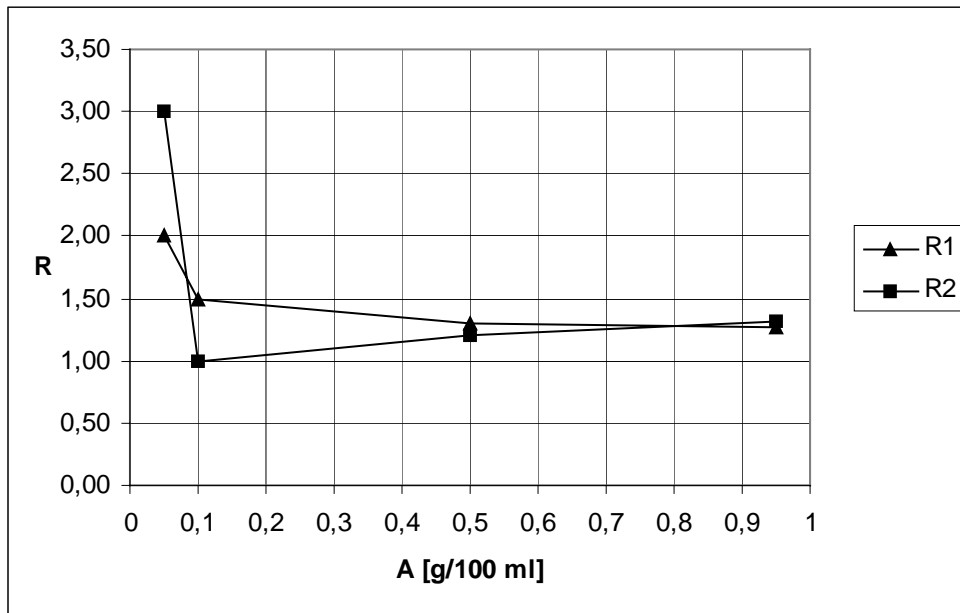


Abb. 4.8: Einfluss der Proteinkonzentration der Ausgangslösung auf das Anreicherungsverhältnis verschiedener Schaumproben

Bei der unverdünnten Lösung wurde ein maximales Anreicherungsverhältnis von $R=1,32$ in der zweiten Schaumprobe erzielt. Ein ähnliches Ergebnis ergab die Zerschäumung von 1:1 verdünntem Kartoffelfruchtwasser. Hier lag das Anreicherungsverhältnis R bei 1,2 bzw. 1,3. Bei der Zerschäumung des 1:10 verdünnten Kartoffelfruchtwassers war in der ersten Schaumprobe ($t=0-15$ min) eine 1,5-fache Anreicherung zu beobachten, während in der zweiten Schaumprobe eine Proteinanreicherung im Schaum nicht mehr zu erkennen war. Die Zerschäumung von 1:20 verdünntem Fruchtwasser brachte das maximale Proteinanreicherungsverhältnis von $R=3$ in der zweiten Schaumprobe zwischen 15-30 min. Hier wies die erste Schaumprobe eine Proteinkonzentrierung um das 2-fache auf.

Bis zu einer Proteinkonzentration der Ausgangslösung von 0,1 g/100 ml wichen die Proteinkonzentrationen der zu unterschiedlichen Zeiten genommenen Schaumproben stark voneinander ab. Erst bei 0,5 und 0,95 g/100 ml waren die Werte ähnlich.

Einfluss der Gasflussgeschwindigkeit

Bei der Variation der N₂-Gasflussgeschwindigkeit zwischen 10 und 100 ml/min (Proteinkonzentration Ausgangslösung: 0,05 g/100 ml) kam es bei allen Versuchen zu einer ausreichenden Schaumbildung, und es zeigte sich, dass bis einschließlich 50 ml/min eine Proteinanreicherung im Schaum stattgefunden hatte. Bei 75 bzw. 100 ml/min konnte fast keine Proteinanreicherung im Schaum gemessen werden (Tabelle 4.9).

Tab. 4.9: Zerschäumung bei Variation der Gasflussgeschwindigkeit (Mittelwerte der Doppelbestimmung)

Gasfluss [ml/min]	Proteinkonzentration Schaum $t=0-15$ min		Proteinkonzentration Schaum $t=15-30$ min		Proteinkonzentration Rückstand [g/100 ml]
	[g/100 ml]	R1	[g/100 ml]	R2	
10	0,20	4,00	0,06	1,20	0,03
30	0,15	3,00	0,06	1,20	0,04
50	0,07	1,40	0,04	0,80	0,04
75	0,05	1,00	0,04	0,80	0,05
100	0,06	1,20	0,05	1,00	0,05

Wie Abbildung 4.9 zeigt, kann bei einem Wert von 10 ml/min ein Maximum der Proteinanreicherung ($R=4,0$) erreicht werden. Mit zunehmender Gasflussgeschwindigkeit sank die Proteinanreicherung wieder, bis sie sich im Bereich von $R=1,0 \pm 0,2$ einpendelte. Bei 100 ml/min betrug der Anreicherungsfaktor 1,0 bzw. 1,2.

In allen ersten Schaumproben lag die Proteinkonzentration höher als bei den zweiten Schaumproben. Die zweite Schaumprobe enthielt durchgehend Proteinkonzentrationen von 0,04-0,06 g/100 ml ($R=0,8-1,2$), was bedeutet, dass in dieser keine Proteinanreicherung stattgefunden hatte.

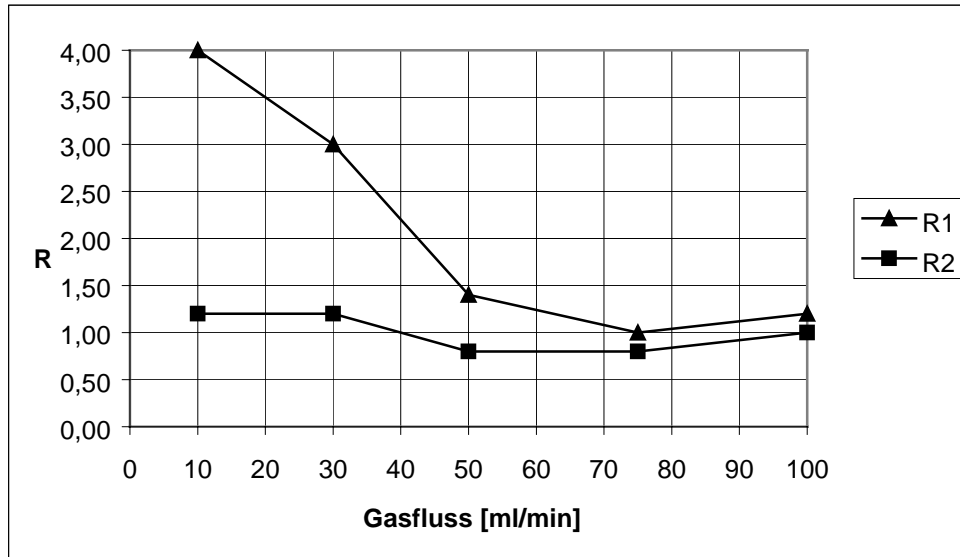


Abb. 4.9: Einfluss der Gasflussgeschwindigkeit auf das Anreicherungsverhältnis verschiedener Schaumproben

Als Resümee ergab sich, dass eine Erhöhung der Gasflussgeschwindigkeit die Proteinanreicherung im Schaum verringerte. Trotzdem wurde für alle nachfolgenden Versuche analog zu den Versuchen mit Referenzproteinen eine mittlere Gasflussgeschwindigkeit von 50 ml/min gewählt.

Einfluss der NaCl-Zugabe

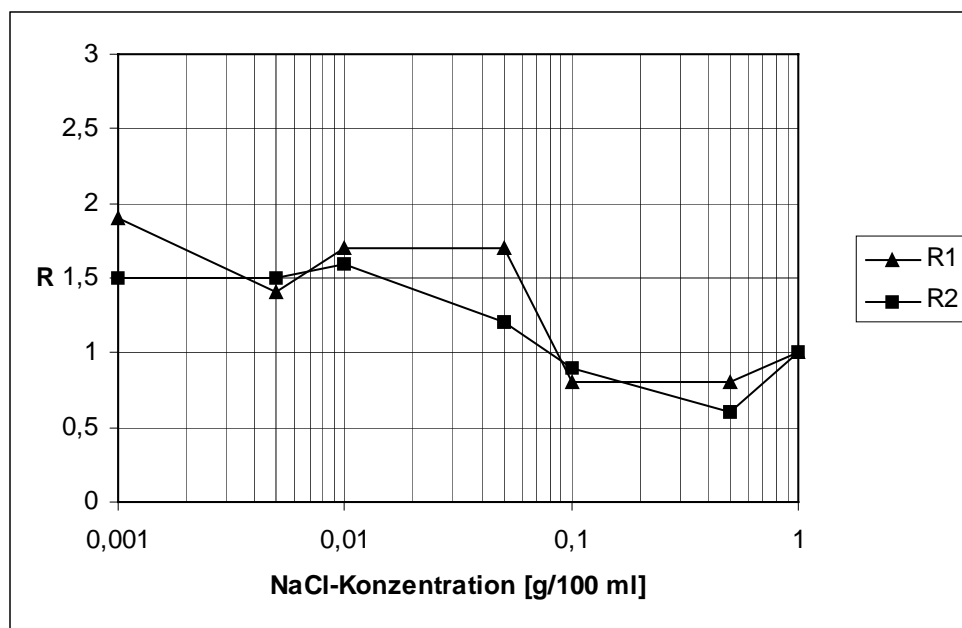
Bei der Untersuchung des Einflusses von Kochsalz auf die Zerschäumung von Kartoffelfruchtwasser kam es bei allen Versuchen zu einer ausreichenden Schaumbildung, so dass eine Zerschäumung immer möglich war.

Beim Vergleich der Proteinkonzentrationen der Ausgangslösung mit den Rückstandsproben fiel auf, dass bei allen Zerschäumungen ein Proteinübergang in den Schaum stattgefunden hatte, da die Werte der Ausgangslösung höher lagen als die der Rückstände (Tabelle 4.10). Eine Proteinanreicherung fand bis zu einer Salzmenge von 0,05 g/100 ml statt.

Die maximale Proteinanreicherung konnte bei Zugabe von 0,001 g/100 ml an NaCl mit einem Anreicherungsverhältnis von $R=1,9$ festgestellt werden. Wie Abbildung 4.10 zeigt, fand bis zu einer NaCl-Zugabe von 0,05 g/100 ml eine Proteinanreicherung im Schaum statt. Bei höheren NaCl-Konzentrationen fiel die Proteinkonzentration im Schaum teilweise unter die der Ausgangslösung.

Tab. 4.10: Zerschäumung bei Zugabe von NaCl (Mittelwerte der Doppelbestimmung)

NaCl-Zugabe [g/100 ml]	Proteinkonz. Ausgangslösung [g/100 ml]	Proteinkonz. Schaum $t=0-15$ min		Proteinkonz. Schaum $t=15-30$ min		Proteinkonz. Rückstand [g/100 ml]
		[g/100 ml]	R1	[g/100 ml]	R2	
0,001	0,05	0,10	1,90	0,08	1,50	0,04
0,005	0,05	0,07	1,40	0,08	1,50	0,04
0,01	0,05	0,09	1,70	0,08	1,60	0,03
0,05	0,05	0,09	1,70	0,06	1,20	0,04
0,10	0,05	0,04	0,80	0,05	0,90	0,04
0,50	0,05	0,04	0,80	0,03	0,60	0,03
1,00	0,05	0,05	1,00	0,05	1,00	0,04

**Abb. 4.10:** Einfluss verschiedener NaCl-Konzentrationen auf das Anreicherungsverhältnis verschiedener Schaumproben

Der Vergleich der zwei unterschiedlichen Probenahmezeiten zeigte meist eine höhere Proteinkonzentration der ersten Schaumprobe. Bei 0,005 und 0,10 g/100 ml NaCl-Zugabe war es umgekehrt; hier war die Proteinkonzentration der ersten Schaumprobe geringer als die der zweiten. Jedoch brachte die Probenahme zu unterschiedlichen Zeiten keine wesentlichen Vorteile, da keine eindeutigen Tendenzen zu erkennen waren.

Durch die Zugabe von NaCl konnte die Zerschäumung bis einschließlich 0,05 g/100 ml verbessert werden. Ohne Zugabe von Kochsalz wurden bei sonst gleichen Bedingungen Anreicherungsverhältnisse von nur $R=1,4$ erreicht; im Vergleich zum Maximalwert von $R=1,9$ bei Salzzugabe.

Einfluss des pH-Wertes

Bei Variation der pH-Werte von 2-12 zeigte sich, dass bei allen Versuchen eine ausreichende Schaumbildung und somit eine Zerschäumung möglich war (Tabelle 4.11). Der pH-Wert im Schaum änderte sich nicht.

Tab. 4.11: Zerschäumung bei Variation des pH-Wertes (\emptyset Zerschäumungsrohr 18 mm; Mittelwerte der Doppelbestimmung)

pH-Wert	Proteinkonz. Ausgangslösung [g/100 ml]	Proteinkonzentration Schaum $t=0-15$ min		Proteinkonzentration Schaum $t=15-30$ min		Proteinkonz. Rückstand [g/100 ml]
		[g/100 ml]	R1	[g/100 ml]	R2	
2	0,05	0,12	2,40	0,12	2,40	0,04
3	0,055	0,10	1,81	0,11	2,00	0,04
4	0,045	0,10	2,22	0,10	2,22	0,03
5	0,05	0,11	2,20	0,16	3,20	0,04
6	0,05	0,12	2,40	0,18	3,60	0,03
7	0,055	0,09	1,64	0,17	3,09	0,03
8	0,055	0,09	1,64	0,11	2,00	0,04
9	0,05	0,10	2,00	0,09	1,80	0,04
10	0,045	0,09	2,00	0,09	2,00	0,03
11	0,045	0,11	2,44	0,10	2,22	0,04
12	0,05	0,11	2,20	0,09	1,80	0,03

Die Proteinkonzentration der Ausgangslösung, welche nach Einstellen des pH-Wertes im Bereich von 0,045-0,055 g/100 ml lag, im Vergleich mit den Rückständen (Proteinkonzentration 0,03-0,04 g/100 ml) zeigte einen Proteinübergang in den Schaum bei allen durchgeführten Zerschäumungen. Eine Proteinanreicherung fand in allen Schaumproben statt.

Der Kurvenverlauf in Abbildung 4.11 zeigt ein Maximum des Proteinanreicherungsverhältnisses bei pH 6 mit $R=3,60$ und ein Nebenmaximum bei pH 11 mit $R=2,22$. Die Tiefpunkte waren bei pH 3, 7 und 8 mit R im Bereich von 1,64-1,81.

Im sauren Bereich von pH 2-4 war die Proteinanreicherung fast unabhängig von der Zerschäumungsdauer. Die Anreicherungsfaktoren lagen bei $R=1,81-2,40$. Die zweite Schaumprobe wies entweder die selbe oder eine höhere Proteinkonzentration als die erste auf. Dagegen klafften im schwach sauren bis neutralen Bereich die Werte auseinander. Darüber und darunter waren sie fast identisch. Bei pH 5-8 fielen die wesentlich höheren Konzentrationen der zweiten Schaumprobe im Vergleich zur ersten auf. Im Bereich von pH 9-12 zeigte die erste Schaumprobe durchwegs die höhere Proteinkonzentration. Die Abweichungen beider Schaumproben voneinander waren hier wieder gering.

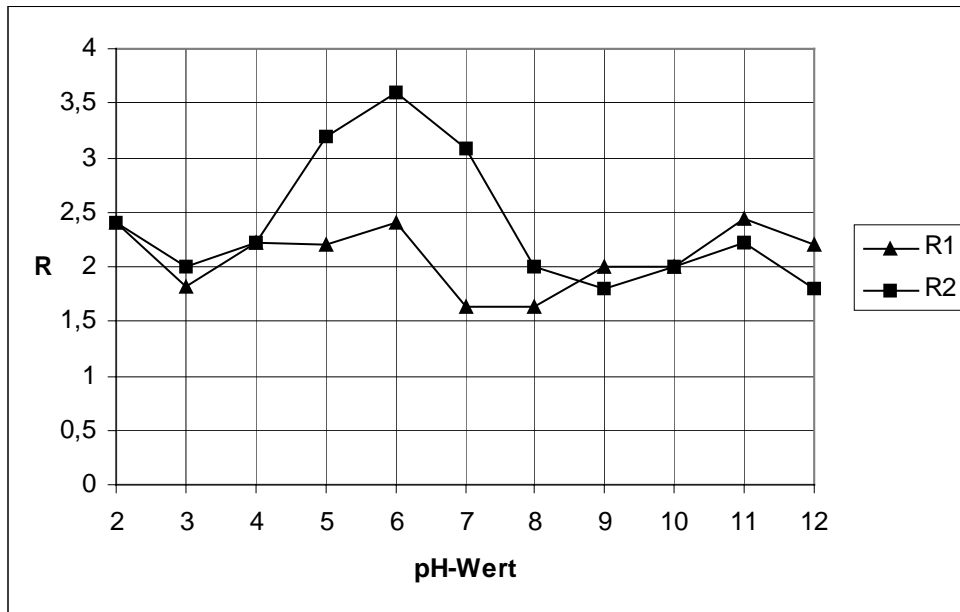


Abb. 4.11: Einfluss des pH-Wertes auf das Anreicherungsverhältnis verschiedener Schaumproben

Einfluss des Rohrdurchmessers

Beim Vergleich der Zerschäumung mit zwei verschiedenen Zerschäumungsrohrdurchmessern (40 bzw. 18 mm) stellte sich heraus, dass mit dem dünneren Rohr wesentlich höhere Anreicherungsverhältnisse zu erzielen waren (Tabelle 4.12).

Tab. 4.12: Zerschäumung bei zwei verschiedenen Rohrdurchmessern

Ø Rohr [mm]	Proteinkonz. Schaum 1		Proteinkonz. Schaum 2		Proteinkonz. Schaum 3		Proteinkonz. Schaum 4	
	[g/100 ml]	R1	[g/100 ml]	R2	[g/100 ml]	R3	[g/100 ml]	R4
40	0,063	1,17	0,068	1,26	0,080	1,48	0,083	1,54
18	0,12	2,40	0,18	3,60	-	-	-	-

Es ist zu erkennen, dass mit dem 18 mm-Rohr ein maximales Anreicherungsverhältnis von $R=3,6$ zu erzielen war; hingegen konnte mit dem Rohr mit 40 mm Durchmesser nur ein Anreicherungsverhältnis von 1,54 erzielt werden. Hier war auch eine Sättigung der Proteinkonzentration in den zu unterschiedlichen Zeiten genommenen Schaumproben zu erkennen.

4.2.2.2 Anreicherung einzelner Fraktionen

Hier sollte getestet werden, ob es mittels Zerschäumung möglich ist, Proteine fraktioniert (nach Molekulargewicht bzw. nach isoelektrischem Punkt) im Schaum anzureichern. Es wurde hier wiederum Kartoffelfruchtwasser als Beispiel einer Pflanzenproteinlösung gewählt.

Untersuchungen mittels SDS-PAGE

Bei der Zerschäumung von Kartoffelfruchtwasser in zwei unterschiedlichen Verdünnungen (1:10 und 1:20) und bei Variation des pH-Wertes von 3-11 zeigte sich, dass bei allen Versuchen eine Gesamtproteinanreicherung im Schaum stattgefunden hat, wie aus den Farbintensitätsunterschieden zu erkennen war (Abbildung 4.13). Bei der Zerschäumung bei pH 3 war dies besonders ausgeprägt.

Die zwei zu unterschiedlichen Zeiten genommenen Schaumproben wiesen bei pH 3 und 5 in etwa gleiche Farbintensitäten und somit gleiche Proteinkonzentrationen auf, wohingegen bei pH 9 die zweite Schaumprobe erstens etwas intensiver gefärbt war und zweitens etwas unterschiedliche Proteinfractionen enthielt.

Bei den Zerschäumungen bei pH 8, 9 und 10 deutet sich eine selektive Anreicherung bestimmter Proteinfractionen im Bereich von 22-26 kDa an (vgl. markierte Banden in Abbildung 4.13).

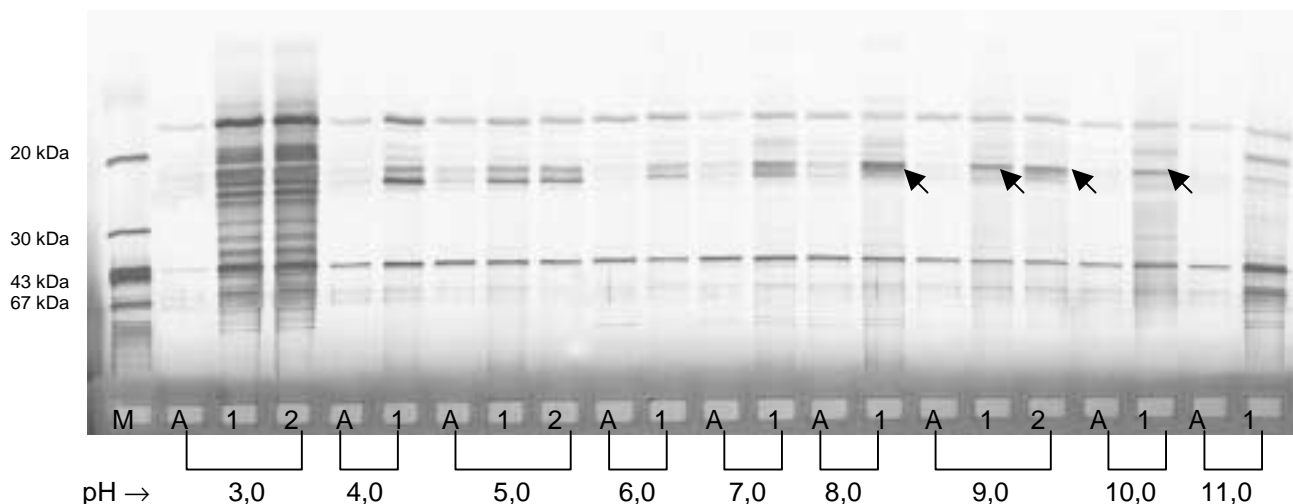


Abb. 4.13: SDS-Gel der Zerschäumung von Kartoffelfruchtwasser (1:10) bei verschiedenen pH-Werten. **M:** Molekulargewichtsmarker, **A:** Ausgangslösung, **1:** Schaum $t=0-15$ min, **2:** Schaum $t=15-30$ min

Auch bei einer Verdünnung von 1:20 wiesen die Schaumproben fast durchgehend eine intensivere Färbung als die Ausgangslösungen und dadurch eine Proteinanreicherung auf (Abbildung 4.14). Die Zerschäumung bei pH 3 zeigte in der ersten Schaumprobe eine starke Anreicherung des Gesamtproteins zu erkennen. Bei pH 3 war die Proteinkonzentration der ersten Schaumprobe höher als die der zweiten. Dagegen war bei pH 7 die Proteinkonzentration beider Schaumproben etwa gleich. Bei den Zerschäumungen bei pH 3, 7, 8 und 9 fanden selektive Anreicherungen bestimmter Proteinfractionen (22-26 kDa) statt.

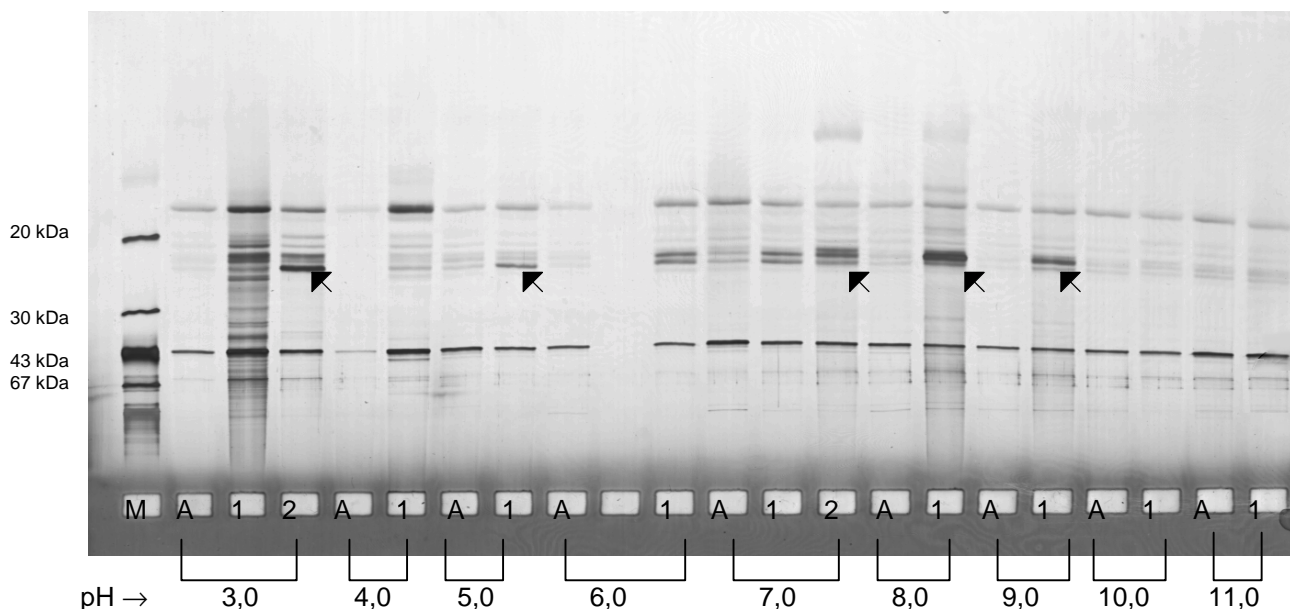


Abb. 4.14: SDS-Gel der Zerschäumung von Kartoffelfruchtwasser (1:20) bei verschiedenen pH-Werten. **M:** Molekulargewichtsmarker, **A:** Zur Zerschäumung eingesetzte Lösung, **1:** Schaum $t=0-15$ min, **2:** Schaum $t=15-30$ min

Untersuchungen mittels hochauflösender 2 D-Gelelektrophorese

Bei der Zerschäumung von 1:20 verdünntem Kartoffelfruchtwasser (eingestellt auf pH 3 bzw. 9) stellte sich heraus, dass bestimmte Proteinfractionen am isoelektrischen Punkt im Bereich von 3 und von 9 in Korrelation mit dem eingestellten pH-Wert selektiv im Schaum angereichert wurden (Abbildung 4.15).

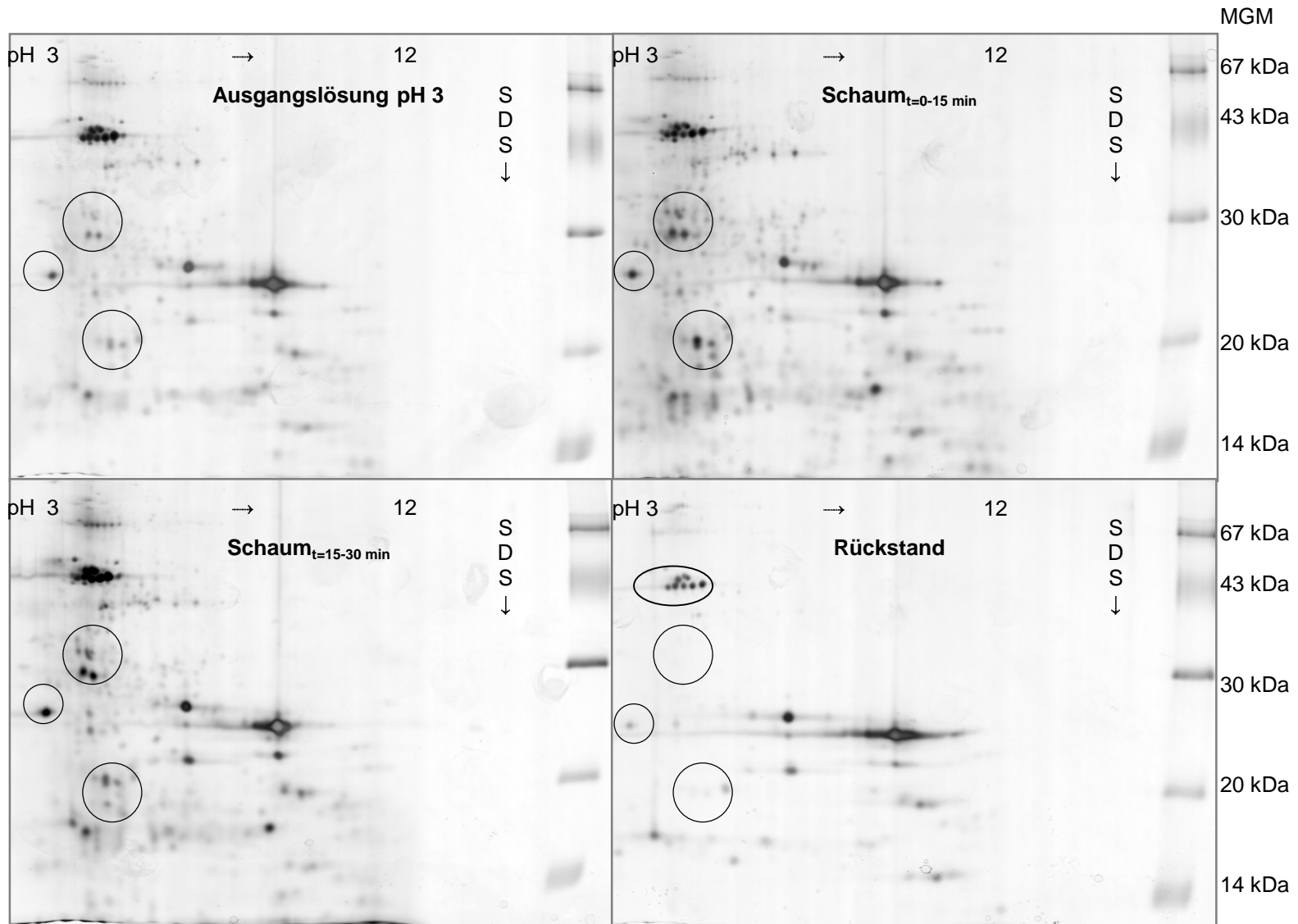


Abb. 4.15: IPG-Dalys der Zerschäumung bei pH 3

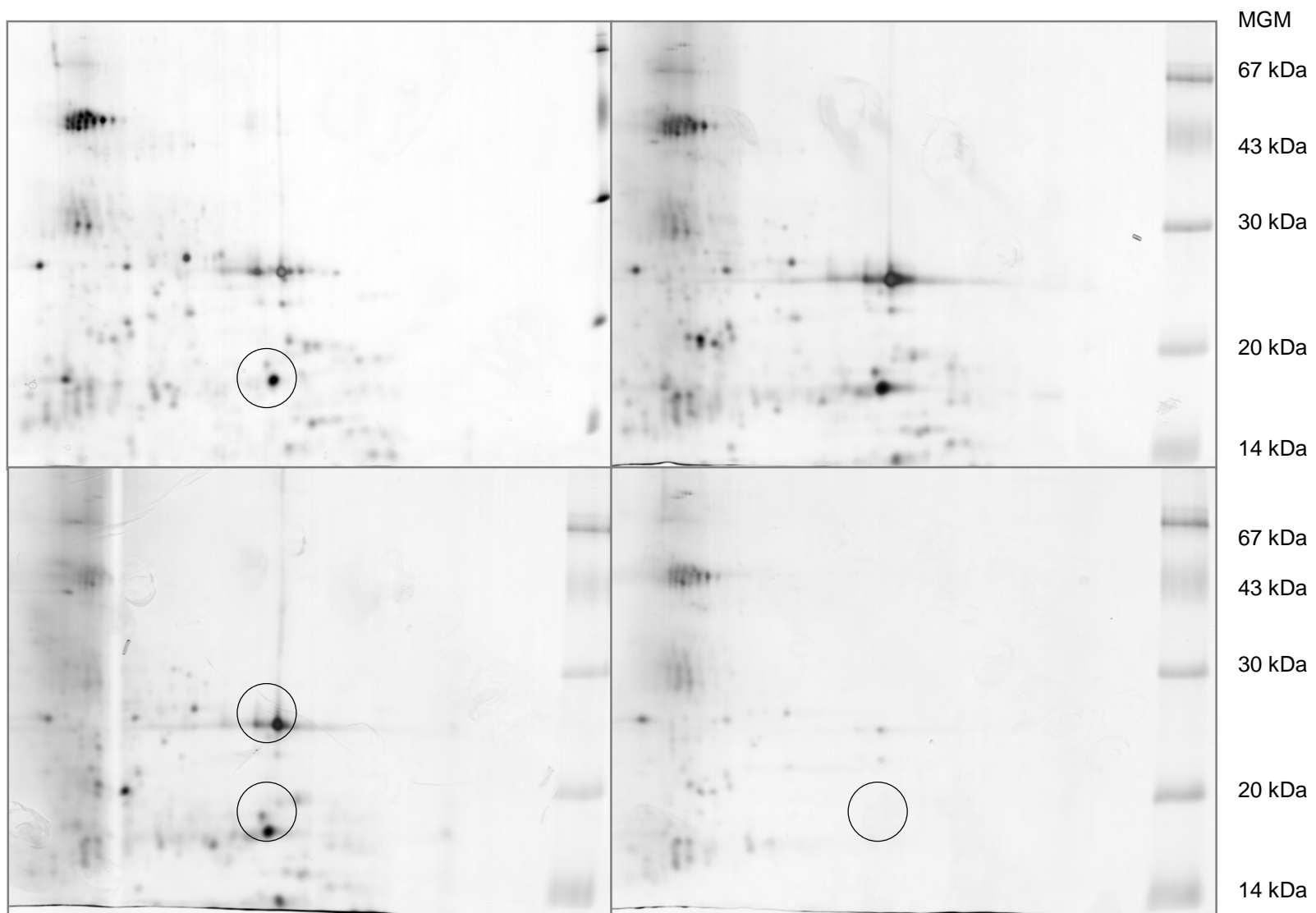


Abb. 4.16: IPG-Dalton der Zerschäumung bei pH 9

Der Vergleich der IPG-Dalton der Ausgangslösung, eingestellt auf pH 3, mit den dazugehörigen Schaumproben zeigte, dass bestimmte Proteinfractionen im Bereich von $pI=3$ quantitativ in den Schaum überführt wurden. Bei der Betrachtung des Molekulargewichts fiel auf, dass vor allem Proteinfractionen bis zu 30 kDa im Schaum angereichert wurden. Bestätigt wurde dieses Ergebnis durch das fast vollständige Fehlen dieser Proteinfractionen im Rückstand nach der Zerschäumung.

Ein ähnliches Ergebnis wie oben beschrieben ist in Abbildung 4.16 dargestellt. Es stellte sich heraus, dass hier einige Proteinfractionen im Bereich von $pI=9$ ebenfalls quantitativ im Schaum angereichert wurden. Auch hier wurden Proteine bis etwa 30 kDa im Schaum angereichert. Dieses Resultat wurde ebenfalls durch die Untersuchung des Rückstandes bestätigt, in dem die vorher im Schaum angereicherten Proteinfractionen fehlten.

Bei der Untersuchung der Zerschäumung mit Kochsalzzugabe zeigte sich, dass die Selektivität der Zerschäumung jedoch nicht beeinflusst wurde; ein beispielhaftes Ergebnis einer derartigen Zerschäumung bei pH 3 und pH 9 mit unterschiedlichen NaCl-Zugabemengen zeigen die Abbildung 4.17 bzw. Abbildung 4.18.

Eine Verbesserung der selektiven Anreicherung bestimmter Proteinfractionen war nicht zu erkennen. Die Zerschäumungen bei pH 3 und pH 9 verliefen ungefähr wie die ohne Kochsalzzugabe.

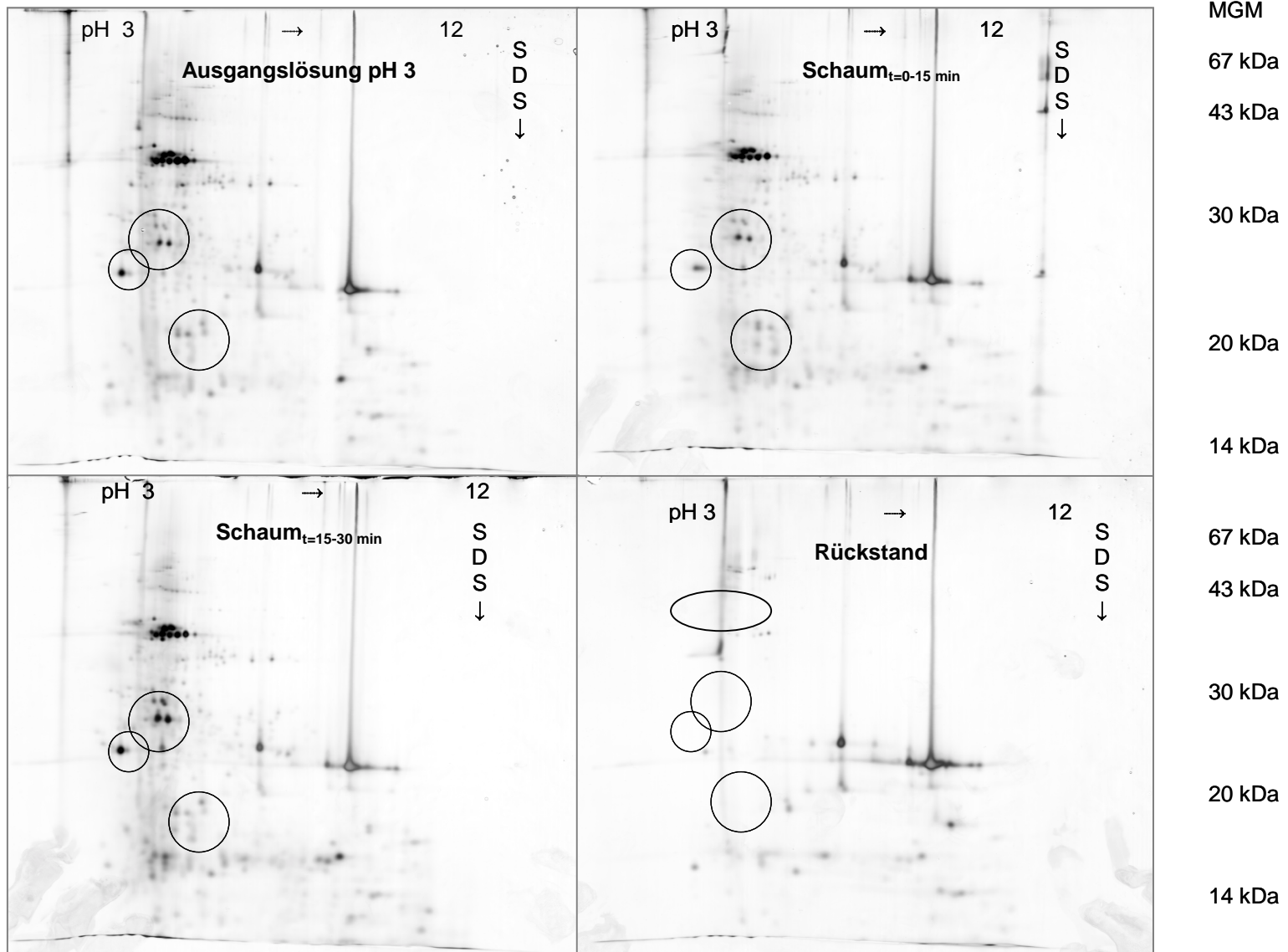


Abb. 4.17: IPG-Dalys der Zerschäumung bei pH 3 mit 0,1 %iger Kochsalzzugabe

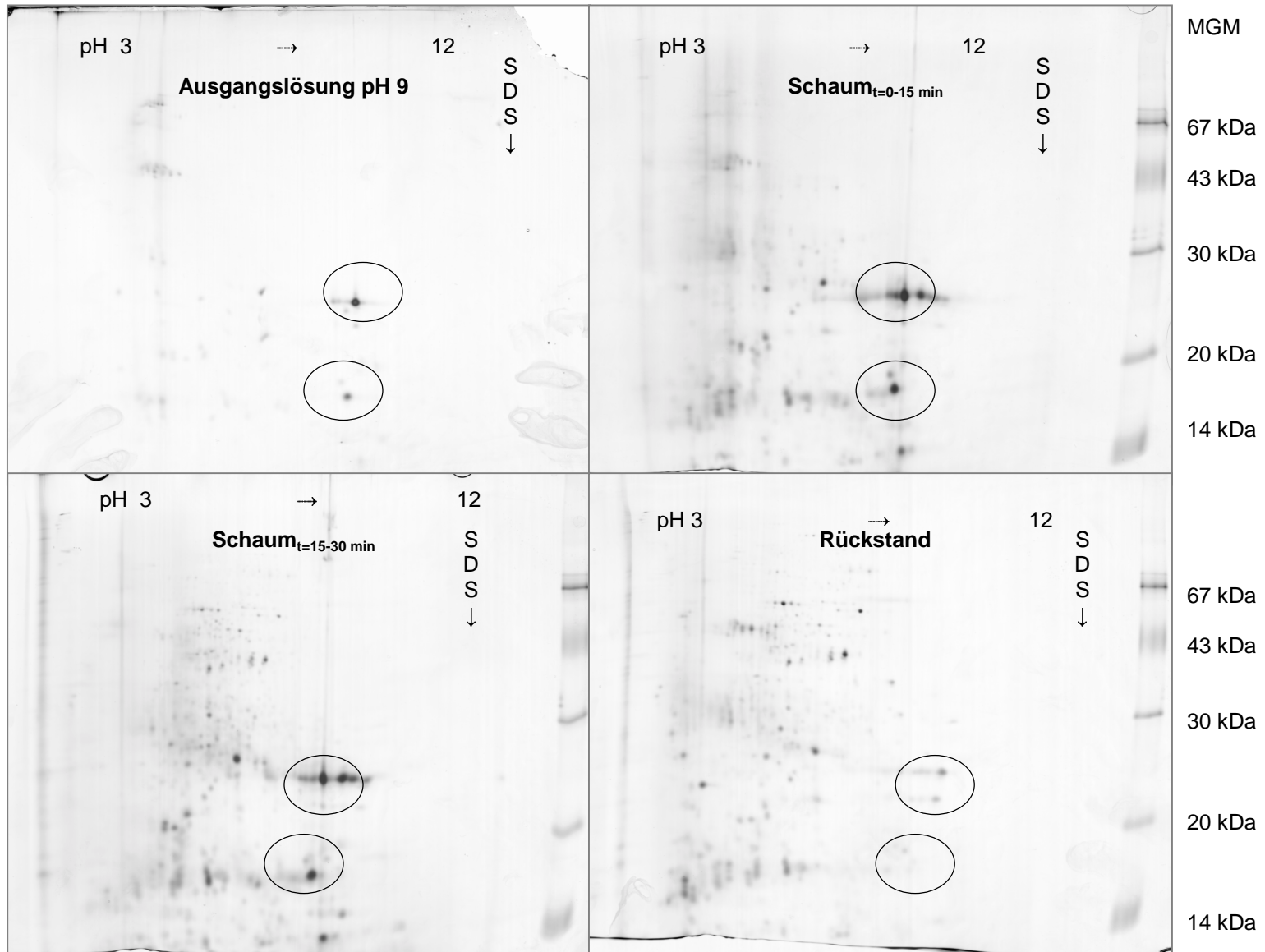


Abb. 4.18: IPG-Dalys der Zerschäumung bei pH 9 mit 0,1 %iger Kochsalzzugabe

4.2.3 Kontinuierliche Zerschäumung

In einem weiteren Schritt wurde die Zerschäumung als kontinuierliches Verfahren umgesetzt. Es wurde sowohl hinsichtlich Gesamtproteinanreicherung optimiert als auch eine mögliche fraktionierte Proteinanreicherung untersucht. Als Pflanzenproteinlösung wurde hier wiederum Kartoffelfruchtwasser eingesetzt.

4.2.3.1 Gesamtproteinanreicherung

Optimierung des Probenahmezeitpunktes

Bei der kontinuierlichen Zerschäumung über 240 min stellte sich heraus, dass eine Probenahme erst ab 30 min nach Zerschäumungsbeginn sinnvoll war, da die Proteinkonzentration im Schaum anfangs ständig stieg und sich erst nach ca. 20-30 min bei einer konstanten Konzentration von $0,76 \pm 0,03$ g/100 ml einpendelte (Abbildung 4.19).

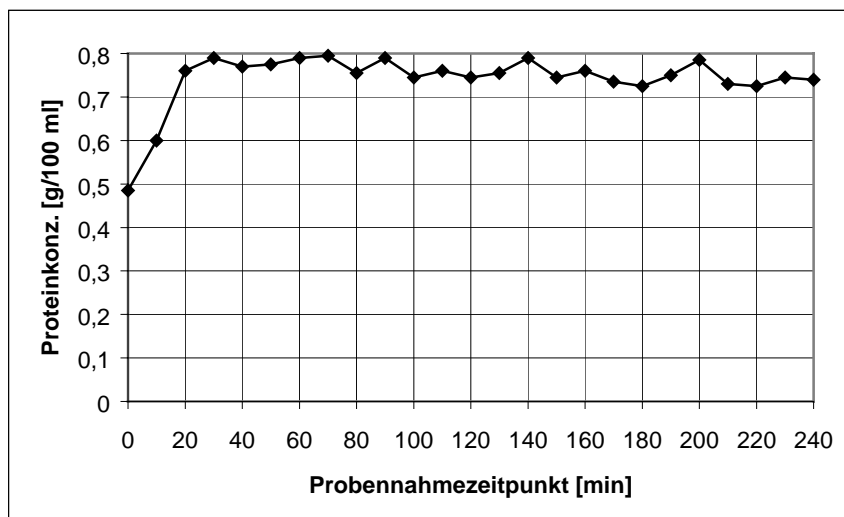


Abb. 4.19: Probenahmezeitpunkt-abhängige Proteinkonzentration im Schaum. Aufgetragen sind die Mittelwerte der Doppelbestimmung

Bei allen weiteren Versuchen wurde daher die Probenahme ab 30 min gestartet (Probenahmezeitpunkt $t=0$).

Einfluss von apparativen Veränderungen auf die kontinuierliche Zerschäumung

Bei der Untersuchung des zusätzlichen Einbaus einer Drainagekugel in den oberen Teil der Zerschäumungskolonne stellte sich heraus, dass der Kugeleinbau die Proteianreicherung im Schaum geringfügig verbesserte (Tabelle 4.13).

Tab. 4.13: Vergleich der kontinuierlichen Zerschäumung mit und ohne Kugeleinbau (Mittelwerte der Doppelbestimmung)

Probe	<i>ohne</i> <i>Kugeleinbau</i>	<i>mit</i> <i>Kugeleinbau</i>
	Proteinkonzentration Schaum [g/100 ml]	Proteinkonzentration Schaum [g/100 ml]
0-5 min	0,93	1,05
5-10 min	0,95	1,20
10-15 min	1,05	1,13
15-20 min	0,96	1,17
20-25 min	1,02	1,09

Der Verlauf der Proteinkonzentration war bei beiden Variationen ähnlich (Abbildung 4.20). Die Proteinkonzentration stabilisierte sich mit Kugeleinbau bei Werten von ca. 1,1 g/100 ml und ohne Kugeleinbau von ca. 1,0 g/100 ml. Die Proteinkonzentrationen im Schaum mit Kugeleinbau lagen 10-15 % höher als ohne.

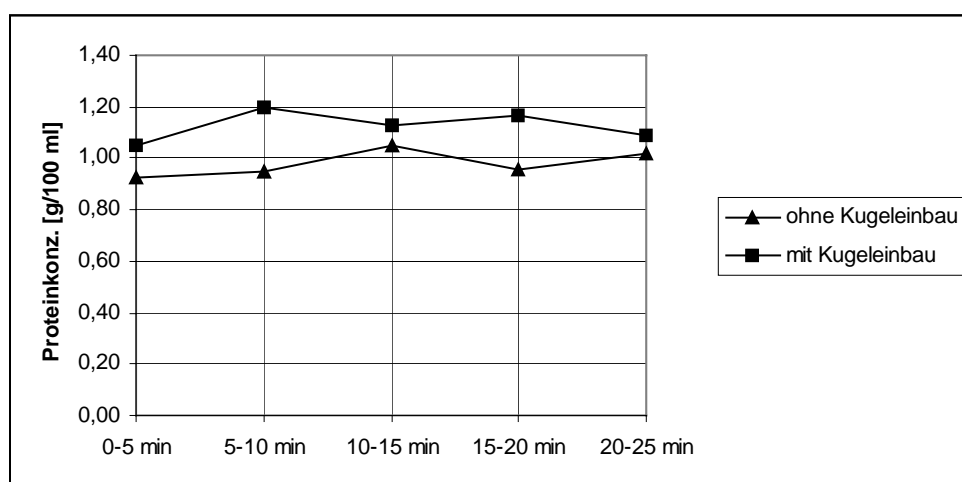


Abb. 4.20: Vergleich der Proteinkonzentrationen im Schaum mit und ohne Kugeleinbau (Mittelwerte der Dreifachbestimmung)

Einfluss einer teilweisen Produktrückführung auf die kontinuierliche Zerschäumung

Bei der teilweisen Rückführung des Foamates in den Schaum zeigte sich, dass bei fast allen Zerschäumungen eine ausreichende Schaumbildung vorhanden war (Tabelle 4.14). Dagegen konnte bei pH 3 nur eine Schaumprobe genommen werden, da der Schaum anschließend zusammenfiel. Die Ausgangslösung hatte einen Proteingehalt von 0,45-0,70 g/100 ml (im basischen Bereich höher); der Rückstand wies nach der Zerschäumung einen um jeweils 0,1 g/100 ml geringeren Proteingehalt als die entsprechende Ausgangslösung auf, was auf eine Proteinanreicherung bei allen Zerschäumungen schließen ließ.

Bei pH 7 konnte ein Minimum ($R=1,87$) und bei pH 3 ein Maximum ($R=4,04$) des Anreicherungsverhältnisses beobachtet werden. Ein Nebenmaximum lag bei pH 9 mit $R=3,30$. Die maximale Proteinkonzentration lag bei pH 9 bei 2,31 g/100 ml.

Tab. 4.14: Proteinkonzentrationen und Anreicherungsverhältnisse der kontinuierlichen Zerschäumung mit teilweiser Rückführung des Foamates. n. d.: nicht durchführbar wegen mangelnder Schaumbildung

pH-Wert	Proteinkonz. Ausgangslösung	Proteinkonz. Schaum $t=0-10$ min		Proteinkonz. Schaum $t=10-20$ min		Proteinkonz. Schaum $t=20-30$ min		Proteinkonz. Rückstand
	[g/100 ml]	[g/100 ml]	R1	[g/100 ml]	R2	[g/100 ml]	R3	[g/100 ml]
3	0,45	1,82	4,04	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	0,35
5	0,49	1,40	2,86	1,32	2,69	1,50	3,06	0,38
7	0,62	1,16	1,87	1,28	2,06	1,28	2,06	0,53
9	0,70	1,98	2,83	2,10	3,00	2,31	3,30	0,62
11	0,67	1,42	2,12	1,50	2,24	1,59	2,37	0,6

Bei der Betrachtung des zeitlichen Verlaufs der Proteinkonzentrationen (Abbildung 4.21) fiel auf, dass der Verlauf mit Ausnahme der Zerschäumung bei pH 3 annähernd der Form einer Sättigungskurve entsprach.

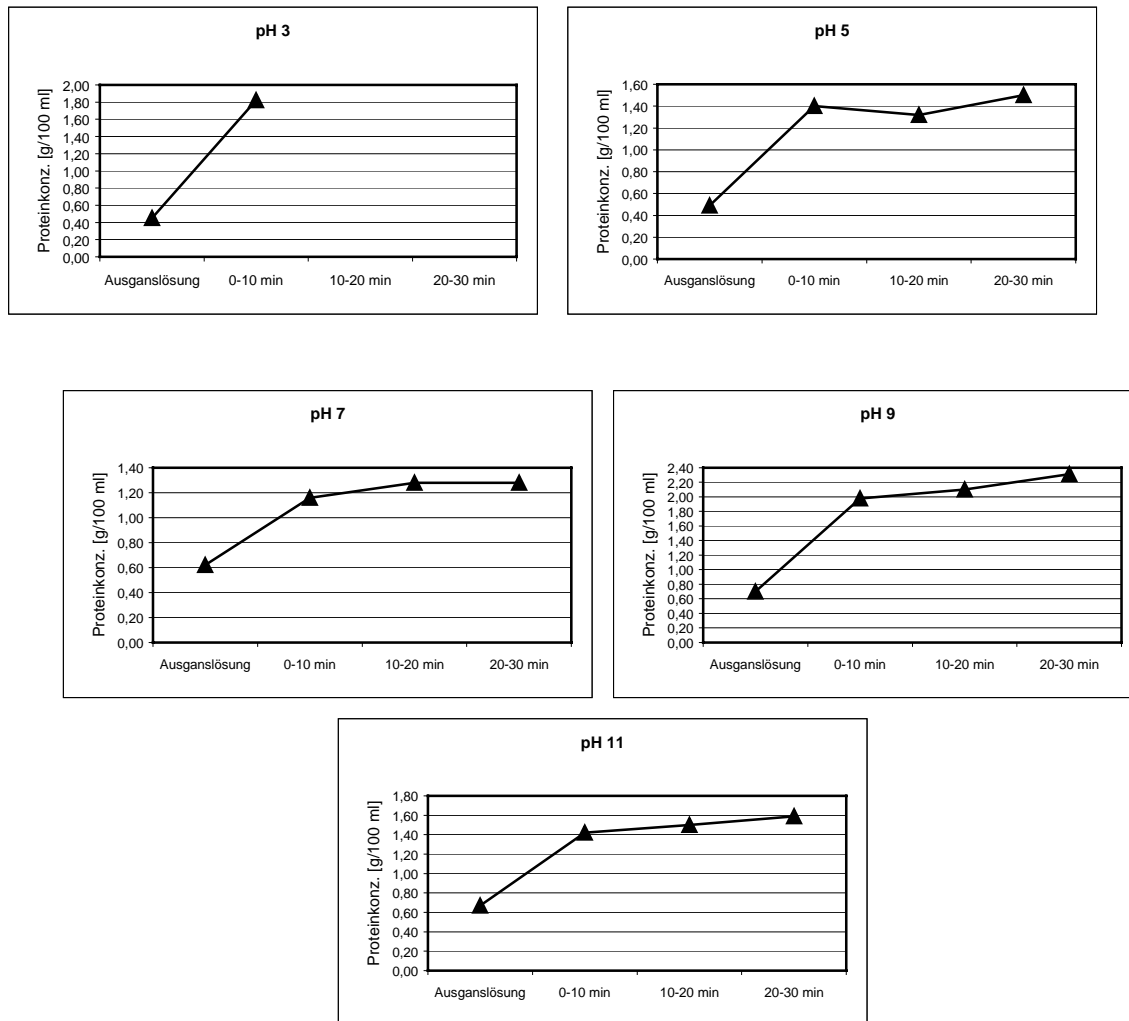


Abb. 4.21: Zeitlicher Verlauf der Proteianreicherung während der kontinuierlichen Zerschäumung mit Foamatrückführung (pH 3, 5, 7, 9, 11)

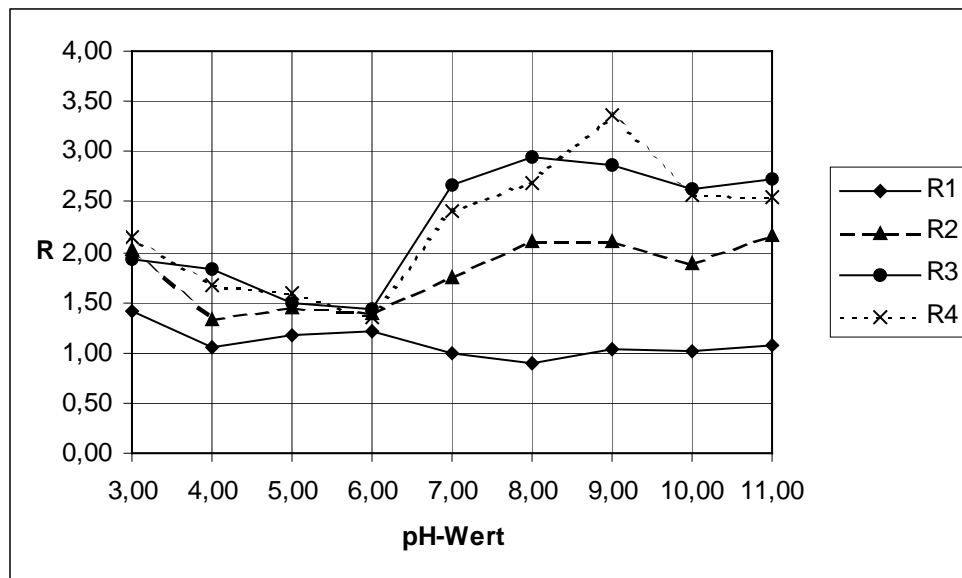
Einfluss der Einspeisung der Ausgangslösung in den Schaum

Bei der Einspeisung der Ausgangslösung in den Schaum 20 cm über dem Flüssigkeitsspiegel zeigte sich, dass bei allen Versuchen eine ausreichende Schaumbildung vorhanden und somit eine Zerschäumung möglich war (Tabelle 4.15). Die Schaumproben wiesen meist höhere Proteinkonzentrationen als die zugehörigen Ausgangslösungen auf, was eine Proteianreicherung im Schaum zeigte.

Tab. 4.15: Proteinkonzentrationen und Anreicherungsverhältnisse R verschiedener Proben während der Zerschäumung

pH-Wert	Proteinkonz. Ausgangslösung	Proteinkonz. Schaum $t=0-10$ min		Proteinkonz. Schaum $t=10-20$ min		Proteinkonz. Schaum $t=20-30$ min		Proteinkonz. Schaum $t=30-40$ min	
	[g/100 ml]	[g/100 ml]	R1	[g/100 ml]	R2	[g/100 ml]	R3	[g/100 ml]	R4
3	0,42	0,59	1,40	0,85	2,02	0,81	1,93	0,90	2,14
4	0,43	0,45	1,05	0,57	1,33	0,79	1,84	0,72	1,67
5	0,45	0,53	1,18	0,65	1,45	0,68	1,50	0,72	1,60
6	0,48	0,58	1,21	0,67	1,40	0,69	1,44	0,65	1,35
7	0,43	0,43	1,00	0,75	1,76	1,14	2,68	1,03	2,41
8	0,36	0,32	0,90	0,76	2,11	1,06	2,94	0,97	2,68
9	0,35	0,36	1,04	0,74	2,11	1,00	2,86	1,18	3,36
10	0,40	0,41	1,01	0,76	1,90	1,05	2,63	1,03	2,56
11	0,40	0,43	1,08	0,87	2,18	1,09	2,73	1,02	2,54

Abbildung 4.22 zeigt, dass sich mit dieser Versuchsanordnung bei pH 9 eine maximale Proteinanreicherung im Schaum erzielen ließ. Ferner war die Proteinanreicherung im Sauren stark verschlechtert, und ab pH 7 stieg sie sprunghaft an.

**Abb. 4.22:** pH-abhängige Anreicherungsverhältnisse bei der Zerschäumung mit Einspeisung in den Schaum

Auch hier wirkte sich die Zeitdauer der Zerschäumung auf die Anreicherung aus. Erst nach 30 min wurde eine Konstanz in der Proteinanreicherung erreicht. Die erste gezogene Schaumprobe zeigte noch keine Anreicherung.

4.2.3.2 Anreicherung einzelner Proteinfractionen

Bei der kontinuierlichen Zerschäumung mit Einspeisung in die Flüssigkeit (Abbildung 4.23) war bei den Schaumproben eine höhere Intensität der Banden als bei der Ausgangslösung zu erkennen, was auf eine Proteinanreicherung im Schaum deutete. Bei pH 2 fand eine äußerst starke Proteinanreicherung statt. Mit zunehmender Zerschäumungsdauer stieg die Proteinanreicherung bei allen eingestellten pH-Werten. Die Intensität der Bande bei 43 kDa blieb mit Ausnahme von pH 2 ungefähr gleich stark. Die Banden 20 und 23 kDa verloren ab pH 7 immer mehr an Intensität. Eine fraktionierte Anreicherung bestimmter Proteinfractionen war jedoch nicht zu erkennen.

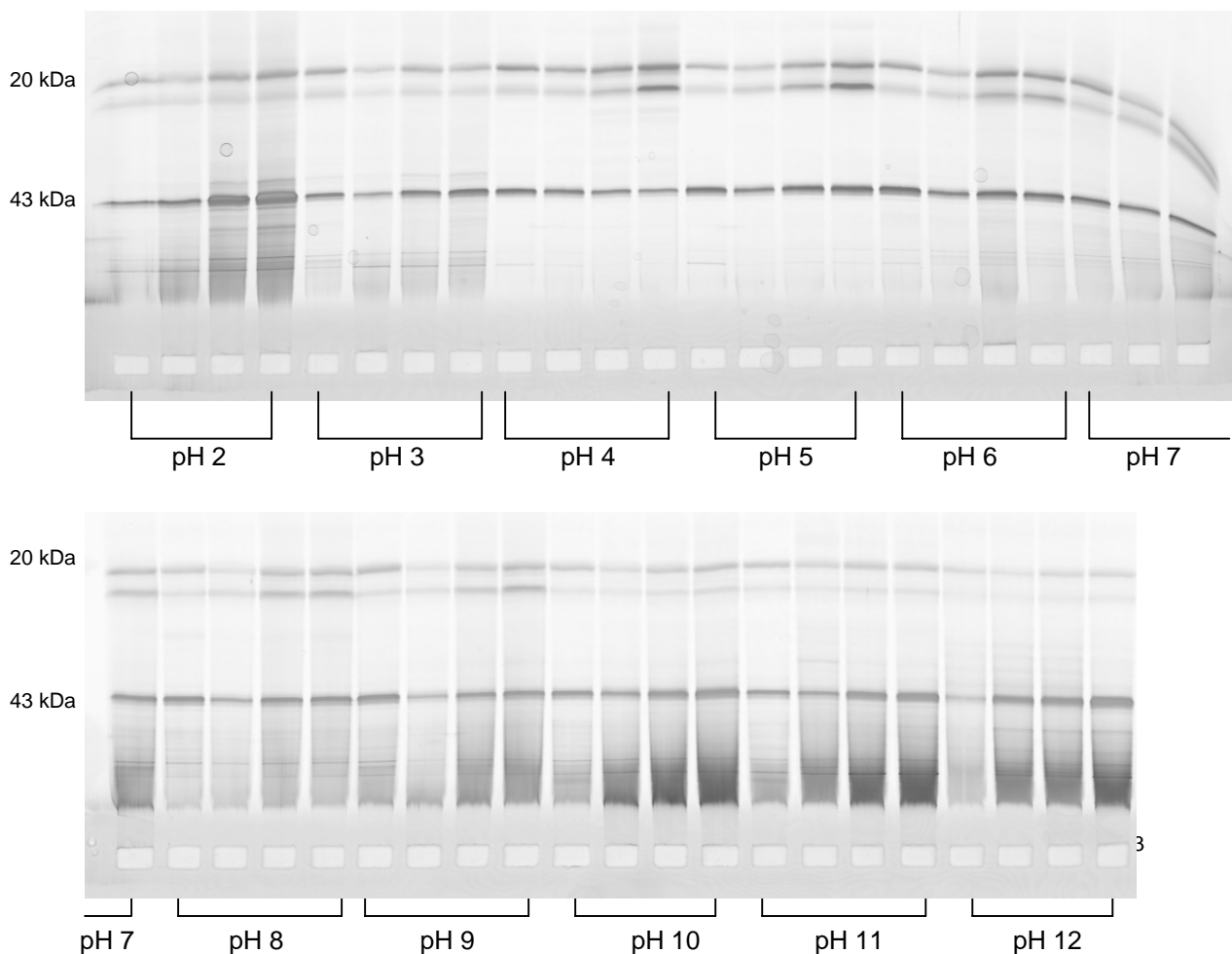


Abb. 4.23: SDS-PAGE der kontinuierlichen Zerschäumung mit Produktzufuhr in die Flüssigkeit. **A:** Ausgangslösung; **S1-S3:** aufeinanderfolgende Schaumproben, gezogen in 10 minütigem Abstand

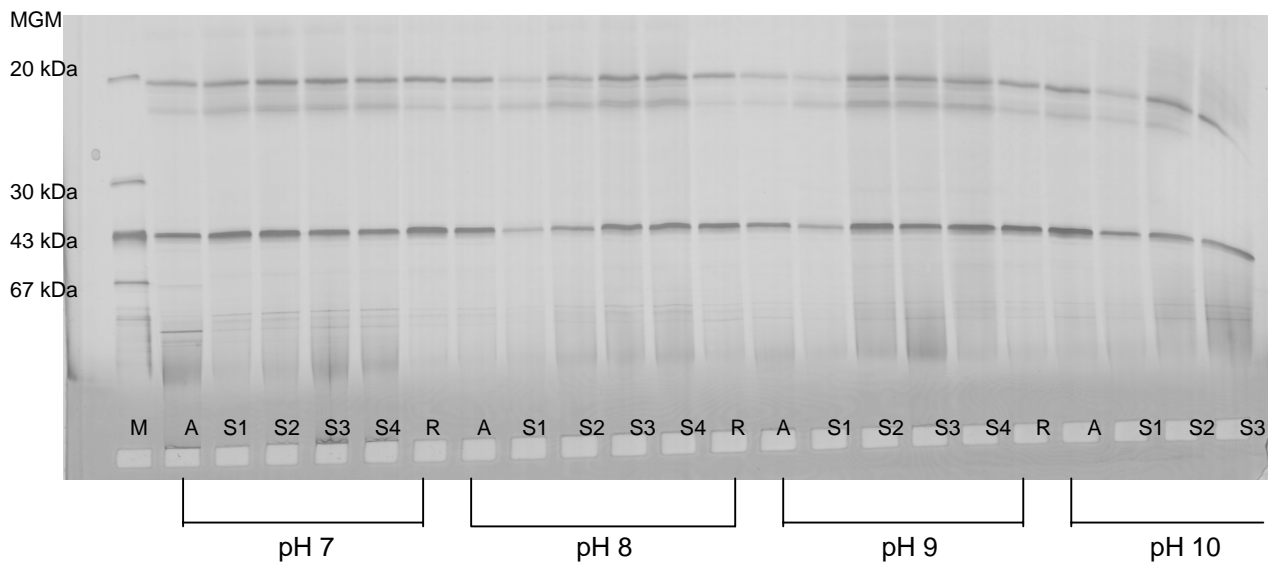
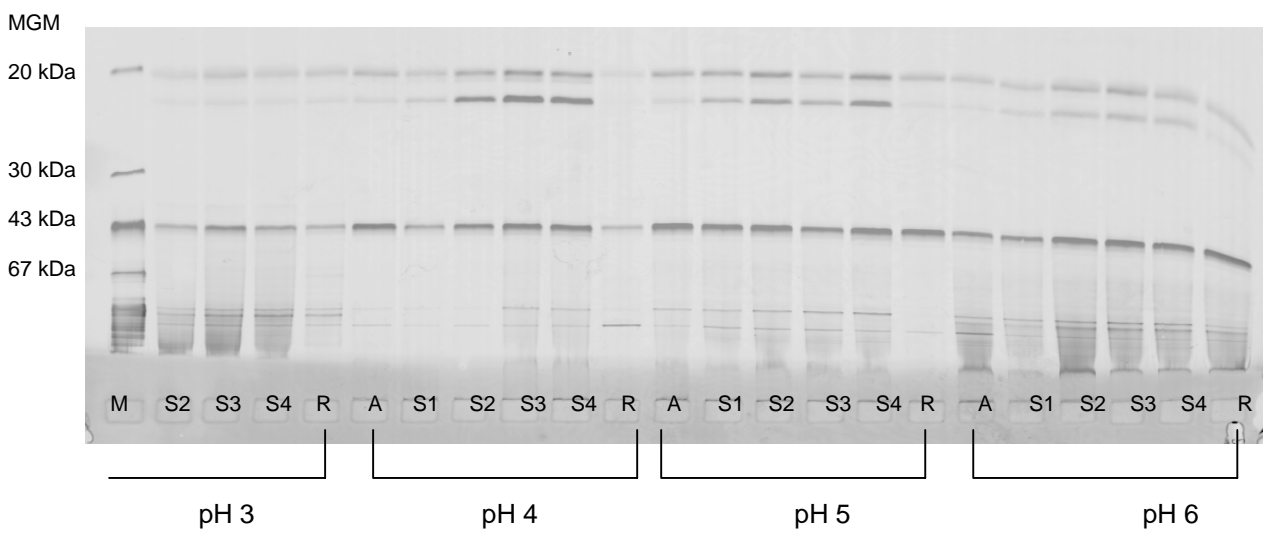
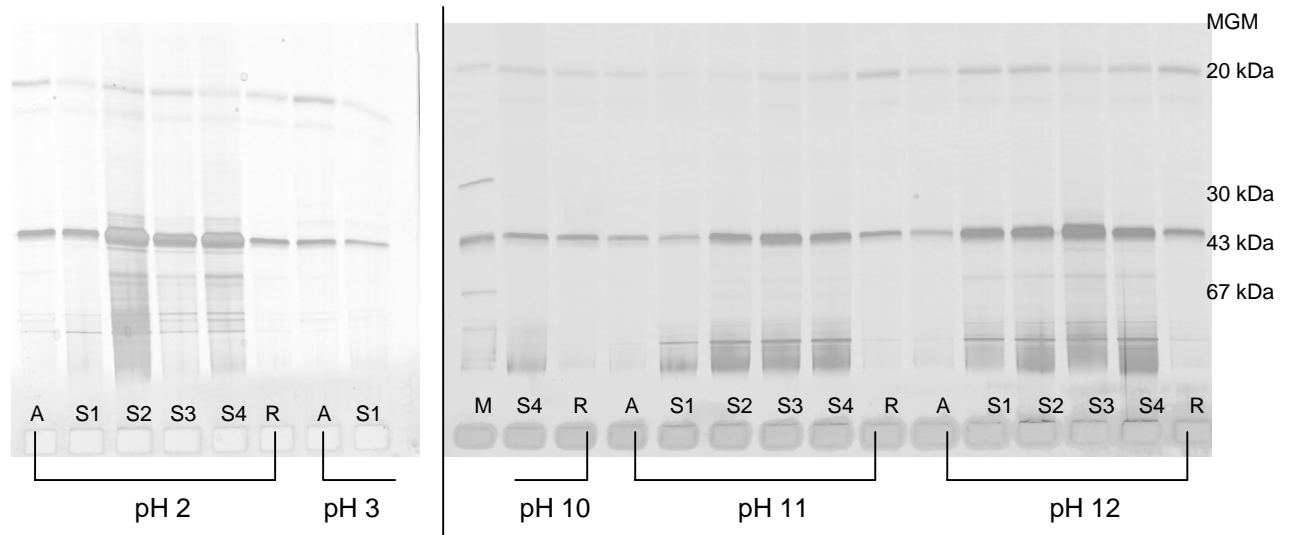


Abb. 4.24: SDS-PAGE der kontinuierlichen Zerschäumung mit Produktzufuhr in den Schaum. M: Molekulargewichtsmarker; A: Ausgangslösung; S1-S4: aufeinanderfolgende Schaumproben (Zeitintervall 10 min)

Während der kontinuierlichen Zerschäumung mit Einspeisung in den Schaum war ein ähnliches Verhalten über den gesamten pH-Bereich wie mit Einspeisung in die Flüssigkeit festzustellen. Lediglich die Banden bei pH 7, 8 und 9 fielen in ihrer Intensität schwächer aus (Abbildung 4.24).

Kontinuierliche Zerschäumung bei pH 3

In Abbildung 4.25 ist zu erkennen, dass auch hier der Schaum intensiver gefärbte Spots zeigte als die Ausgangslösung. Ferner war zu erkennen, dass die Proteinfractionen mit einem isoelektrischen Punkt im Bereich von 4-6 im Schaum angereichert wurden. Die Anreicherung fand über den gesamten Bereich von 14-67 kDa statt. Eine selektive Anreicherung bestimmter Proteinfractionen, so wie sie beim Batch-Verfahren beobachtet werden konnte (vgl. 4.2.2.2), war hier nicht zu erkennen.

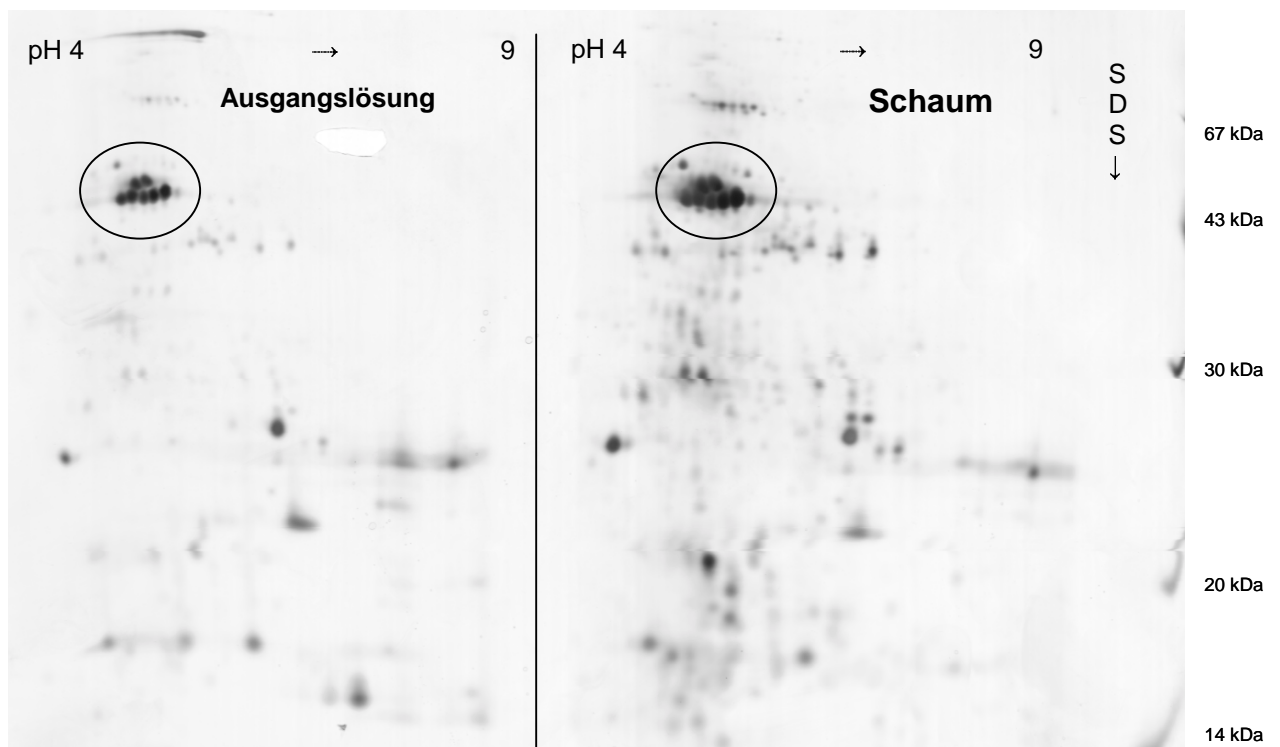


Abb. 4.25: Vergleich der Ausgangslösung mit der Schaumprobe während der kontinuierlichen Zerschäumung bei pH 3 (IPG-Dalt)

Kontinuierliche Zerschäumung bei pH 9

In Abbildung 4.26 ist zu erkennen, dass sich die Proteinfractionen mit einem isoelektrischen Punkt im Bereich von 8-9 im Schaum besonders stark anreicherten, und zwar bis zu 25 kDa. Die Intensität der Spots der Schaumprobe bei ca. 43 kDa ist deutlich schwächer als in der Ausgangslösung, was bedeutet, dass hier eine Abnahme dieser Proteinfractionen im Schaum stattgefunden hat.

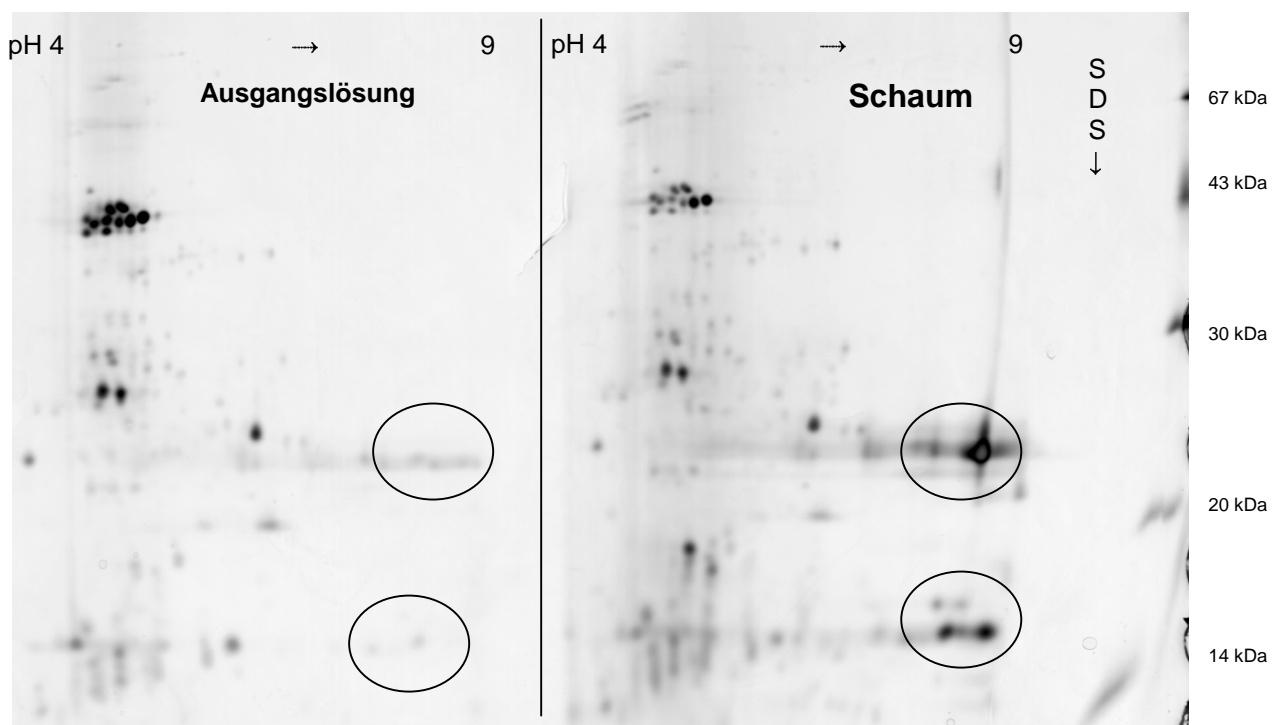


Abb. 4.26: Vergleich der Ausgangslösung mit der Schaumprobe während der kontinuierlichen Zerschäumung bei pH 9 (IPG-Dalt)

4.3 Gesamtproteinanreicherung bei der Zerschäumung von Kartoffelschlempe

Die Gehalte an ausgewählten Mineralstoffen der verwendeten Kartoffelschlempe sind in Tabelle 4.16 zusammengefasst.

Tab. 4.16: Mineralstoffzusammensetzung der Kartoffelschlempe, gemessen mit AAS

Element	Konzentration [mg/l]
Calcium	111
Eisen	12,4
Kalium	4310
Kupfer	1,65
Magnesium	242
Mangan	1,35
Natrium	50,6
Zink	2,41

Bei der Zerschäumung der Kartoffelschlempe aus der Versuchs- und Lehrbrennerei zeigte sich, dass bei einem bestimmten pH-Wert eine Proteinanreicherung durch Zerschäumung erreicht werden konnte (Abbildung 4.27 und Tabelle 4.17). Der pH-Wert des Schaums blieb unverändert.

Die Proteinkonzentration der auf verschiedene pH-Werte eingestellte Kartoffelschlempe unterlag relativ starken Schwankungen (0,81-1,67 g/100 g).

Tab. 4.17: Einfluss des pH-Wertes auf die Zerschäumung von Kartoffelschlempe

pH-Wert	Proteinkonzentration Ausgangslösung [g/100 g]*	Proteinkonzentration Schaum 0-8 min		Proteinkonzentration Schaum 8-16 min	
		[g/100 g]*	R1	[g/100 g]*	R2
2	1,32	0,70	0,53	0,77	0,58
3	1,15	0,92	0,80	0,84	0,73
4	1,67	1,00	0,60	1,02	0,61
5	1,61	1,40	0,87	1,03	0,64
6	0,82	0,87	1,06	1,21	1,48
7	1,37	0,81	0,59	0,77	0,56
8	1,49	1,31	0,88	0,72	0,48
9	1,32	1,42	1,08	0,95	0,72
10	1,13	0,81	0,72	0,84	0,74
11	0,86	0,59	0,69	0,64	0,74
12	0,81	1,11	1,37	1,30	1,60

* auf unverdünnte Schlempe bezogen

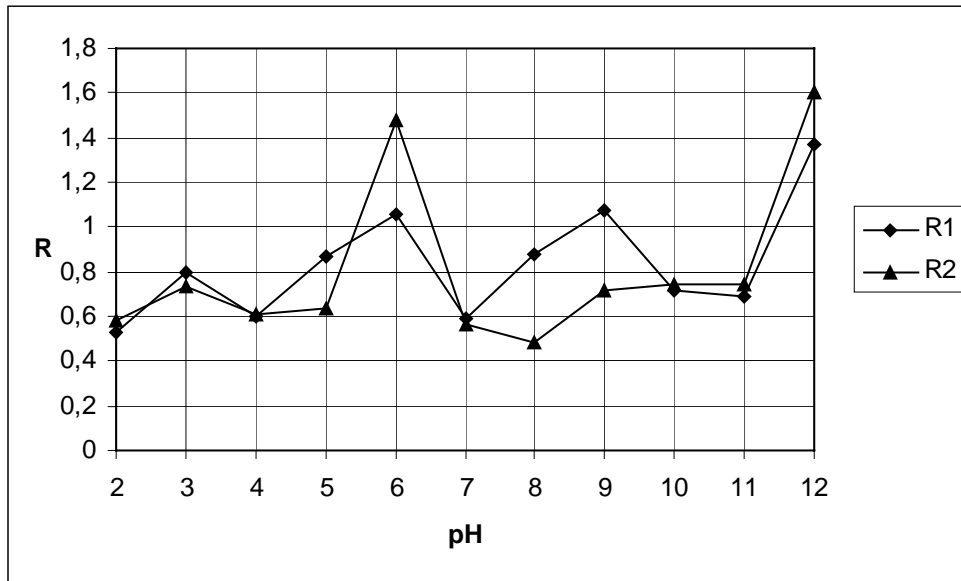


Abb. 4.27: pH-abhängige Anreicherungsverhältnisse bei der Zerschäumung von Kartoffelschlempe

Ein maximales Proteinanreicherungsverhältnis konnte bei der Zerschäumung bei pH 12 mit $R=1,60$ erreicht werden. Bei pH 6 war die Anreicherung mit 1,48 vergleichbar hoch.

Die kontinuierliche Zerschäumung brachte hier im Gegensatz zur Batch-Methode keine deutliche Verbesserung der Proteinanreicherung. In den Schaumproben bis 40 min wurde kein Protein angereichert. Erst bei 50-minütiger Zerschäumung war eine Proteinkonzentration im Schaum von 1,32 g/100 g zu erzielen (Abbildung 4.28).

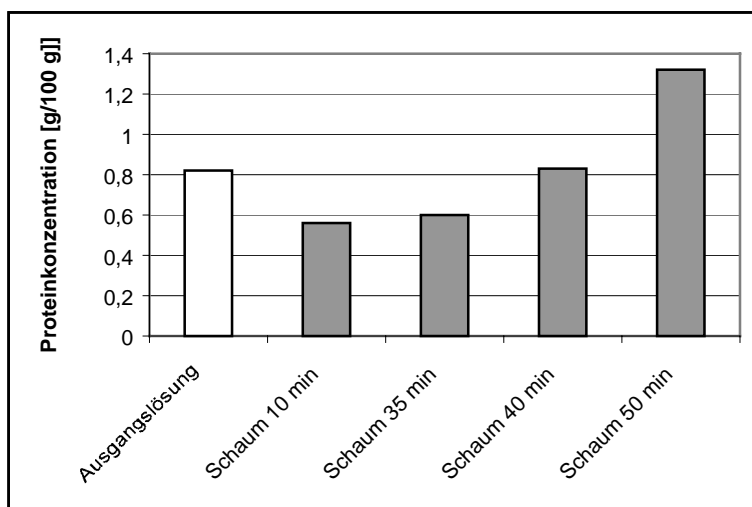


Abb. 4.28: Kontinuierliche Zerschäumung der Kartoffelschlempe

5 DISKUSSION

Ein bei allen Zerschäumungen zu beachtender Punkt ist folgender: Bei der Einlagerung der nativen Proteine in die Grenzschicht kommt es zu Denaturierungsvorgängen. Danach besitzen die Proteinmoleküle veränderte, evtl. sogar verschlechterte Schaumeigenschaften, was zur Folge haben kann, dass die eingelagerten Moleküle die Grenzschicht wieder verlassen und mit der Drainageflüssigkeit wieder zurückfließen können.

5.1 Zerschäumung von Referenzproteinen

Bei Albumin konnte festgestellt werden, dass bei verdünnterer Ausgangslösung das Proteinanreicherungsverhältnis im Schaum gesteigert wurde. Die Ursache hierfür könnte die begrenzte Proteinaufnahmekapazität der Blasenoberfläche sein. Ferner hat auch der amphiphile Aufbau des Albumins mit polaren und unpolaren Seitenketten einen Einfluss auf die Proteinanreicherung im Schaum. So können in höher konzentrierten Lösungen stabile Proteinaggregate gebildet werden, was auch hier die effektive Konzentration der für die Grenzfläche zur Verfügung stehenden Proteine herabsetzen kann. Dasselbe Verhalten konnte auch bei der nachfolgenden Untersuchung von Kartoffelfruchtwasser beobachtet werden. Dies bestätigt die Untersuchungen von *Bartsch (1926)* und *Ahmad (1975a)*.

Im Unterschied hierzu war bei der Zerschäumung von Hämoglobin überhaupt nur in sehr stark verdünnter Lösung eine geringe Proteinanreicherung im Schaum zu erkennen. Die Ursache hierfür könnte entweder darin liegen, dass sich das Proteinmolekül an der Blasenoberfläche zwar auffaltet und in die Grenzschicht einlagert, eine Entwässerung des Schaums jedoch nicht stattfinden kann, da durch die Freilegung von Seitenketten bei der Adsorption an die Blasenoberfläche die vorhandenen Wassermoleküle mit diesen neu freigelegten Seitenketten intermolekulare Wechselwirkungen eingehen und dadurch im Schaum gehalten werden können. Ein weiterer Punkt ist, dass sich Albumin – im Unterschied zu Hämoglobin – in die Grenzschicht möglicherweise in einer geordneten Struktur einlagern kann, und sich so eine höhere Proteinanreicherung im Schaum ergibt. Es kann auch sein, dass Hämoglobin grund-

sätzlich strukturbedingt wesentlich schlechtere Schaumeigenschaften besitzt, worüber jedoch keine Untersuchungen vorlagen. Genaueres sollte jedoch durch weiterführende Untersuchungen geklärt werden, bei denen dann z. B. über die vorhandenen Disulfidbrückenbindungen Aussagen über die Flexibilität und damit über das Schaumverhalten gemacht werden könnten (*Charm, 1972*).

Des Weiteren konnte bei beiden Proteinen eine Verbesserung der Proteinanreicherung durch Erniedrigung der Gasflussgeschwindigkeit beobachtet werden. Dies könnte sowohl auf eine Erhöhung des internen Rückflusses als auch auf eine Verstärkung der Koaleszenz durch längere Verweilzeit des Schaums in der Zerschäumungssäule zurückgeführt werden. Auch wird durch niedrige Gasflussgeschwindigkeiten nicht so viel Flüssigkeit mit in den Schaum gerissen, was ebenfalls die Proteinanreicherung erhöhen könnte.

Ferner wurde bei Albumin eine Verschlechterung der Proteinanreicherung durch NaCl-Zugabe (0,001-1,0 g/100 ml) beobachtet, was auf eine mögliche Bildung von Kolloiden in der Ausgangslösung durch die Anwesenheit von Elektrolyten hindeutet. Die Untersuchungen von *Ahmad und Fridberg (1972)* und *Ahmad (1975b)*, in denen ebenfalls die Proteinanreicherung bei der Zerschäumung von Albumin unter Salzzugabe verschlechtert wurde, wurden damit bestätigt. Da in dem untersuchten Konzentrationsbereich auch die natürlichen Salzgehalte von Kartoffelfruchtwasser liegen, muss auch dort mit einem solchen negativen Einfluss gerechnet werden. Die Proteinanreicherung im Schaum bei Hämoglobin wurde durch eine geringe Salzzugabe erstaunlicherweise etwas verbessert (0,001-0,01 g/100 ml), was auf den Einsalzeffekt zurückgeführt werden kann, bei dem eine Löslichkeitserhöhung durch Zurückdrängen von elektrostatischen Protein-Protein-Wechselwirkungen stattfindet. In höheren Konzentrationen (0,05-1,0 g/100 ml) wird hingegen die Proteinlöslichkeit durch Kolloidbildung herabgesetzt (Aussalzeffekt), was die Proteinanreicherung im Schaum verschlechtert (*Belitz und Grosch, 1992*).

Eine Zugabe von D-(-)-Fructose (0,001-1,0 g/100 ml) beeinflusste die Proteinanreicherung im Schaum negativ, wobei der Zucker selbst jedoch keine oberflächenaktiven Eigenschaften besitzt. Dies ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass dieser Zucker mit den Proteinen intermolekulare Wechselwirkungen eingehen (Dispergierung und Stabilisierung der Proteinaggregate) kann. Die Dispersion des Proteins in der Lösung in Form kolloidaler Partikel kann so die an der Blasenoberfläche vorhandene Proteinmenge reduzieren. In dem verwendeten Kartoffelfruchtwasser waren

Fructosekonzentrationen in der untersuchten Größenordnung enthalten, so dass für das Kartoffelfruchtwasser auch hierdurch mit einem negativen Einfluss gerechnet werden muss.

Ein maximales Proteinanreicherungsverhältnis bei der Zerschäumung am isoelektrischen Punkt konnte weder bei Albumin noch bei Hämoglobin beobachtet werden. Im Gegenteil, bei Albumin konnte im Bereich des isoelektrischen Punktes bei 4,9 ein Minimum des Anreicherungsverhältnisses beobachtet werden, während die Zerschäumung bei pH 3 am effektivsten war. Durch das Ladungsminimum am pI sind die Proteine in der Lage, sich zusammenzulagern, und eventuell können sie sich dann auf Grund ihrer Größe schlechter in die Grenzschicht einlagern, was bedeutet, dass auch die Anreicherung im Schaum minimal ist. In den Versuchen von *Schnepf und Gaden (1959)*, *Ahmad (1975a)* und *DeSouza et al. (1991)* war zwar die Anreicherung gerade am pI maximal, aber die Versuchsbedingungen waren auch nicht vergleichbar.

DeSouza et al. verwendeten neben anderen Proteinen (Invertase und α -Amylase) auch andere Gase (Luft bzw. CO_2). Auch von *Schnepf und Gaden* wurde Luft als Zerschäumungsgas verwendet, so dass wahrscheinlich der pH-Wert während der Zerschäumung verändert wurde. Ferner muss wegen der damals noch nicht so weit entwickelten Proteinreinigungsmethoden die Reinheit des verwendeten Rinderalbumins in Frage gestellt werden. Die Untersuchungen von *Ahmad* wurden im kontinuierlichen Verfahren durchgeführt. Auch hier war das verwendete Albumin nicht ganz rein (97,7 % Protein), d. h. die Zerschäumung könnte durch andere Inhaltsstoffe (Salze etc.) beeinflusst worden sein. Ein weiterer wichtiger Punkt ist, dass nur bei 4 pH-Werten gemessen wurde, so dass Aussagen über ein maximales Anreicherungsverhältnis nur begrenzt möglich sind.

5.2 Zerschäumung von Kartoffelfruchtwasser

5.2.1 Zusammensetzung des Probenmaterials

Die Proteinzusammensetzung einer Kartoffelsorte hängt von gewissen Einflussfaktoren ab. Sie verändert sich z. B. während der verschiedenen Wachstumsstadien.

Faktoren wie Bodenbeschaffenheit, Klima, Düngung, Ernte- und Lagerbedingungen und Lagerzeit haben jedoch keinen Einfluss auf das qualitative Proteinmuster (Stegemann, 1975; Zimmermann und Rosenstock, 1978). Für die Identifizierung einer Kartoffelsorte ist es deshalb wichtig zu wissen, in welchem Entwicklungsstadium das Proteinmuster der Kartoffel stabil ist. Zudem ist bei der Beurteilung des Kartoffelfruchtwassers zu bedenken, dass ca. 24 % des Gesamtstickstoffgehaltes im Presskuchen verbleiben (Gorinstein et al., 1988). Aber selbst wenn bei einer Kartoffelsorte keine Kenntnisse über die genannten Einflussfaktoren vorliegen, können die Ergebnisse zwar nicht zur Identifizierung der Sorte verwendet werden, jedoch kann diese Sorte als repräsentatives Probenmaterial mit gelösten Proteinen zur Zerschäumung eingesetzt werden.

Die SDS-PAGE des Kartoffelfruchtwassers lieferte ein reproduzierbares Proteinbandenmuster mit charakteristischen Banden bei 17, 20-25 und 43 kDa. Auch in der nachfolgenden hochauflösenden 2 D-Gelelektrophorese (IPG 3-12) konnten diese Proteinfractionen erkannt und bestätigt werden. Auf Grund der höheren Auflösung dieser Methode konnten jedoch weit mehr Proteine über den gesamten Bereich von 14-80 kDa registriert werden. Ferner ließ sich bezüglich der Verteilung nach isoelektrischen Punkten eine breitgefächerte Verteilung der Proteinfractionen von pI 3-11 erkennen. Somit war die Repräsentativität des ausgewählten Probenmaterials durch die Verteilung der einzelnen Proteinfractionen über einen breiten Bereich sowohl hinsichtlich Molekulargewicht als auch isoelektrischem Punkt gewährleistet.

Die hier gewonnenen Pherogramme zeigten gute Übereinstimmung mit den Untersuchungen an Kartoffelproteinen von Gorinstein et al. (1988). Die charakteristischen Proteinfractionen wie Albumin, Globulin, Prolamin und Glutelin waren auf Grund ihres Molekulargewichtes unterschiedlichen Banden zuzuordnen. Die von Gorinstein et al. (1988) nachgewiesene starke Ausprägung der Bande bei 45 kDa entsprach der in den Zerschäumungsversuchen mit der Kartoffelsorte *Solanum tuberosum* var. *agria* gefundenen Bande bei 45 kDa. Es ist dies die Hauptproteinfraction der meisten Kartoffelsorten. Im niedermolekularen Bereich fand er die Hauptbanden zwischen 12 und 25 kDa. Die in dieser Arbeit registrierten niedermolekularen Fraktionen der Sorte *Agria* lagen bei 14-25 kDa. Die ausgeprägte Bande im Bereich 45 kDa kann nach Gorinstein et al. hauptsächlich der Albuminfraction zugeordnet werden und die Banden im niedermolekularen Bereich vorwiegend der Globulin- bzw. Prolaminfraction.

Im Kartoffelfruchtwasser konnten alle löslichen Inhaltsstoffe gefunden werden. Der Stärkegehalt war dabei im Vergleich zur ganzen Knolle (14,1 %) mit etwa 0,14 % relativ gering.

Der Gehalt an Vitamin C, welcher einer ständigen Reduzierung, z. B. durch vorhandenen Sauerstoff und Licht, unterworfen ist, ist ebenfalls niedrig, was von der ca. 6-monatigen Lagerung der Knollen resultiert. Der Gehalt unterliegt in der Knolle verschiedenen Einflussfaktoren. So liegt die Ursache der jährlichen Schwankungen zu ca. 50 % an der jährlichen Sonnenscheindauer während des Anbaus. Auch die Nährstoffversorgung bzw. die Bodenbeschaffenheit hat großen Einfluss auf den Gehalt (*Kolbe, 1997*).

Die Nitratbestimmung unterlag relativ großen Schwankungen, da hier möglicherweise Störungen (Hemmung der Nachweisreaktion) durch vorhandenen Chloridionen vorkamen, so dass dieser Wert von einer Interpretation ausgeklammert werden muss. Jedoch liegen zum Einfluss des Nitratgehaltes auf die Zerschäumung bisher keine Untersuchungen vor.

Die im Kartoffelfruchtwasser vorkommenden Zucker Glucose (0,143 g/L), Fructose (0,150 g/L) und Saccharose (0,537 g/L) könnten allerdings die Zerschäumung negativ beeinflussen. So wurde von *Ahmad (1975b)* festgestellt, dass durch das Vorhandensein von Zucker die Bildung von kolloidal gelösten Proteinen gefördert werden kann und sich dadurch die Effizienz der Zerschäumung verschlechtert. Auch in dieser Arbeit konnte ein negativer Einfluss von Zuckern im Bereich von 0,01-10 g/L auf die Zerschäumung von Referenzproteinen festgestellt werden.

Ein zusätzlicher Faktor für die Verschlechterung der Effektivität der Zerschäumung ist das Vorhandensein von Metallionen wie z.B. Calcium oder Natrium, wodurch ebenfalls die Bildung von Kolloiden gefördert und damit die Schaumbildung verschlechtert wird (*Ahmad und Fridberg, 1972*). Im Kartoffelfruchtwasser lagen die mit AAS gemessenen Mineralstoffe in einer Gesamtkonzentration von ca. 6,5 g/L vor. In wie weit diese Konzentration für die Zerschäumung von Kartoffelproteinen relevant ist, lässt sich nicht sagen, da der Einfluss des Gesamtgehaltes von Mineralstoffen noch nicht untersucht wurde.

5.2.2 Vergleich der Batch- mit der kontinuierlichen Zerschäumung

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass es mit Hilfe der Zerschäumungsanalyse möglich ist, Proteine im Schaum anzureichern. Dies wurde mit Kartoffelfruchtwasser als Modelllösung demonstriert. Die Einflussfaktoren auf die Zerschäumung waren Proteinkonzentration, Gasflussgeschwindigkeit, pH-Wert und NaCl.

Batch-Zerschäumung

Im Rahmen dieser Versuche konnte bestätigt werden, dass die beste Effektivität der Zerschäumung in verdünnten Lösungen erzielt wird. Bei Verdünnung der Ausgangslösung steigt die Proteinanreicherung im Schaum. Dies liegt daran, dass die Blasenoberfläche nur eine ganz bestimmte Kapazität hat, um Proteine einzulagern. So kann auch in konzentrierteren Lösungen nur eine ganz bestimmte Menge an Protein in die Grenzschicht gelangen und als Schaum aufsteigen (*Phillips, 1981*). Der Überschuss an Protein fließt im Schaum durch die Drainage wieder zurück in den Flüssigkeitspool. Eine weitere Erklärung hierfür ist der amphiphile Aufbau der Proteine mit polaren und unpolaren Seitenketten. So können in höher konzentrierten Lösungen stabile Proteinaggregate gebildet werden, was die effektive Konzentration der für die Grenzschicht zur Verfügung stehenden Proteine herabsetzen kann.

Auch die pH-abhängige Anreicherung der Proteine ist teilweise auf die amphiphile Natur der Proteine zurückzuführen. Des Weiteren ist auch die Löslichkeit der Proteine pH-abhängig, so dass auch hier schon bei der Probenvorbereitung ein kleiner Teil ausfallen und abfiltriert werden kann. Hier kommt dazu, dass bei der Einstellung eines bestimmten pH-Wertes manche Proteine aus dem komplexen Proteingemisch an ihrem isoelektrischen Punkt vorliegen, somit nahezu ungeladen sind und dadurch veränderte Schaumeigenschaften aufweisen, was ebenfalls einen Einfluss auf die Gesamtproteinanreicherung hat. Die Untersuchungen von *Schnepf und Gaden (1959)* und *Ahmad (1975a)*, welche dies an Einzelproteinlösungen untersucht hatten, konnten somit bestätigt werden. In den hier vorgestellten Untersuchungen wurde erstmalig ein komplexes Proteingemisch (statt der Einzelproteinlösungen) verwendet, und es ergab sich dabei das gleiche Resultat. Wegen der unterschiedlichen Parameter der Versuchsansätze ist jedoch ein Vergleich der vom pH-Wert abhängigen Untersuchungen nicht möglich.

Die Erhöhung der Proteinanreicherung mit Verminderung der Gasflussgeschwindigkeit ist der Theorie nach einerseits auf die Erhöhung des internen Rückflusses zurückzuführen, andererseits wird die Proteinanreicherung durch verstärkte Koaleszenz gefördert. Dies lässt sich jedoch in der Praxis sehr schwer beobachten. Die Schaumstabilität war in den untersuchten Bereichen gut. Jedoch konnte bei erhöhter Gasflussgeschwindigkeit ein grobporigerer Schaum beobachtet werden, wodurch die Oberfläche verringert wurde, was möglicherweise eine schlechtere Proteinanreicherung zur Folge hatte.

Die Verbesserung der Proteinanreicherung bis zu einer NaCl-Menge von 0,05 g/100 ml ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass hier eine Löslichkeitserhöhung durch Zurückdrängen von elektrostatischen Protein-Protein-Wechselwirkungen stattfindet. In höheren Konzentrationen wird hingegen die Proteinlöslichkeit herabgesetzt, was die Proteinanreicherung im Schaum verschlechtert (*Belitz und Grosch, 1992*). Im Gegensatz dazu stellte *Ahmad (1975b)* eine generelle Verschlechterung der Zerschäumung durch Vorhandensein von Salzen (bis 0,004 g/100 ml) fest. Oberhalb dieser Salzkonzentration fand in seiner Untersuchung keine weitere Verschlechterung mehr statt. Allerdings hatte er kontinuierlich zerschäumt. Ferner enthielt das von ihm verwendete Rinderalbumin nur 97,7 % Protein, was auf ursprünglich vorhandenes Salz hindeutet, so dass die Zerschäumung von Anfang an beeinflusst wurde.

In weiteren Versuchen sollte geklärt werden, inwieweit die im Kartoffelfruchtwasser vorhandenen Salze und Mineralstoffe die Zerschäumung beeinflussen. Hierzu könnte eine Umkehrosmose bei der Aufbereitung des Presssaftes eingesetzt werden, um ursprünglich vorhandene Salze zu eliminieren. Dies sollte jedoch erst im Labormaßstab durchgeführt werden, da dieses Verfahren relativ hohe Kosten verursacht.

Außerdem sollte untersucht werden, in wie weit die Wertigkeit von Metallionen die Zerschäumung beeinflussen kann.

Der pH-Wert hatte auch hier einen großen Einfluss auf die Proteinanreicherung im Schaum. So lag bei pH 6 das höchste Anreicherungsverhältnis. Da die Proteinfractionen über die isoelektrischen Punkte von 3-11 verteilt sind, ist es schwierig, hier genaue Aussagen zu machen.

Bei Variation der Gasflussgeschwindigkeit wurde zwar das höchste Anreicherungsverhältnis erzielt, jedoch konnte dies bei 10 ml/min erreicht werden, was für die

praktische Durchführung der Zerschäumung ungünstig ist, da hier nur geringe Mengen zerschäumt werden könnten.

Des weiteren könnte eine Zerschäumung im Vakuum durchgeführt werden, was evtl. zu erhöhter Schaumbildung führen würde. Jedoch sollte auch hier die Wirtschaftlichkeit betrachtet werden.

Kontinuierliche Zerschäumung

Zur Bestimmung des optimalen Probenahmezeitpunktes wurde bis zu 240 min zerschäumt, wobei in Zeitabständen von jeweils 10 min Proben genommen wurden. Da zu Beginn der Zerschäumung das höchste Proteinangebot in der Ausgangslösung vorlag, stieg die Proteinkonzentration im Schaum in den ersten 30 min bis auf einen Grenzwert an, der dann über die gesamte Dauer ungefähr gleich blieb. Es stellte sich im Schaum nach dieser Zeit für die Proteinkonzentration ein Gleichgewichtszustand ein. Um eine gleichmäßige Proteinanreicherung im Schaum zu gewährleisten, musste in allen nachfolgenden Versuchen mindestens 30 min lang zerschäumt werden. Eine kontinuierliche Zerschäumung einer Proteinlösung durch *Noble et al. (1998)* ergab die Einstellung eines Gleichgewichtszustandes nach etwa einer Stunde, jedoch arbeitete er bei anderen Gasflussgeschwindigkeiten.

Aus Abbildung 4.13 ist zu entnehmen, dass ein kugelförmiger Einbau im Gleichgewichtszustand eine Steigerung der Proteinkonzentration im Schaum um etwa 10 % bewirkte. Dass eine Volumenvergrößerung durch die verlängerte Verweilzeit des Schaums in der Säule die Drainage- und Rückflusseffekte verstärkt, wurde bereits früher beschrieben (*Schonfeld und Kibbey, 1967; Elizalde et al., 1991; Banerjee et al. 1993*). In der Anfangsphase der Zerschäumung kam dieser Effekt jedoch noch nicht zum Tragen, da der Gleichgewichtszustand noch nicht erreicht war. Einer beliebigen Volumenvergrößerung sind jedoch Grenzen gesetzt, da ab einem gewissen Ausmaß die Schaumstabilität nachlässt, da durch Drainage Flüssigkeit abgeflossen ist, der Schaum zu trocken wird und zusammenfällt. Bis zu welcher Volumenvergrößerung dies durchgeführt werden könnte, sollte jedoch noch in weiterführenden Untersuchungen genau bestimmt werden. Da andere Untersuchungen gezeigt haben, dass sich eine Verbreiterung der Säule ungünstig auswirkt, kommen hier offenbar gegenläufige Prinzipien zum Tragen; deshalb können die Auswirkungen von Variationen im Säulenaufbau eventuell nur empirisch erfasst werden.

Um eine mögliche Verbesserung der Proteianreicherung durch Rückführung des Foamates in den Schaum zu erkennen, wurden die Ergebnisse der kontinuierlichen Zerschäumung ohne Rückführung mit denen mit Rückführung (Tabelle 4.7) verglichen. Die Proteinkonzentrationen der Proben der Versuchsreihen nach 30 min Zerschäumung bei pH 3, 5, 7, 9 und 11 wurden für den Vergleich herangezogen. Bei allen pH-Werten war eine Verbesserung der Proteianreicherung zu beobachten. *Lemlich (1961)* fand bei 100 % Rückfluss sogar eine Erhöhung der Konzentration einer oberflächenaktiven Substanz im Schaum auf das 10-fache gegenüber der Ausgangskonzentration. Ohne Rückführung konnte er nur eine Anreicherung auf das 2,5-fache erzielen. Da für reale Gegebenheiten eine 100 %ige Rückführung nicht sinnvoll ist, wären hierzu weitere Untersuchungen nötig. Diese könnten Aufschluss über den optimalen bzw. den praktisch durchführbaren Rückfluss geben.

Nach *Lucena et al. (1996)* steigt das Anreicherungsverhältnis R mit dem Anteil des zurückgeführten Foamates. Sie konnten nahezu eine Verdopplung von R durch einen Rückfluss von 68 % herbeiführen.

Ebenso wie die Foamatrückführung hat die Höhe der Einspeisestelle der zu zerschäumenden Lösung einen Einfluss auf die Proteianreicherung im Schaum. Das Anreicherungsverhältnis lag bei der Einspeisung in den Schaum in einigen Fällen höher, d. h. die Anreicherung konnte im Durchschnitt verbessert werden; teilweise sogar um über 100 %.

Eine Erklärung für den Effekt ist das Zusammentreffen des fallenden Stromes durch die Gibbs-Kanäle mit dem steigenden Strom der in der Grenzschicht befindlichen Proteine. Frühere Versuche ergaben das Gleiche (*Ahmad, 1975a; Uraizee und Narsimhan, 1995; Lucena et al., 1996*).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass bei der kontinuierlichen Zerschäumung in einer Kolonne mit $\varnothing=40$ mm ein Anreicherungsverhältnis von 3,3 erreicht werden konnte. Beim Batch-Verfahrens lag das maximale Anreicherungsverhältnis unter vergleichbaren Bedingungen lediglich bei 1,76. Es konnte auch gezeigt werden, dass der Rohrdurchmesser die Proteianreicherung maßgeblich beeinflusste. Bei der Batch-Zerschäumung mit einem Rohr geringeren Durchmessers (\varnothing : 18 mm) konnte das Anreicherungsverhältnis bis 4,0 gesteigert werden. Allerdings sind derartig kleine Rohrdurchmesser nicht für großtechnische Maßstäbe zur Zerschäumung mit hohem Massendurchsatz geeignet.

Zukünftige Versuche in diesem Bereich sollten dahin gehen, die Zerschäumung im halbtechnischen Maßstab zu optimieren. Hierzu müsste eine Apparatur mit verbreiterem Flüssigkeitspool und einer verlängerten Säule eingesetzt werden, welche die Drainage weiter verbessern könnte. Da allerdings die oben beschriebenen Probleme eine theoretische Berechnung der optimalen Säulenform unmöglich machen und da bei proportionaler Vergrößerung der hier optimierten Aufbauten mit Schwierigkeiten bei der Schaumstabilität zu rechnen ist, ist eine Übertragung auf den technischen Maßstab mit Sicherheit nur auf der Basis umfangreicher empirischer Arbeiten möglich.

5.2.3 Selektive Anreicherung einzelner Proteinfractionen

Die eindimensionale Elektrophorese bestätigte im wesentlichen die durch die Gesamtproteinbestimmung gefundenen Ergebnisse. Es war zu erkennen, dass bei sinkendem Gesamtproteingehalt die Intensität der Banden im Pherogramm schwächer wurde oder sich zumindest die Intensität der Banden einzelner Proteinfractionen verminderte.

Wesentliche Unterschiede zwischen Batch- und kontinuierlicher Zerschäumung waren bei höheren Konzentrationen nicht zu erkennen. Bei niedrigen Konzentrationen kam es bei der Batch-Zerschäumung zu einer selektiven Anreicherung bestimmter Proteinfractionen. Die während der Batch-Zerschäumung im SDS-Gel gefundene selektive Anreicherung bestimmter Fraktionen war während der kontinuierlichen Zerschäumung kaum zu erkennen, da durch die kontinuierliche Zufuhr an Ausgangslösung ständig das ganze Spektrum der vorhandenen Proteine zugeführt und dadurch einer selektiven Anreicherung entgegengearbeitet wurde.

Bei der hochauflösenden 2D-Elektrophorese, in der die Proteine nicht nur wie in der SDS-PAGE nach Molekulargewicht, sondern zusätzlich nach isoelektrischen Punkten aufgetrennt wurden, zeigen die IPG-Dalts (Abbildung 4.9 + 4.10) eine pH-abhängige Anreicherung von bestimmten Proteinen. Bei Einstellung der Ausgangslösung auf pH 3 ließen sich definierte Proteinfractionen im Bereich von $pI=3$ im Schaum anreichern (Molekulargewicht 17-35 kDa), welche sich den Globulin- und Prolaminfraktionen zuordnen lassen. Ebenso ist bei pH 9 eine Anreicherung von Pro-

teinfractionen bei pI 9 zu erkennen. Welche Aminosäuresequenz bzw. genauere Strukturen diese angereicherten Proteinfractionen besitzen, müssen weitere Untersuchungen zeigen. Die Albuminfraction mit 45 kDa wurde im Schaum nicht angereichert. Dies steht im Widerspruch zu den Ergebnissen mit Rinderalbumin als Referenzprotein, lässt sich aber eventuell wie oben erwähnt durch die störende Wirkung der im Kartoffelfruchtwasser enthaltenen Salze und Zucker erklären. Außerdem ist bisher ungeklärt, wieweit Albumine so wenig verwandter Organismen in ihrem Verhalten vergleichbar sind.

Unabhängig von dem Erfolg der Fraktionierung würden sich die gewonnenen Proteine für den Einsatz in der Nahrungsmittelindustrie nutzen lassen. Eventuell könnte eine Vordenaturierung durch Vorerhitzung mit unterschiedlichen Temperaturen und Heißhaltezeiten eine Verbesserung der Proteinanreicherung bringen. Da Proteine im Verlauf der Nahrungsmittelzubereitung bzw. Verdauung ohnehin mehr oder weniger denaturiert werden, würde ein solcher Schritt hier keine Einschränkung der Nutzbarkeit bedeuten.

Ein weiteres Einsatzgebiet dieser sogenannten isoelektrischen Zerschäumung ist die Abtrennung von allergenen Proteinfractionen. So konnten *Wahl et al. (1990)* zeigen, dass Kartoffeln im Bereich von pI 4,5-5,2 Proteine mit einem allergenen Potential besitzen. Mit der hier entwickelten Technik wäre es wahrscheinlich möglich, die nicht-allergenen Proteine im Schaum anzureichern und diese in der Nahrungsmittelindustrie für hypoallergene Nahrungsmittel einzusetzen. Allerdings wird der Anteil der allergenen Fractionen dabei nur verringert; vollständig eliminiert werden sie nicht. Das bedeutet, dass eine echte Trennung in reine Einzelfractionen immer noch nicht erreicht werden konnte. Außerdem muss die Übertragbarkeit auf andere Proteinlösungen noch gezeigt werden.

Der Einsatz der isoelektrischen Zerschäumung zur Anreicherung von aktiven Enzymen muss generell in Frage gestellt werden, da sich die Proteine gerade in verdünnten Lösungen bei der Anlagerung an die Blasenoberfläche auffalten und dadurch denaturiert werden, was bei vielen Enzymen mit einem Verlust ihrer Aktivität verbunden ist (*Liu et al., 1998*). Eine Vorerhitzung mit unterschiedlichen Temperaturen und Heißhaltezeiten, die eventuell eine weitere Verbesserung der Zerschäumung durch eine Proteinvordenaturierung bringen könnte, würde sich hier nachteilig auswirken.

Bei der kontinuierlichen Zerschäumung konnte zwar ebenfalls Protein im Schaum angereichert werden (Abbildung 4.18 + 4.19), aber die Anreicherung war bei weitem nicht so selektiv wie bei der Batch-Zerschäumung. Auch die Zugabe von NaCl konnte die Selektivität des Verfahrens nicht verbessern. Bei pH 3 der Ausgangslösung wurden Proteine mit einem pI von 4-6,5 sowie einem Molekulargewicht von 14-67 kDa im Schaum angereichert. Bei pH 9 war eine selektivere Anreicherung bestimmter Proteinfractionen zwar etwas deutlicher als bei pH 3 zu erkennen, jedoch fand die selektive Anreicherung nicht so ausgeprägt wie im Batch-Verfahren statt.

Die geringere Selektivität beim kontinuierlichen Verfahren lässt sich möglicherweise dadurch erklären, dass bei konstanter Produktzufuhr die Proteine untereinander um die Adsorption an der Blasenoberfläche konkurrieren. Dadurch verschlechtert sich die Selektivität des Verfahrens, jedoch nimmt die Gesamtproteinanreicherung auf Grund der apparativen Modifikationen zu; die Zufuhr der Flüssigkeit in den Schaum verdrängt die proteinärmere Lösung in den Gibbs-Kanälen ebenso wie eine Foamatrückführung. Auch die Drainagekugel verstärkt die Gesamtproteinanreicherung auf Grund der Erhöhung der Verweilzeit und der dadurch verbesserten Drainage.

Entsprechend kann das hier entwickelte kontinuierliche Zerschäumungsverfahren zur Anreicherung des Gesamtproteins als produktschonendes, umweltfreundliches und ökonomisches Verfahren eingesetzt werden. Zur selektiven Anreicherung bestimmter Proteinfractionen muss jedoch auf das Batch-Verfahren zurückgegriffen werden.

5.3 Praktischer Einsatz der Zerschäumung bei der Entproteinierung von Kartoffelschlempe

In dieser Arbeit gelang es, Proteine aus Kartoffelschlempe bei bestimmten pH-Werten im Schaum anzureichern. Was diese Versuche erschwerte, war die hohe Viskosität der Schlempe selbst. Unverdünnt war eine Zerschäumung nicht durchführbar. Daher war eine Verdünnung mit Wasser unumgänglich. Auch waren sehr viele feste Kartoffelpartikel enthalten. Diese mussten während der Vorbereitungen herausfiltriert

werden, da es sonst zu Verstopfungen vor allem bei der kontinuierlichen Zerschäumung kommen könnte.

Die in der Kartoffelschlempe vorhandenen Mineralstoffe, welche in Mengen von ca. 5 g/L vorlagen, sind ein Faktor für die mögliche Verschlechterung der Zerschäumung durch Bildung von Kolloiden mit schlechteren Schaumeigenschaften. Der relativ hohe Proteingehalt der Ausgangslösung rührte von vorhandener Hefe her, da diese bei der Proteinbestimmungsmethode miterfasst wird.

Auch bei der kontinuierlichen Zerschäumung der Schlempe konnten Proteine im Schaum angereichert werden. Allerdings dauerte es länger bis zur Gleichgewichtseinstellung. In wie weit Unterschiede in der Zusammensetzung von Kartoffelschlempe und –fruchtwasser für die Abweichungen verantwortlich sind, lässt sich nach den bisherigen wenigen Versuchen noch nicht sagen. Immerhin erlauben die Daten die Aussage, dass eine Gewinnung der Proteine aus Kartoffelschlempe möglich sein sollte. Da die betreffenden Untersuchungen nur der Orientierung dienen sollte, müsste das Verfahren ohnehin in Zukunft weiter optimiert werden. Die Wirtschaftlichkeit hinsichtlich Gesamtproteinanreicherung bei einer Verdünnung mit Wasser müsste gezeigt werden. Ferner könnte als Vorreinigungsschritt in zukünftigen Versuchen die Umkehrosmose eingesetzt werden. Jedoch muss zur Übertragung dieses Aufreinigungsschrittes auf industriellen Maßstab die Wirtschaftlichkeit überprüft werden.

6 ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

In vielen Bereichen der Lebensmittelindustrie fallen große Mengen an Abfällen an, die noch Wertstoffe wie Proteine enthalten. Bisher wurden diese Proteine entweder als Tierfutter verwendet oder im Abwasser entsorgt. Eine kostengünstige und effiziente Methode zur Anreicherung oder Isolierung der Proteine wäre von großem ökologischen und ökonomischen Interesse. Aus Resten wiedergewonnene Proteine könnten z. B. bei der Herstellung proteinangereicherter Nahrungsmittel eingesetzt werden. Auch wäre eine Methode zur Verringerung der Abwasserschmutzlasten von Bedeutung. Eine Lösung hierfür wäre eventuell der Einsatz der Zerschäumung. Mit ihr ist es möglich, mit geringem apparativem Aufwand polare und unpolare Komponenten aus wässrigen Lösungen abzutrennen. Beispielsweise kann nicht nur insgesamt Protein aus einer Lösung heraus angereichert werden, sondern es könnten auch selektiv Proteinfractionen aus komplexen Matrices herausgeholt werden. Weitere Vorteile dieses Verfahrens sind niedrige Investitions-, Energie- und laufende Kosten sowie hohe Selektivität und Effektivität besonders in verdünnten Lösungen.

Entsprechend sollten verschiedene Zerschäumungsverfahren auf ihre Möglichkeiten zur Proteingewinnung hin untersucht werden. Dabei wurde als Schwerpunkt die Untersuchung spezifischer Parameter der Zerschäumung am Beispiel Kartoffelfruchtwasser als Modelllösung ausgewählt. Speziell sollte mit Hilfe der Zerschäumung untersucht werden, inwieweit die Proteine im Schaum angereichert oder eventuell auch fraktioniert werden könnten. Die Untersuchungen hierzu sollten mittels SDS-PAGE bzw. hochauflösender 2 D-Gelelektrophorese durchgeführt werden. Die Kartoffel als Modell wurde aufgrund ihrer günstigen Proteinzusammensetzung, ihrer leichten Bearbeitungsmöglichkeit, ihres hohen ernährungsphysiologischen Wertes sowie der hohen Abwassermengen in der kartoffelverarbeitenden Industrie ausgewählt. Zusätzlich wurde ein Teil der Versuche auch mit Rinderhämoglobin und Rinderalbumin als Referenzproteine durchgeführt.

In einem ersten Schritt wurde das verwendete Kartoffelfruchtwasser aus *Solanum tuberosum var. agria* hinsichtlich seines Proteinmusters mittels SDS-PAGE und hochauflösender 2 D-Gelelektrophorese untersucht, und weitere zerschäumungsrelevante Inhaltsstoffe wie Stärke, L-Ascorbinsäure, Nitrat, Zucker, Wassergehalt und Mineralstoffe wurden bestimmt.

Anschließend wurden Kartoffelfruchtwasser und -schlempe im Batch-Verfahren zerschäumt und der Einfluss verschiedener Parameter (Konzentration der Ausgangslösung, Gasflussgeschwindigkeit, Salz- und Zuckerkonzentration und pH-Wert) auf die Gesamtproteinanreicherung während der Zerschäumung untersucht. Dabei konnte der aus der Literatur bekannte Einfluss von Konzentration und von Gasflussgeschwindigkeit bestätigt werden. Ein linearer Einfluss der Salzkonzentration konnte im Gegensatz zu Literaturangaben nicht beobachtet werden, denn bei geringen Salzkonzentrationen ($<0,05$ g/100 ml) kam es zu einer Verbesserung der Proteinanreicherung im Schaum, statt einer Verschlechterung. Dass am isoelektrischen Punkt des Proteins die Gesamtproteinanreicherung im Schaum maximal ist, konnte am Beispiel der Referenzproteine Rinderalbumin und Rinderhämoglobin nicht bestätigt werden. Des Weiteren konnte beobachtet werden, dass mit Rinderalbumin fast immer höhere Proteinkonzentrationen im Schaum zu erzielen waren als mit Rinderhämoglobin.

Zusätzlich wurden bestimmte Proben des zerschäumten Kartoffelfruchtwassers mittels SDS-PAGE und hochauflösender 2 D-Gelelektrophorese hinsichtlich einer fraktionierten Anreicherung bestimmter Proteine untersucht. Dabei konnte, im Gegensatz zu den Referenzproteinen Rinderalbumin und -hämoglobin, erstmals eine deutliche pH-Abhängigkeit der Anreicherung von Kartoffelproteinfraktionen gezeigt werden. Mit der Zerschäumung war es möglich, bei Einstellung des pH-Werts der zur Zerschäumung eingesetzten wässrigen Kartoffelfruchtwasser-Lösung auf 3 bzw. 9, definierte Proteinfraktionen mit isoelektrischen Punkten im Bereich von 3 bzw. 9 im Schaum anzureichern. Diese Erkenntnis deutete sich mittels SDS-PAGE an und wurde durch die hochauflösende 2 D-Gelelektrophorese eindeutig nachgewiesen.

Als nächstes wurde eine kontinuierliche Zerschäumungsapparatur aufgebaut und damit Kartoffelfruchtwasser und -schlempe zerschäumt. Die Gesamtproteinanreicherung konnte dabei noch verbessert werden, wobei der Gleichgewichtszustand nach ca. 30 min erreicht wurde. Dagegen war die Selektivität geringer. Einen positiven Einfluss auf die Gesamtproteinanreicherung hatten hier verschiedene apparative Änderungen.

Auch hier wurden bestimmte Zerschäumungsproben hinsichtlich einer fraktionierten Proteinanreicherung mittels SDS-PAGE und hochauflösender 2 D-Gelelektrophorese untersucht. Eine pH-abhängige Proteinanreicherung bestimmter Fraktionen

konnte auch hier erzielt werden, jedoch war die Trennschärfe nicht so hoch wie mit dem Batch-Verfahren.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass für eine hohe Gesamtproteinanreicherung das kontinuierliche Verfahren dem Batch-Verfahren überlegen ist. Bei einer Anreicherung von definierten Proteinfractionen aus einer komplexen Matrix ist jedoch die Batch-Zerschäumung die Methode der Wahl, welche z. B. zur Eliminierung von allergenen Proteinfractionen dienen könnte. Zur Abwasserreinigung sollte jedoch eher das kontinuierliche Verfahren weiterentwickelt werden, da hier wesentlich größere Volumendurchsätze möglich sind.

Insgesamt konnte beobachtet werden, dass die Einflussfaktoren Konzentration, Gasflussgeschwindigkeit und Ionenstärke von der Proteinmatrix unabhängige Wirkungen auf die Zerschäumung hatten, während die Beeinflussung durch den pH-Wert von der jeweiligen Proteinmatrix abhing. In zukünftigen Versuchen sollte gezeigt werden, ob es durch einen Einsatz einer sogenannten Kolonnenzerschäumung möglich ist, die Selektivität der Anreicherung von definierten Proteinfractionen weiter zu steigern. Ebenfalls müsste die Übertragbarkeit der Zerschäumung auf Pilot- bzw. industriellen Maßstab sowohl bei Kartoffelfruchtwasser als auch bei Kartoffelschlempe getestet werden. Auch sollten hier weitere Pflanzenproteinmatrices, wie z.B. Leguminosen oder Getreide, zum Einsatz kommen. Außerdem könnte die Zerschäumung mit vorgeschalteten Proteinfällungsmethoden kombiniert und optimiert werden, um so die Isolierung definierter Proteinfractionen weiter zu verbessern.

7 LITERATURVERZEICHNIS

§35 LMBG 06.00-3 (1980): Bestimmung der Trockenmasse in Fleisch und Fleischerzeugnissen, Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren

§35 LMBG 06.00-4 (1980): Bestimmung der Asche in Fleisch und Fleischerzeugnissen, Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren.

Adam L., Bartels W., Christoph N., Stempf W. (1995): Brennelementanalytik. Band 1, 1. Auflage, B. Behr's Verlag, Hamburg

Adamson A. W. (1990): Physical Chemistry of Surfaces, Fifth Edition, John Wiley & Sons, New York

Ahmad S. I. (1975a): Laws of Foam Formation and Foam Fractionation I. The effect of different operating parameters on the foam fractionation of albumin from a solution containing organic and inorganic materials. *Separation Science* **10** (6), 673-688

Ahmad S. I. (1975b): Laws of Foam Formation and Foam Fractionation II. The influence of different association conditions on surfactants, glycerides, sugar, and salts on the foam fractionation of albumin. *Separation Science* **10** (6), 689-700

Ahmad S.I. und Fridberg S. (1972): The influence of different additives on the efficiency of albumine foam separation. Kem-Tek Congress Paper, Vol. 5, No. 3

Anand K., Damodaran S. (1995): Kinetics of adsorption of lysozyme and bovine serum albumin at the air-water interface from a binary mixture. *Journal of Colloid and Interface Science* **176**, 63-73

Ascherson D. (1840): Über den physiologischen Nutzen der Fettstoffe und über eine neue auf deren Mitwirkung begründete und durch mehrere neue Thatsachen unterstützte Theorie der Zellenbildung. In: *Archiv für Anatomie, Physiologie und wissenschaftliche Medicin*, Müller J. (Hrsg.), Verlag Von Veit et Comp., Berlin, 44-68

Bahr K.H., Schügerl K. (1992): Recovery of yeast from cultivation medium by continuous flotation and its dependence on cultivation conditions. *Chemical Engineering Science* **47** (1), 11-20

- Banerjee R., Agnihotri R., Bhattacharyya B.C. (1993): Purification of Alkaline Protease of *Rhizopus Oryzae* by Foam Fractionation. *Journal of Bioprocess Engineering* **9**, 245-248
- Bartsch O. (1926): Ueber schaubildungsfähigkeit und Oberflächenspannung. *Kolloid-Zeitschrift* **38**, 177-179
- Belitz H.-D., Grosch W. (1992): Lehrbuch der Lebensmittelchemie, vierte Auflage. Springer Verlag, Berlin Heidelberg New York
- Bensadoun A., Weinstein D. (1976): Assay of Proteins in the Presence of Interfering Materials. *Analytical Biochemistry* **70**, 241-250
- Bhattacharya P., Ghosal S.K., Sen K. (1991): Effect of physicochemical parameters on the separation of proteins from human placental extract by using a continuous foam fractionation column. *Separation Science and Technology* **26** (10 & 11), 1279-1293
- Bhattacharjee S., Kumar R., Gandhi K.S. (1997): Prediction of Separation Factor in Foam Separation of Proteins. *Chemical Engineering Science* **52**, 4625-4636
- Bjellqvist B., Ek K., Righetti P.G., Gianazza E., Görg A., Postel W., Westermeier R. (1982): Isoelectric focussing in immobilized pH gradients: Principle, methodology and some applications. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* **6**, 317-339
- Blum H., Beier H., Gross H.J. (1987): Improved Silver Staining of Plant Proteins, RNA and DNA in Polyacrylamide Gels. *Electrophoresis* **8**, 93-99
- Brady A. P., Ross S. (1944): The Measurement of Foam Stability. *Journal. of the American Chemical Society* **66**, 1348-1356
- Britten M., Lavoie L. (1992): . Foaming properties of proteins as affected by concentration. *Journal of Food Science* **57**, 1219-1222
- Brown A.K., Kaul A., Varley J. (1998): Continuous Foaming for Protein Recovery; Part I: Recovery of β -Casein. *Journal of Biotechnology and Biochemical Engineering* **62**, 278-290
- Brown A.K., Kaul A., Varley J. (1999): Continuous Foaming for Protein Recovery: Part II. Selective recovery of proteins from binary mixtures. *Biotechnology and Bioengineering* **62** (3), 291-300

- Brown L., Narsimhan G., Varley J. (1990): Foam Fractionation of Globular Proteins. *Biotechnology and Bioengineering* **36**, 947-959
- Cannon K.D., Lemlich R. (1972): A theoretical study of bubble fractionation. *AIChE Symposium Series* **68** (124), 180-184
- Cao Y., Damodaran S. (1995): Coadsorption of β -Casein and bovine serum albumin at the air-water interface from a binary mixture. *Journal of Agricultural and Food Science* **43**, 2567-2573
- Charm, S.E. (1972): Foam Separation of Enzymes and other Proteins. In: *Adsorptive Bubble Separation Techniques*; Lemlich R. (Hrsg.), Academic Press, New York; 157-174
- Charm S.E., Morningstar J., Matteo C.C., Paltiel B. (1966): The Separation and Purification of Enzymes through Foaming. *Analytical Biochemistry* **15**, 498-508
- Cheng M.-H., Huang S.-D. (1988): Solvent sublation and adsorbing colloid flotation of direct red. *Journal of Colloid and Interface Science* **126** (1), 346-354
- Dao L., Friedman M. (1994): Chlorophyll, chlorogenic acid, glycoalkaloid, and protease inhibitor content of fresh and green potatoes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **42**, 633-639
- Davis S.G., Fellers C.R., Esselen J. R. (1949): Foam Fractionation Procedures in the Isolation of Fruit Proteins. *Journal of Food Technology* **3**, 198-201
- DeSouza, A.H., Tanner R.D., Effler W.T. (1991): The effect of pH and gas composition on the bubble fractionation of proteins. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **28/29**, 655-666
- Dickinson E. (1989): Protein Adsorption at Liquid Interfaces and the Relationship to Foam Stability. In: *Foams: Physics, chemistry and Structure*, Wilson A.J. (Hrsg.), Springer-Verlag, London, 39-53
- Dorman D.C., Lemlich R. (1965): Separation of liquid mixtures by non-foaming bubble fractionation. *Nature* **207**, 145-146
- Elizalde B.E., Giaccaglia D., Pulosof A.M.R., Bartholomai G.B. (1991): Kinetics of liquid drainage from protein-stabilized foams. *Journal of Food Science* **56** (1), 24-26

- Gaudin A.M., Mular A.L., O'Connor R.F. (1960): Separation of microorganisms by flotation II. Flotation of spores of *Bacillus subtilis* var. *niger*. *Applied Microbiology* **8**, 91-97
- Gehle R., Kramer T., Schügerl K. (1991): Continuous cultivation and flotation of *Hansenula polymorpha* and *Saccharomyces cerevisiae* in an integrated pilot plant reactor-flotation column-system. *Journal of Biotechnology* **17**, 147-154
- Gehle R., Schügerl K. (1984): Penicillin recovery from aqueous solutions by continuous foam flotation. *Applied Microbiology and Biotechnology* **19**, 373-375
- Gelder van W.M., Vonk C.R. (1980): Amino acid composition of coagulable protein from tubers of 34 potato varieties and its relationship with protein content. *Potato Research* **23**, 427-434
- Görg A. (1991): Two-dimensional electrophoresis. *Nature* **349**, 545-546
- Görg A. (1998): Two-Dimensional Electrophoresis of Proteins using Immobilized pH Gradients. <http://www.weihenstephan.de/blm/deg/manual/manfrm.htm>
- Görg A., Boguth G., Obermaier C., Posch A., Weiss W. (1995): Two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients in the first dimension (IPG-Dalt): The state of the art and the controversy of vertical versus horizontal systems. *Electrophoresis* **16**, 1079-1086
- Görg A., Obermaier C., Boguth G., Harder A., Scheibe B., Wildgruber R., Weiss W. (2000): The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis* **21**, 1037-1053
- Görg A., Obermaier C., Boguth G., Weiss W. (1999): Recent developments in two-dimensional gel electrophoresis with immobilized pH gradients: Wide pH gradients up to pH 12, larger separation distances and simplified procedures. *Electrophoresis* **20**, 712-717
- Görg A., Postel W., Günther S. (1988): The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis* **9**, 531-546

- Görg A., Weiss W. (1998): High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins using immobilized pH gradients. In: Celis, J. (Ed.), *Cell Biology. A Laboratory Handbook*, 2nd edition, Vol. 4, Academic Press, San Diego, CA, 386-397
- Gorinstein S., Yamagata S., Hadziyev D. (1988): Electrophoretic separation of proteins and their amino acid composition in raw and processed potatoes. *Journal of Food Biochemistry* **12**, 37-49
- Grievies R.B. (1982): Adsorptive Bubble Separation Methods. In: *Treatise on analytical chemistry*, Vol. 1 (5), Kolthoff I.A. (Hrsg.), Interscience Publ., New York, 371-448
- Halling P.J. (1981): Protein-Stabilized Foams and Emulsions. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* Sharnbrook, Bedford, U.K., 155-203
- Heukeshoven J., Dernick D. (1988): Improved Silver Staining Procedure for fast staining in Phast-System Development Unit. I. Staining of Sodium Dodecyl Sulfate Gels. *Electrophoresis* **9**, 28-32
- Hofman M. (1968): Ionenflotation; eine Ausnützung von Grenzflächenphänomenen an der Phasengrenze Gas/Flüssigkeit zur Konzentrierung und Trennung von Stoffen. *Mitteilungen der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft* **38**, 53-61
- Holland C.R., Otterburn M.S., McComiskey P. (1983): Froth flotation as a means of protein extraction from mussels. *Journal of Food Technology* **18**, 195-205
- Horn H. (1979): Analytische Charakterisierung von Kartoffelfruchtwasserproteinen. *Dissertation TU-München*, Fakultät für Brauwesen, Lebensmitteltechnologie und Milchwissenschaft
- Hückstedt G. (1965): Aquarientechnik. Franckh'sche Verlagshandlung, Stuttgart, 89-93
- Hussenot J., Lefebvre S., Brossard N. (1998): Open-air treatment of wastewater from land-based marine fish farms in extensive and intensive systems: current technology and future perspectives. *Aquatic Living Resources* **11** (4), 297-304

- Jenkins D., Scherfig J., Eckhoff D.W. (1972): Application of adsorptive bubble separation techniques to waste water treatment. In: *Adsorptive Bubble Separation Techniques*, Lemlich R. (Hrsg.), Academic Press, New York; 219-242
- Kaiser K.-P., Belitz H.-D. (1972): Einige Eigenschaften verschiedener Trypsin- und Chymotrypsininhibitoren der Kartoffel. *Chemie, Mikrobiologie und Technologie der Lebensmittel* **1**, 191-194
- Kaiser K.-P., Bruhn L.C., Belitz H.-D. (1974): Proteaseinhibitoren in potatoes. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und –forschung* **154**, 339-347
- Karger B.L., Grieves R.B., Lemlich R., Rubin A.J., Sebba F. (1967): Nomenclature Recommendations for Adsorptive Bubble Separation Methods. *Separation Science* **2**, 401-404
- Kessler H.-G. (1996): Lebensmittel- und Bioverfahrenstechnik, vierte Auflage, Verlag A. Kessler, München
- Kinsella J.E., Whitehead D.M. (1987): Film, foaming and emulsifying properties of food proteins: effects of modification. In: *Proteins at interfaces*, Brash J.L. und Horbett T.A. (Hrsg.). ACS Symposium Series **343** (39), 629-646
- Kishimoto H. (1962): Foam Separation of Surface-Active Substances. *Kolloid-Zeitschrift* **192**, 66-100
- Kitchener J.A., Cooper C.F. (1959): Current concepts in the theory of foaming. *Quarterly Reviews of the Chemical Society* **13**, 71-97
- Knorr D. (1977): Protein recovery from waste effluents of potato processing plants. *Journal of Food Technology* **12**, 563-580
- Knorr D. (1978): Protein quality of the potato and potato protein concentrates. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie* **11**, 109-115
- Knorr D. (1980): Effect of recovery methods on yield, quality and functional properties of potato protein concentrates. *Journal of Food Science* **45**, 1183-1186
- Ko S., Loha V., Prokop A., Tanner R.D. (1998): Batch foam recovery of sporamin from sweet potato. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **70-72**, 547-558

- Kofrányi E., Jekat F. (1964a): Die Wertigkeit gemischter Proteine. *Zeitschrift für Physiologische Chemie* **335**, 174-179
- Kofrányi E., Jekat F. (1964b): Vergleich der Bausteinanalysen mit dem Minimalbedarf gemischter Proteine für den Menschen. *Zeitschrift für Physiologische Chemie* **338**, 159-167
- Kolbe H. (1995): Einflussfaktoren auf die Inhaltsstoffe der Kartoffel. *Kartoffelbau* **46** (10), 404-411
- Kolbe H. (1996a): Einflussfaktoren auf die Inhaltsstoffe der Kartoffel. *Kartoffelbau* **47** (1/2), 35-39
- Kolbe H. (1996b): Einflussfaktoren auf die Inhaltsstoffe der Kartoffel. *Kartoffelbau* **47** (5), 176-181
- Kolbe H. (1996c): Einflussfaktoren auf die Inhaltsstoffe der Kartoffel. *Kartoffelbau* **47** (7), 259-264
- Kolbe H. (1996d): Einflussfaktoren auf die Inhaltsstoffe der Kartoffel. *Kartoffelbau* **47** (8), 290-294
- Kolbe H. (1996e): Einflussfaktoren auf die Inhaltsstoffe der Kartoffel. *Kartoffelbau* **47** (9/10), 345-347
- Kolbe H. (1997): Einflussfaktoren auf die Inhaltsstoffe der Kartoffel. *Kartoffelbau* **48** (1/2), 34-39
- Kreipe H. (1981): Getreide- und Kartoffelbrennerei, 3. Auflage, Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart
- Lalchev Z., Dimitrova P., Tzvetkova P., Exerowa D. (1982): Foam separation of DNA and proteins from solutions. *Biotechnology and Bioengineering* **24**, 2253-2262
- Lemlich R. (1961): Foam Fractionation with Reflux. *Science* **34**, 3473
- Lemlich R. (1968a): Principles of foam fractionation. In: *Progress in Separation and Purification*, Perry E.S. (Hrsg.), Interscience Publishers, New York, 1-56
- Lemlich R. (1968): Adsorptive Bubble Separation Methods. *Industrial and Engineering Chemistry* **60** (10), 16-29
- Lemlich R. (1972a): Adsorptive bubble separation techniques. Academic Press, New York

- Lemlich R. (1972b): Adsubble Methods. *Recent Developments in Separation Science* **1**, 113-127
- Lemlich R. (1972c): Adsubble Processes: Foam Fractionation and Bubble Fractionation. *Journal of Geophysical Research* **77** (27), 5204-5210
- Leonard R.A. und Blacyki J.D. (1978): Multistage bubble fractionator. *Industrial Engineering and Chemistry Process Design Development* **17** (3), 358-361
- Lima V., Varley J. (1994): Foam Fractionation of Proteins. *Annals of the New York Academy of Science* **782**, 375-390
- Lin H.S., Lo C.C. (1996): Treatment of textile wastewater by foam flotation. *Environmental Technology* **7**, 841-849
- List P.-H. (1985): Arzneiformenlehre. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart
- Liu H.-S., Wang S.-S., Chiou T.-W. (1995): Concentrating Bovine Serum Albumin by Foam Separation. *Journal of the Chinese Colloid and Interface Society* **18**, 53-60
- Liu Z., Liu Z., Wang D., Ding F., Yuan N. (1998): On the denaturation of enzymes in the process of foam fractionation. *Bioseparation* **7**, 167-174
- Lockwood C.E., Bumer P.M., Jay M. (1997): Purification of proteins using foam fractionation. *Pharmaceutical Research* **14** (11), 1511-1515
- Loha V., Tanner R.D., Prokop A. (1997): The effect of pectinase on the bubble fractionation of invertase from α -amylase. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **63-65**, 395-408
- Lucena de S., Miranda E., Santana C. (1996): The Effect of External Reflux on the Foam Fractionation of Proteins. *Journal of Applied Biochemistry and Biotechnology* **57/58**, 57-65
- Maas K. (1969): A new type of Adsubble Methods: Booster Bubble Fractionation – hastened and improved bubble fractionation of low-foaming solutions. *Separation Science* **4** (6), 457-465
- Maas K. (1974): Adsorptive Bubble Separation Methods. In: *Methodicum Chemicum*, Vol. 1, Korte F. (Hrsg.), Academic Press, New York, 165-171

- MacRitchie F. (1987): Consequences of Protein Adsorption at Fluid Interfaces. In: *Proteins at Interfaces: Physicochemical and Biochemical Studies*, Brash J.L., Horbett T.A. (Hrsg.), ACS Symposium Series 343, 165-179
- Mahne E.J. (1971): Foam Separation Process. *Chemistry in Canada* **23** (3), 32-33
- Manegold E. (1953): Schaum. Chemie und Technik Verlagsgesellschaft mbH, Heidelberg
- Mattisek R., Schnepel F.-M., Steiner G. (1992): Lebensmittelanalytik, zweite Auflage, Springer Verlag, Berlin Heidelberg New York
- MEBAK (1993): Brautechnische Analysenmethoden, Band III. Pfenninger H. (Hrsg.), Selbstverlag der MEBAK, Freising-Weihenstephan
- Mischke W. (1940): Untersuchungen über Zerschäumung mit besonderer Rücksicht auf Fragen der angewandten Chemie II. *Kolloid-Zeitschrift* **90**, 77-89
- Montero G.A., Kirschner T.F., Tanner R.D. (1993): Bubble and foam concentration of cellulase. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **39/40**, 467-475
- Noble M., Brown A., Jauregi P., Kaul A., Varley J. (1998): Protein recovery using gas-liquid dispersions. *Journal of Chromatography B* **711**, 31-43
- Noord de K.G. (1976): Recovery of protein in potato starch manufacture. In: *Chemical Engineering in a Changing World*, Koetsier W.T. (Hrsg.), ELSEVIER Scientific Publishing Company, Amsterdam
- Ostwald W. (1920): Verfahren zum Verdampfen von Flüssigkeiten. *Patentschrift Nr. 327976*, Klasse 12a, Gruppe 2. Reichspatentamt
- Ostwald W., Mischke W. (1940a): Untersuchungen über Zerschäumung mit besonderer Rücksicht auf Fragen der angewandten Chemie I. *Kolloid-Zeitschrift* **90**, 17-25
- Ostwald W., Mischke W. (1940b): Untersuchungen über Zerschäumung mit besonderer Rücksicht auf Fragen der angewandten Chemie III. *Kolloid-Zeitschrift* **90**, 205-215
- Ostwald W., Siehr A. (1936): Über Zerschäumungsanalyse. *Kolloid-Zeitschrift* **76** (1), 33-46
- Ostwald W., Siehr A. (1937a): Über Schaum- und Zerschäumungsanalyse. *Chemiker-Zeitung* **64**, 649-653

- Ostwald W., Siehr A. (1937b): Über Zerschäumungsanalyse, II. *Kolloid-Zeitschrift* **79** (1), 11-15
- Ostwald W., Siehr A., Mischke W. (1941): Zerschäumungsanalyse. *Fermentforschung*, 1467-1474
- Ouchi K., Akiyama H. (1971): Non-foaming mutants of sake yeasts selection by cell agglutination method and by froth flotation method. *Agricultural and Biological Chemistry* **35** (7), 1024-1032
- Palmieri M.C., Greenhalf W., Laluce C. (1996): Efficient Flotation of yeast Cells Grown in Batch Culture. *Biotechnology and Bioengineering* **50**, 248-256
- Parthasarathy S., Kumar R. (1988): Foam separation of microbial cells. *Biotechnology and Bioengineering* **32**, 174-183
- Peters D. (1952 a): Zerschäumungsanalyse als Hilfsmittel für die Charakterisierung löslicher Proteine. *Kolloid-Zeitschrift* **152** (3), 157-167
- Peters D. (1952 b): Zerschäumungsanalyse kristalliner Serumalbumine. *Die Naturwissenschaften* **39** (4), 88-89
- Peterson G. L. (1977): A Simplification of the Protein Assay Method of Lowry et al. Which is More Generally Applicable. *Journal of Analytical Biochemistry* **83**, 346-356
- Pfenninger H. (1993): Brautechnische Analysenmethoden, Band II, dritte Auflage. Selbstverlag der MEBAK Freising-Weihenstephan
- Phillips M.C. (1981): Protein Conformation at Liquid Interfaces and its Role in Stabilizing Emulsions and Foams. *Food Technology* **35**, 50-57
- Pieper H.J., Bruchmann E.-E., Kolb E. (1993): Technologie der Obstbrennerei, 2. Auflage, Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart
- Pinfold T.A. (1970): Adsorptive Bubble Separation Methods. *Separation Science* **5** (4), 379-384
- Poole S., West S.I., Walters C.L. (1984): Protein-Protein Interactions: Their Importance in the Foaming of Heterogeneous Protein Systems. *J. Sci. Food Agriculture* **35**, 701-711
- Prins A. (1988): Principles of Foam Stability. In: *Advances in food emulsions and foam*, Dickinson E. und Stainsby G. (Hrsg.), Elsevier Applied Science, London. Kapitel 3, 91-122

- Ramsden W, Oxon B.A. (1894): Die Coagulierung von Eiweisskörpern auf mechanischem Wege. *Dubois-Reymonds Archiv für Anatomie und Physiologie. Physiologische Abteilung*, 517-534
- Rand P.B., Kraynik A.M. (1983): Drainage of Aqueous Foams: Generation-Pressure and Cell-Size Effects. *Society of Petroleum Engineers Journal* **23** (1), 152-154
- Revina T.A., Valueva T.A., Ermolova N.V., Kladnitskaya G.V., Mosolov V.V. (1995): Isolation and Characterization of a New Inhibitor of Trypsin and Chymotrypsin from Potato Tuber. *Biochemistry (Moscow)* **60** (11), 1411-1416
- Righetti P.G. (1987): Isoelectric Focussing: Theory, Methodology and Applications. Elsevier Biomedical Press, Amsterdam, sechste Auflage
- Rodgers N.E. (1972): Foam separation of gluten and starch. *United States Patent*, Appl. No.: 318,145; U.S. Cl. 260/112 G
- Scherz H., Souci S.W. (1994): Food composition and nutrition tables. Deutsche Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie, Garching
- Schick R., Klinkowski M. (1961): Die Kartoffel, Band I, VEB Deutscher Landwirtschaftsverlag, Berlin
- Schnepf R.W., Gaden E.L. (1959): Foam fractionation of proteins: concentration of aqueous solutions of bovine serum albumin. *Journal of Biochemical and Microbiological Technology and Engineering* **1** (1), 1-8
- Schonfeld E., Kibbey A. H. (1967): Improving Strontium Removal from Solution by Controlled Reflux Foam Separation. *Journal of Nuclear Applications* **3**, 353-359
- Schütz F. (1937): Adsorption on foam. *Nature* **139**, 629-630
- Sebba F. (1962): Ion Flotation. Elsevier, New York
- Sheu G. und Huang S. (1987): Solvent Sublation and Adsorbing Colloid Flotation of Magenta. *Separation Science and Technology* **22**, 2253-2262
- Sierp F. (1967): Die gewerblichen und industriellen Abwässer, 3. Auflage, Springer-Verlag, Berlin
- Singh P.C. und Singh R.K. (1996): Choosing an appropriate bioseparation technique. *Trends in Food Science & Technology* **7**, 49-58

- Somasundaran P. (1972): Foam separation methods. *Separation and Purification methods* **1** (1), 117-198
- Spurný J., Jakoubek B. (1968): Konzentrierung verdünnter Proteinlösungen durch Ausschäumen. *Tenside* **5** (1), 1-4
- Stegemann H. (1969): Eiweiß und Fermente der Kartoffelknolle. *Industrielle Obst- und Gemüseverwertung* **54** (5), 114-119
- Stegemann H. (1975): Properties of and physiological changes in storage proteins. In: *The Chemistry and Biochemistry of Plant Proteins*. Harorne J.B. und Van Sumere C.F. (Hrsg.), Academic Press, New York, 71-88
- Stegemann H. (1978): Properties and use of proteins from potatoes and other sources. In: *Biochemical Aspects of New Protein Food*, Vol. 44, Adler-Nissen J., Eggum B.O., Munck L., Olsen H.S. (Hrsg.), Pergamon Press, New York, 11-20
- Stegemann H., Francksen H., Macko V. (1973): Potato proteins: genetic and physiological changes, evaluated by one- and two-dimensional PAA-gel-techniques. *Zeitschrift für Naturforschung* **28** c, 722-732
- Stegeman H., Loeschke V. (1977): Das europäische Kartoffelsortiment und seine Indexierung. *Potato Research* **20**, 101-110
- Tharapiwattananon N., Scamehorn J., Ozuwan S., Harwell J., Haller K.J. (1996): Surfactant Recovery from Water using Foam Fractionation. *Journal of Separation Science and Technology* **31**, 1233-1258
- Thomas A., Winkler M. A. (1977): Foam Separation of Biological Materials. In: *Topics in Enzyme and Fermentation Biotechnology*, Kap. 3, Wiseman A. (Hrsg.), Horwood Verlag, Chichester, 43-71
- Thuman W.C., Brown A.G., McBain J.W. (1949): Studies of protein foams obtained by bubbling. *Journal of the American Chemical Society* **71**, 3129-3135
- Townsend A.-A., Nakai S.J. (1983): Relationships between hydrophobicity and foaming characteristics of food proteins. *Journal of Food Science* **48**, 588-594

- Tybussek R., Linz F., Schügerl K., Moses N., Leonard A., Rouxhet P.G. (1994): Comparison of the continuous flotation performances of *Saccharomyces cerevisiae* LBG H620 and DSM 2155 strains. *Applied Microbiology and Biotechnology* **41**, 13-22
- Uraizee F., Narsimhan G. (1990): Foam fractionation of proteins and enzymes. *Enzyme and Microbiological Technology* **12**, 315-316
- Uraizee F., Narsimhan G. (1995 a): Foam-Based separation of proteins. In: *Bioseparation Process in Foods*, Singh R.K. und Rizvi S.S.H. (Hrsg.), 175-225
- Uraizee F., Narsimhan G. (1995 b): A model for continuous foam concentration of proteins: effects of kinetics of adsorption of proteins and coalescence of foam. *Separation Science and Technology* **30** (6), 847-881
- Uraizee F., Narsimhan G. (1996): Effects of kinetics of adsorption and coalescence on continuous foam concentration of proteins: comparison of experimental results with model predictions. *Biotechnology and Bioengineering* **51**, 384-398
- Varley J., Kaul A., Ball S. (1996): Partition of protein from binary mixtures by a batch foaming process. *Biotechnology Techniques* **10** (2), 133-140
- Vesterberg O. (1967): Isoelectric fractionation, analysis and characterization of ampholytes in natural pH gradients. V. Separation of myoglobins and studies on their electrochemical differences. *Acta Chem. Scand.* **21**, 206-216
- Vries de A.J. (1972): Morphology, Coalescence and Size Distribution of Foam Bubbles. In: *Adsorptive Bubble Separation Techniques*, Lemlich R. (Hrsg.), Academic Press, New York; 7-31
- Wahl R., Lau S., Maasch H.J., Wahn U. (1990): IgE-Mediated allergic reactions to potatoes. *International Archive of Allergy and Applied Immunology* **92**, 168-174
- Weaire D. (1989): The Physics of Froths and Foams. In: *Food Colloids*, Bee R.D., Richmond P., Mingins J. (Hrsg.), Royal Society of Chemistry, Cambridge, 25-38

- Westermeier R. (1997): *Electrophoresis in Practice, Second Edition*, VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim
- Wilhelm E. und Kempf W. (1981): Fortschritte bei der Separation und Stabilisierung von Kartoffelprotein. *Stärke* **33**, 338-342
- Woolfe J.A. (1996): *Die Kartoffel in der menschlichen Ernährung*, Behr's Verlag, Hamburg
- Wüstenfeld H., Haeseler G. (1996): *Trinkbranntweine und Liköre*, 5. Auflage, Blackwell Wissenschafts-Verlag, Berlin
- Zimmermann H.J., Rosenstock G. (1976): Proteingehalt, Proteinmuster, Peroxydase und Malatdehydrogenase-Isoenzymmuster während der Entwicklung und Lagerung der Knollen von *Solanum tuberosum* L.. *Journal der Biochemie und Physiologie der Pflanzen* **169**, 321-336