

**Entwicklung einer biosensorischen Durchfluss-Messmethode für  
die Qualitätskontrolle von pflanzlichen Arzneimitteln und  
gesundheitsrelevanten Nahrungsbestandteilen  
sowie Untersuchungen zum Einfluss von ionisierender Strahlung  
auf Cysteinsulfoxide und Proteine**



Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)

dem

Fachbereich Pharmazie  
der Philipps-Universität Marburg  
vorgelegt von

**Fadi Tannous**  
**aus Damaskus**

Marburg/Lahn 2008

Vom Fachbereich der Philipps-Universität Marburg  
als Dissertation angenommen

Erstgutachter : Dekan Prof.Dr. M. Keusgen

Zweitgutachter: Prof.Dr. Maike Petersen

Tag der mündlichen Prüfung am 02.07.08

*Für meine Eltern und Geschwister*

## Danksagung

Ich bedanke mich bei allen Kollegen des Instituts für Pharmazeutische Biologie, mit denen ich in den letzten Jahren in stets freundlicher Atmosphäre zusammengearbeitet habe. Mein herzlicher Dank gilt insbesondere den Mitgliedern der Arbeitsgruppe Keusgen.

Im Speziellen möchte ich Dank aussprechen an

- Herrn Prof. Dr. M. Keusgen für die Überlassung des Themas, die unermüdliche Betreuung der Arbeit sowie seine Unterstützung durch vielfältige Ideen und Ratschläge
- Frau Prof. Dr. Petersen für die Übernahme des Co-Referats
- den Mitgliedern der Prüfungskommission, Herrn Prof. K. Kuschinsky und Herrn Prof. Dr. U. Bakowsky
- der seligen Frau Gisela Reich-Kellner für die technische Unterstützung im Labor und Herrn Michael Knörr (ehem. Bundesforschungsanstalt für Ernährung und Lebensmittel, Karlsruhe, neu MRI genannt) für die Bestrahlung der untersuchten Proben
- in besonderer Weise Herrn em. Prof. A. E. Ehlemann für die Einführung in die Bestrahlungsanlage und zahlreiche Diskussionen über die Lebensmittel-Bestrahlungswelt
- Herrn Dr. R. M. Fritsche, Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung (IPK), Gatersleben, für die Überlassung von Allium-Frischmaterial,
- der Fa. Finzelberg, Andernach, für die Überlassung von Proben und Knoblauchpulver, -chips und -granulat sowie der Fa. REX & Emsland, Quankenbrück, für die Überlassung von Eiklarproben
- Herrn Dr. J. Norwig (Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte, BfArM) für die Ermöglichung der Durchführung des ATR-IR-Experiments
- Frau Dr. B. Arendt sowie Herrn Prof. Dr. Roland Goerlich für die Bereitstellung des Labors zur Durchführung der Comet Assay-Untersuchung sowie Herrn Dr. B. Fuhrmann für die Lieferung des Fördersystems.

Ganz herzlich bedanke ich mich bei meinen Eltern, ohne deren bedingungslose Unterstützung die Durchführung dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Meinem Heimatland Syrien, besonderes dem Ministerium für Hochschulwesen und der Agentur für Atomenergie in Damaskus danke ich für die Fernbetreuung.

Ebenso gilt mein Dank Freunden in meiner zweiten Heimat, insbesondere Frau B. Gebhardt sowie der Germanistin Frau R. Lültsdorff für das Korrekturlesen, die zahlreichen Sprachvorschläge sowie ihre stetige Aufmunterung und die Vertiefung meiner Heimatgefühle für Deutschland.

## Publikationen aus der Promotionsarbeit

➤ **Tannous F.**

**Entwicklung von Screening-Verfahren zwecks Qualitätskontrolle von hochwertigen pflanzlichen Inhaltsstoffen mittels FIA-Technik**

*Institut für Pharmazeutische Biologie, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn*

*Prof. Dr. Keusgen M., Institut für Pharmazeutische Chemie der Philipps-Universität Marburg,*

*Deutsche Gesellschaft für Qualitätsforschung. (Pflanzliche Nahrungsmittel)*

*14.-15. März 2005 in der Bundesforschungsanstalt für Ernährung und Lebensmittel in Karlsruhe. Journal of Applied Botany and Food Quality, 2005; 40.*

➤ **Tannous F.**

**Untersuchung des Einflusses von ionisierenden Strahlen auf die Qualität von verschiedenen Knoblauchvarietäten mit Hilfe eines Biosensors**

*Institut für Pharmazeutische Biologie,*

*Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn*

*Prof. Dr. Keusgen M., Institut für Pharmazeutische Chemie der Philipps-Universität Marburg.*

*Deutsche Gesellschaft für Qualitätsforschung. (Pflanzliche Nahrungsmittel)*

*14.-15. März 2005 in der Bundesforschungsanstalt für Ernährung und Lebensmittel in Karlsruhe. Journal of Applied Botany and Food Quality, 2005; 40.*

➤ **Tannous, F.**

**Keusgen M., Norwig J., Buening-Pfaue**

**Unterscheidung von pasteurisiertem und bestrahltem Eiklar mittels MIR-ART-Technik, Lebensmittelchemie (2005) 59: 8-9.**

➤ **Storsberg J., et al., Keusgen M., Tannous F.**

**Chemical Characterization of Interspecific Hybrids Between *Allium cepa* L. and *Allium kermesinum* Rchb.**

*J. Agric. Food Chem. 2004 Aug 25; 52(17): 5499-505.*

## Summary

Modern vascular diseases such as atherosclerosis and hypertension, metabolic ones such as diabetes and asthma as well as other widespread complaints will be with us in human history as a seemingly inevitable, often life-threatening evil of this time. It is, however, not an unavoidable fact. For a balanced diet and the use of natural products often avoid the need of various chemical medications and the occurrence of related side effects.

Therefore in recent years, pharmaceutical and food industry have competed to respond to the wishes of consumers in the best imaginable way possible. Insofar natural substances, have obtained new concepts through the food industry, such as functional food, innovative food or GM food etc. On the other hand, the pharmaceutical industry is aware of this development and consequently offers pharmaceuticals, focusing on non-chemical additives, namely raw herbal or animal extracts, taking into account that sufficient biochemical and pharmacological examinations have recognized raw extracts in pharmaceuticals as a more effective means than those prepared ingredients such as compound nutrients or medicines.

Garlic as a carrier of valuable natural substances and egg white as a healthy donor of proteins, both in pure form or as an ingredient of a preparation, with their high quality components are in the focus of this work.

In order to reach this goal, garlic as a representative of the genus *Allium* (*All. sativum*), a well-known remedy that has been used for medical products in folk medicine for thousands of years, was examined for their sulfur compounds (Thiosulfonates) as precursors of healing agents (as Allylsulfuren, Allicin, Ajoen and Alloxin). In addition, the impact of preservation by ionizing radiation was checked

To gain access to the relevant substances in recent years, a competition was started in the context of instrumental analysis. The fastest and most environmentally friendly method has been called "biosensor". Accordingly, in this study, a biosensor was developed, which - for the first time - operated on a sensitive, fluorescence-specific analysing and measuring technique (FIA Biosensor), with a sufficient sensitivity to a detection limit of  $0.9 \mu\text{M NH}_3 \pm 2\%$ . Hereby a possibility of scanning was found tracking the entire preliminary stage of S-Alk(en)yl-L-Cysteine sulfoxides as an evidence of the value of medical plants containing Cysteine sulfoxides. These precursors have recently been demonstrated in mushrooms as well.

For the development of the FIA-Biosensor, the biochemical occurrences released by the squashing of garlic were simulated and implemented in a technical apparatus. Thus the enzymatic conversion (C-S-Lyase) of the non-proteinogenic amino acids takes place (Cysteine sulfoxides as precursors, represented by Alliin, Isoalliin, Propiin, Methiin) in the strongly smelling and irritant substance of Cystein as well as in other products like Pyruvates and Ammonia. Ammonia is released under the effect the Alliinase [EC 4.4.1.4] at a ratio of 1:1 to the amount of the occurring Cysteine sulfoxides in the investigated plant. Because of that Ammonia was used as a key for hunting up the Cysteine sulfoxides in the FIA-biosensor development.

This enzymatic reaction was made possible for the Biosensor due to a buffer and Carrier system, which optimized the alkaline medium (pH 10.5) and transferred the released Ammonia into a detectable fluorescent derivative. The enzyme reactor had been developed particularly for this purpose, was created by the immobilization and optimization of the enzyme (diluted at the ratio of 1:10) on the substrate (Concanavalin Agarose/Con A). The arrangement took place in a conveying technique (FIA). Within the 3 - to 4-minute measurement, it was possible to determine the entire content of Cysteine sulfoxides in aqueous (40  $\mu\text{l}$  as sample volumes) plant extract. Lengthy steps such as pre-derivatization processes and

incubations, which are usually used with the HPLC or comparable analysing systems, had become superfluous. After the further optimization and after connecting the system to an autosampler, the entire content of Cysteine sulfoxides (CS) of dozens or even hundreds of samples could be analyzed reliably in unbeatable time and arranged in a chemo-taxonomical data base.

The CS-content of the examined and inventoried samples (provided with alphanumeric designation) for the data base was in the range between 0.06 and 3.66% CS (related to the weight of the examined plant material), where (around the usual and well-known average of 0.50-1.25% CS) many species and some hybrids of the genus *Allium* are obviously located.

Apart from the possibility of determining the activity of the enzyme as well as the specificity of Alliinase, the change of CS through ionising radiation (beta radiation 5-10 MeV) could be proved with the FIA sensor for the first time due to the work on hand. Sulfurous proteins such as CS are considered as very sensitive to radiation. To that extent it was possible, in particular in the unprocessed variants of garlic (i.e. normal fresh garlic cloves), to obtain a significant result with FIA sensor starting from 1 kGy, whereby with 5 kGy and 3.5 kGy 50% and 70% of CS-loss could be noted respectively.

The high radiation dosages were applied to fresh garlic in order to be able to track the change of CS-trends and dimensions. The other examined varieties (powder, chips, granulates) with low content of water (7-15%) were irradiated up to 10 kGy, because the European guidelines of 1999/2 and 3/EG, according to good manufacturing practice (GMP), established this border dose of irradiation to ensure the exclusion of health risks. These samples only showed a slight, insignificant CS-loss with the respectively used doses, including the maximum of 10 kGy. On the other hand, there was a positive radiation effect, namely an increase up to 26% of CS measurable in granulates; this was done via the release of deposited bound Cysteine sulfoxides. A well-known form of these is represented by the  $\gamma$ -Glutamyl derivatives, which are substituted at the amino groups. Considered from the pharma-technological point of view, this might mean a new perspective for the further use of irradiation for the promotion of the yield of CS as medical substances, similar to the best-known application of irradiation for the increase of the yield in the production of juice.

The irradiation has likewise influence on macromolecules like the DNA of a cell and proteins. For this aim, a genotoxic measuring method was optimized (called Comet Assay) and applied as a confirmation of the radiation-induced fragments into the DNA cell cores of garlic. It was possible to distinguish significantly ( $P > 0.05$ ) the irradiated from the unirradiated samples starting from 1 kGy ; it did, however, not show a considerable dependence of the damage to increasing doses. Likewise a significant reduction of the activity of Alliinase was spectroscopically determined by fresh garlic cloves up to the total deactivation of the enzyme with a dosage of 10 kGy.

The other subject was egg white as a healthy protein donor, separated from yolk as source of fats, Cholesterols and Cholesterin derivatives as well as the associated well-known dangers. For this investigation, four varieties of egg white were examined, namely liquid (fresh, stored, pasteurized) and dry (granulates, powder). Egg white can be embedded and processed in several kinds of products such as supplements for the building of muscles, in a lot of food and cosmetic products and as additives in medicinal preparations. A condition is that the egg white is present in intact and storable form. For this, it is internationally conserved by different methods depending on the variety, e.g. irradiation. For radiation-induced changes, the varieties of egg white were examined with two techniques with the aim to distinguish the irradiated samples. For that, two techniques were developed: 1) capillary electrophoresis (CE). 2) MIR-ATR spectroscopy.

1) Two CE protein separating methods were developed, defined, optimized and applied with a detection limit of 100 ng/ml and a limit of determination of 0,5µg/ml (Lyz.).

The first method of separation is based on the charge/mass ratio of analytsts, namely capillary zone electrophoresis (CZE). The other one up to the mass of the analytsts namely capillary gel electrophoresis (CGE), which is used in two separation techniques: native and SDS denatured proteins (SDS-CGE).

With CZE, it was possible to track significantly under UV detection some changes in liquid egg white caused by radiation. In particular the sensibility of Lysozyme (MW: 14,3) was detected, whereby a reduction of 70% of the absorption was noted with 3 kGy. Likewise other undefined proteins, which have longer migration times than Lysozyme, namely Ovalbumin and Ovomocoid (over 76 k Dalton), showed a similarly important decrease in their UV absorption. In addition, a relatively proportional dependence of the reduction of the UV absorption with rising doses was noted.

The UV-detected CZE electropherogrammes help to make different effects of irradiation on proteins noticeable in their absorption without isolation and purification. Whereas stored liquid egg white already differed from the irradiated, the pasteurized and the unirradiated one, significant differences could not be found among these last three species. With CZE, possible protein protein reciprocal effects were looked for by the help of mixtures; and it was possible to obtain a specific indice quite easily, namely a loss of the peak. (Picture 3.32). In this regard, further attempts will be necessary in order to obtain a meaningful knowledge about the specificity of irradiation

A significant distinction of the irradiated liquid, fresh egg white could be reached through CZE-LIF (laser-induced fluorescence detection; LIF). Around 70% of fluorescence reduction with 3 kGy of the initial value was registered, which can be considered as a decisive new significant knowledge and indication. This was, however, not examined on pasteurized and stored egg white. On the contrary, it was not possible to recognize any change in the dry varieties, not even with the highest used dose of 10 kGy. This is an indication for the fact that desired effects of irradiation such as the reduction of the microbial load and the resulting improvement in durability of dry varieties can be applied softly with less changes in proteins.

With the aid of CGE separation, a new peak with the molecular mass within the range of 15 to 23 kDalt could be discovered after the irradiation with 3 kGy. The protein was separated up to the protein mass, for fresh liquid egg white. The new peak increased with rising dose, in particular with 3; 4 kGy up to 100% of his value with 1 kGy, and was detected with SDS more clearly than with native CGE.

2) MIR-ATR method. The different pre-treatments of the samples lead to clearly different MIR-spectra: The spectra of the pasteurized samples differed from those of the untreated ones and those irradiated with 10 kGy. In particular within the range of the NH-oscillations with 3600 to 3200 cm<sup>-1</sup> and within the finger print range at 1390 as well as at 1278 and 1252 cm<sup>-1</sup>, differences are recognizable. These differences are also representable with the help of a main component analysis. From this investigation it resulted that with the help of the MIR-ATR method, differences between the irradiated and untreated samples of egg white could not readily be proved. Irradiation of food has already begun in many countries, e.g. with poultry in the USA, papayas in South Africa, frog thighs, potatoes and garlic in China and France as shrimps in the Netherlands.



*Alles Wissen und alle Vermehrung unseres Wissens enden  
nicht mit einem Schlusspunkt, sondern mit Fragezeichen.*

*Hermann Hesse (1877 - 1962)*

---

## Inhaltsverzeichnis

<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS:</b> .....	<b>IV</b>
<b>1 EINLEITUNG</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 KULTURGESCHICHTE UND BEDEUTUNG DES EIES</b> .....	<b>1</b>
1.1.1 BEDEUTUNG DER BESTRAHLUNG VON EIERN.....	3
<b>1.2 KNOBLAUCH: TAXONOMIE, MEDIZIN UND ERNÄHRUNGSPHYSIOLOGISCHE BEDEUTUNG</b> .....	<b>5</b>
1.2.1 INHALTSSTOFFE DES KNOBLAUCHS ( <i>ALLIUM SATIVUM</i> ) .....	6
<b>1.3 BIOSENSORIK</b> .....	<b>9</b>
1.3.1 ETABLIERUNG EINES FLUORIMETRISCHEN FIA- MESSSYSTEMS .....	11
<b>1.4 BESTRAHLUNG</b> .....	<b>18</b>
1.4.1 GESCHICHTLICHER ÜBERBLICK.....	18
1.4.2 DEFINITIONEN UND BEGRIFFE .....	18
1.4.3 STRAHLENQUELLEN UND STRAHLENARTEN .....	21
1.4.4 STRAHLUNG / MATERIE WECHSELWIRKUNG .....	25
1.4.5 CHEMISCHE VERÄNDERUNG .....	25
1.4.6 BIOLOGISCHE VERÄNDERUNG .....	29
1.4.7 VERÄNDERUNGEN DES NÄHRWERTES.....	30
<b>1.5 ZIELSETZUNG</b> .....	<b>32</b>
<b>2 MATERIAL UND METHODEN</b> .....	<b>34</b>
<b>2.1 BIOSENSORIK</b> .....	<b>34</b>
2.1.1 GEWINNUNG DER ALLIINASE .....	34
2.1.2 BESTIMMUNG DER PROTEINKONZENTRATION UND DER ALLIINASE-AKTIVITÄT .....	36
2.1.3 FLUORIMETRISCHE BESTIMMUNG DES AMMONIAKS MITTELS DER DURCHFLUSS- INJEKTIONS- ANALYSEANLAGE ( FIA ) .....	41
2.1.4 FLUORIMETRISCHE BESTIMMUNG DES AMMONIAKS IN LAUCHGEWÄCHSEN .....	49
<b>2.2 HPLC-ANALYTIK</b> .....	<b>54</b>
2.2.1 VERWENDETE CHEMIKALIEN.....	54
2.2.2 HERSTELLUNG DER VERWENDETEN REAGENZEN.....	55
2.2.3 HPLC- LAUFBEDINGUNG .....	56
2.2.4 STANDARDLÖSUNG UND IDENTIFIZIERUNG DER CS PEAKS.....	58
2.2.5 QUANTITATIVE HPLC-ANALYSE DER CYSTEINSULFOXIDE .....	58
<b>2.3 BESTRAHLUNG</b> .....	<b>59</b>

---

2.3.1	BESTRAHLUNG VON KNOBLAUCH .....	59
2.3.2	PROBENVORBEREITUNG FÜR DIE BEHANDLUNG MIT ELEKTRONENSTRAHLEN.....	60
2.3.3	BESTRAHLUNG VON EIKLAR.....	69
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>77</b>
<b>3.1</b>	<b>ETABLIERUNG EINER BIOSENSORISCHEN METHODE MIT HILFE DER FIA .....</b>	<b>77</b>
3.1.1	ANORDNUNG DER FLUORIMETRISCHEN DURCHFLUSS-INJEKTIONS-ANLAYSEANLAGE .....	78
3.1.2	IMMOBILISIERUNG .....	80
3.1.3	OPTIMIERUNG DER BETRIEBSPARAMETER DER FIA FÜR DIE AMMONIAKBESTIMMUNG. ....	84
3.1.4	FLUORIMETRISCHE BESTIMMUNG DER CYSTEINSULFOXIDEN IN LAUCHGEWÄCHSEN .....	92
3.1.5	ALLIINASESELEKTIVITÄT BEI DER BIOSENSORISCHEN BESTIMMUNG DER CYSTEINSULFOXIDE 96	
3.1.6	BESTIMMUNG DER CYSTEINSULFOXIDE IN <i>ALLIUM SATIVUM</i> (KNOBLAUCH).....	99
3.1.7	QUANTITATIVE BESTIMMUNG DER CYSTEINSULFOXIDE IN <i>ALLIUM</i> -HYBRIDEN MITTELS FIA 100	
3.1.8	QUALITATIVE BESTIMMUNG DER CYSTEINSULFOXIDE MITTELS HPLC .....	103
3.1.9	BESTIMMUNG DER GESAMTEN CYSTEINSULFOXIDE IN WEITEREN KNOBLAUCHPROBEN MITTELS FIA.....	111
<b>3.2</b>	<b>BESTRAHLUNG .....</b>	<b>120</b>
3.2.1	BESTRAHLUNG VON KNOBLAUCH .....	120
3.2.2	STRAHLUNGSEINFLÜSSE AUF DEN GESAMTGEHALT VON AMMONIAK UND CYSTEINSULFOXIDEN MIT HILFE DES FIA –MESSVERFAHRENS.....	125
3.2.3	STRAHLUNGSEINFLÜSSE AUF DIE ALLIINASEAKTIVITÄT .....	131
3.2.4	UNTERSUCHUNG VON BESTRAHTEM KNOBLAUCH MITTELS NIR .....	136
3.2.5	BESTRAHLUNG VON EIKLAR.....	138
<b>4</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>181</b>
<b>4.1</b>	<b>BIOSENSORIK .....</b>	<b>181</b>
4.1.1	GRÜNDE FÜR DEN EINSATZ DES FIA UND DIE HOHE EMPFINDLICHKEIT DER FLUORIMETRISCHEN BESTIMMUNG.....	182
4.1.2	VERGLEICH DER ABSORPTIOMETRIE MIT DER FLUORIMETRIE ALS BEVORZUGTER DETEKTION FÜR DEN FIA.....	183
4.1.3	IMMOBILISIERUNG .....	186
4.1.4	FIA UND HPLC-METHODEN IM VERGLEICH .....	188
4.1.5	QUANTITATIVER UND QUALITATIVER BESTIMMUNGSVERGLEICH DES CS-GEHALTES MITTELS FIA UND HPLC. ....	190

---

4.1.6	VERGLEICH DER VERSCHIEDENEN <i>ALLIUM</i> -HYBRIDEN MIT DEREN PARENTS.....	193
4.1.7	CYSTEINSULFOXIDE IM ERPROBTEN <i>ALLIUM SATIVUM</i> IM VERGLEICH.....	197
4.1.8	ERLÄUTERUNGEN DER VARIABILITÄT DES CS-GEHALTS IN DEN UNTERSUCHTEN <i>ALLIUM</i> ARTEN SOWIE IHRE VERGLEICHBARKEIT INNERHALB DER GATTUNG <i>ALLIUM</i> .....	198
<b>4.2</b>	<b>BESTRAHLUNG .....</b>	<b>202</b>
4.2.1	BESTRAHLUNG VON KNOBLAUCH .....	203
4.2.2	VERGLEICH DER SPEZIFISCHEN AKTIVITÄT DER ALLIINASE MIT DEM PROTEINGEHALT UNTER STRAHLUNGSEINFLUSS SOWIE MIT DER LAGERUNGSZEIT .....	213
4.2.3	EIKLAR-BESTRAHLUNG.....	217
4.2.4	BEDEUTUNG DER BESTRAHLUNG UND GESETZLICHE LAGE.....	224
4.2.5	BEDENKLICHKEIT DER BESTRAHLUNG UND KONTROLLE.....	225
4.2.6	WIRTSCHAFTLICHKEIT DER BESTRAHLUNG.....	226
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>228</b>
<b>6</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>232</b>
<b>7</b>	<b>ANHANG.....</b> FEHLER! TEXTMARKE NICHT DEFINIERT.	

**Abkürzungsverzeichnis:**

µg	Mikrogramm
µM	Mikromol
µm	Mikrometer
Abb.	Abbildung
Abs.	Absorption
AD	Außendurchmesser
ADMIT	Analytical Detection Methods for Irradiation Treatment of Foods
AS	Spezifische Aktivität
ATR-MIR	Attenuated Total Reflection Infrared: (abgeschwächte Totalreflektion-Mittel-Infrarot-Spektroskopie)
BSA	Bovine Serum Albumin, Rinderserum-Albumin
CAE	Capillaraffinitätselektrophorese
CCE	Chiral Electrophoresis (Chirale Kapillarelektrophorese)
CE	Capillary Electrophoresis (Kapillarelektrophorese)
CEN	Comité Europeen de Normalisation (Europäisches Komitee für Normung)
CGE	Capillary Elelectrophoresis
CGE	Capillary Gel Electrophoresis (Kapillargelelektrophorese)
CIEF	Capillary Isoelectrophoresis Focusing
CL	Chemielumineszenz
cm	Zentimeter
cm <sup>2</sup>	Quadratzenimeter
Co	Coenzym
Con A	Concanavalin Agarose
Conal.	Conalbumin
CS	Cysteinsulfoxide
CZE	Kapillarzonenelektrophorese
Dest.H <sub>2</sub> O	Destilliertes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EC	Enzyme Code
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
Em	Emission

EN	Europäische Norm
EOF	Elektroosmotischer Fluss
ESR	Elektronen-Spin-Resonanz-Spektrometrie
EU	Europäische Union
Ex	Excitation (Anregung)
FAO	Food and Agriculture Organization
FDA	Food and Drug Administration
FIA	Flow-Injection-Analyser
g	Gramm
g	Erdbeschleunigung (9,81 m/sec)
GC	Gaschromatographie
GC-MS	Gaschromatographie-Massenspektrometer-Kopplung
GMP	Good Manufacturing Practice (Gute Herstellungspraxis)
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HPLC	High-Performance Liquid Chromatography
IAEA	International Atomic Energy Agency
ID	Innendurchmesser
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
i.P.	Isoelektrischer Punkt
kDa	Kilodalton
kGy	Kilogray = 1000 Gray
KM	Michaelis-Menten-Konstante
kV	Kilovolt = 1000 Volt
L	Liter
LC	Liquid Chromatography (Flüssigkeits-Chromatographie)
LDH	Lactatdehydrogenase
L <sub>eff</sub>	Detektionslänge
L <sub>ges</sub>	Gesamtlänge
LMBG	Lebensmittel- und Bedarfsgegenstandegesetz
Lsg.	Lösung
LYZ	Lysozym
MeV	Megaelektronvolt
MEKC	Micellar Electrokinetic Chromatography
MG	Molekular-Gewicht

mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
MS	Massenspektrometer
n.d.	nicht detektiert
NAD	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid
NADH	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid, reduziert
nm	Nanometer
OD	Außendurchmesser
OPA	Ortho-Phthaldialdehyd
Oval	Ovalbumin
P-5'-P	Pyridoxal-5'-phosphat
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Past.	pasteurisiert
PSL	Photostimulierte Lumineszenz
SDS	Sodium Dodecylsulfat
sec	Sekunde
Tab.	Tabelle
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TL	Thermolumineszenz
Tris	Hydroxymethyl-Aminoethan (C <sub>4</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub> )
Unbestr.	Unbestrahlt
USDA	United States Department of Agriculture
UV	Ultraviolettlicht
V <sub>max</sub>	Maximale Umsatzgeschwindigkeit eines Enzyms
WHO	World Health Organization (Weltgesundheitsorganisation)

## 1 Einleitung

Moderne vaskuläre und metabolische Erkrankungen haben sich in den zurückliegenden Jahrzehnten zu einer Geißel für die Menschheit entwickelt. „Volksleiden“ wie Arteriosklerose, Bluthochdruck, Diabetes mellitus und Asthma, um nur einige der häufigsten zu nennen, scheinen ein unausweichliches Übel unserer Zeit zu sein, das nur durch eine entsprechende Therapie mit Hilfe starker chemischer Medikamente mehr oder weniger einzudämmen ist.

Dies ist jedoch ein Trugschluss. Die Bedeutung einer ausgewogenen Ernährung sowie der Einsatz von Hilfsstoffen aus der Natur werden in jüngster Zeit wieder entdeckt; ihr häufig erfolgreicher Einsatz wird vielfältig diskutiert. Die Rückbesinnung auf Naturheilmittel bietet auch der Pharmaindustrie neue Herausforderungen bezüglich der Zusammensetzung ihrer Erzeugnisse; ein ständig zunehmender Prozentsatz der Bevölkerung wünscht Pharmaka aus rein pflanzlichen oder tierischen Rohextrakten, die garantiert frei sind von synthetischen chemischen Stoffen.

Im Wissen um diese Entwicklung werden in der folgenden Arbeit zwei aus ernährungsphysiologischer Sicht bedeutende Stoffe intensiv untersucht und besprochen werden. Dabei handelt es sich zum einen um das Eiklar als wichtigen Nährstoff bzw. als Supplement und zum anderen um das Phytopharmakon Knoblauch.

### 1.1 Kulturgeschichte und Bedeutung des Eies

Ein Geflügelwissenschaftler, zumal ein Ovologe, kommt bei der Frage „Was war zuerst da, das Huhn oder das Ei?“ niemals in Verlegenheit. Für ihn steht fest: Zu Anfang war das Ei! Damit befindet er sich in bester Gesellschaft mit berühmten Kulturphilosophen aller Zeiten.

„Am Anfang“ heißt lateinisch „ab ovo“ (=vom Ei), auch wenn das volle Zitat (vom Anfang bis Ende) „ab ovo usque ad mala“ nach den Satiren des Horaz auf die Speisefolge der Römer (vom Ei bis zu den Äpfeln) hinweist.



Tatsächlich ist der Anfang, der Beginn allen Wachstums, immer schon durch das Ei symbolisiert worden. In vielen Kulturen gilt das Ei als Sinnbild für die Schöpfung, für das Leben und für die Auferstehung. Aus dem Ur-Ei entstanden der Weltall und die Götter. In Syrien bricht eine Göttin aus der Schale eines Mondeies, das vom Himmel fällt und von Tauben ausgebrütet wird. Beim Aufbrechen des großen Welteneies entsteht aus der oberen Schale der Himmel und aus der unteren die Erde.

Auch Fruchtbarkeit und Leben werden durch das Ei dargestellt. Das berühmte Standbild in Ephesus zeigt die Göttin Artemis mit einer Vielzahl von Brüsten, ihr Oberkörper ist mit zahlreichen Eiern behängt. (Anhang 7.1) In der christlichen Religion ist das Ei Sinnbild der Auferstehung. Das Küken zerbricht die Schale, Christus sprengt das Grab. (Grzimek B. 1942).

Eier sind nicht nur sinnbildlich in Kultur und Religion schon immer bedeutend gewesen, sie stellen auch einen der wichtigsten Spender wertvoller Nährstoffe für den menschlichen Organismus dar. Neben 65% Wasser sind die Hauptbestandteile zu jeweils 12,1% Eiweiß, 10 % Fett, 0,9 % Kohlenhydrat, 10,9 % Mineralien und 34 % Trockensubstanz in einem Absolutgewicht von 58 g (Rauch W. 1987).

Eiweiße benötigt der Körper als Baustoff für Muskeln und Organe, aber auch für Blut und Enzyme. Verschiedene Eiweißarten können vom Organismus unterschiedlich gut verwertet werden. Das Eiweiß aus dem Hühnerei belegt dabei mit 100% Platz 1 in der Verwertbarkeit. Es ist zudem sehr leicht verdaulich. Mit dem Fett liefert das Ei dem Menschen wertvolle Fettsäuren. Sie und das Eiweiß ergeben den hohen Energiegehalt des Eies. Ernährungsexperten empfehlen daher den Verzehr von etwa drei Eiern pro Woche.

Kontrovers wird immer wieder diskutiert, ob der hohe Cholesteringehalt des Eies sich nachteilig auf den Organismus auswirkt. Dazu sollte man wissen, dass der Körper zunächst selbst große Mengen Cholesterin bildet und nicht auf die Zufuhr durch Nahrung angewiesen ist. Beim gesunden Menschen wird der Blutcholesterinspiegel durch einen ausgleichenden Regulationsmechanismus gesteuert.

Eindeutig ist das Ei wertvoller Lieferant an Vitaminen und Spurenelementen. Dazu zählen zum Beispiel das nur in tierischen Lebensmitteln vorkommende Vitamin B 12 (wichtig für Blut- und Zellbildung) und das ebenfalls nicht in Obst und Gemüse

enthaltene Vitamin D, das unentbehrlich ist für die Knochenstabilität, da es für die Einlagerung von Calcium und Phosphor sorgt. Bei den Spurenelementen sind Eisen und Selen hervorzuheben. Die meisten Wert gebenden Inhaltsstoffe befinden sich im Eidotter. Ferner werden Eier in der Nahrungs- und Kosmetikindustrie massiv eingesetzt bei der Herstellung von Eischnee, Eierlikör, Mayonnaise, Handcremes und Shampoos, welche der Haut Vitamin A und Spurenelemente spenden und als Anti-Aging bezeichnet werden (Deutsche Gesellschaft für Ernährung 1991).

### **1.1.1 Bedeutung der Bestrahlung von Eiern**

Der Krankheitserreger von größtem Interesse in Eiern ist die *Salmonella enteritidis*. Fälle der Foodborne Krankheit, die durch diesen Erreger ausgelöst wird, traten erstmalig in den USA zwischen 1985 bis 1989 auf. Dort wurden damals 189 Ausbrüche bekannt; allein 1989 sprachen Beamte des öffentlichen Gesundheitswesens von mindestens 49 berichteten Fällen von Salmonella Enteritidis-Poisoning.

1987 startete das USDA ein freiwilliges Testprogramm in Legebatterien. Dabei stellte man fest, dass Eier aus infizierten Betrieben nicht etwa vernichtet wurden, sondern ihr Inhalt durch Hitzeeinwirkung pasteurisiert und als Eiprodukt verkauft wurde. Ein weiteres Problem bestand darin, dass fünf Prozent der Amerikaner regelmäßig rohe oder nur kurzzeitig gekochte Eier konsumierten. Auf der Höhe des Interesses wurde der Verbrauch von Frischeiern in einigen Staaten gesetzlich eingeschränkt, indem Gaststätten untersagt wurde, Eier zu servieren, die nicht gänzlich gekocht waren.

In den letzten Jahren haben Forscher nun endlich auf den Wunsch reagiert, dem Verbraucher den sicheren, unbedenklichen Genuss roher oder sehr weich gekochter Eier zu ermöglichen, indem sie Inshellbestrahlungsprozesse für Eier entwickelten. 1997 tat der Marketing-Service des USDA auf staatlicher Ebene einen weiteren Schritt in diese Richtung, indem er versuchsweise genehmigte, Frischeier zu kennzeichnen, wenn die Bestrahlung USDA-Normen entsprach (FDA's Center for Food Safety and Applied Nutrition 2004).

Etwas später verkündete die FDA, dass sie die äußerliche Anwendung ionisierender Strahlung auf Eier genehmigt habe, um die Salmonellenbelastung im Ei zu verringern. Wenngleich der Prozess auch nicht die Beseitigung restlos aller Organismen garantieren kann, erzielt er doch eine akzeptable Reduktion der mikrobiellen Belastung. Die Wahrscheinlichkeit überlebensfähiger Salmonellen hängt ab sowohl von der Höhe der ursprünglichen Mikrobenlast als auch von den verwendeten Strahlendosen. Die neue Regelung erlaubt eine Dosis **bis zu 3 kGy**. Einige Daten zeigten jedoch, dass unter den Testbedingungen Strahlungsdosen nahe der maximal erlaubten Dosis einen Effekt auf die Farbe des Eigelbs und die Viskosität des Eies ausüben. Dennoch hinterlassen Dosen von bis zu 3kGy gewisse Sicherheitsrisiken.

Demzufolge hängt die Effizienz des Eliminierungsversuchs von Salmonellen in bestrahlten Eiern zum einen ab von der Höhe des ursprünglich vorhandenen Salmonellenaufkommens im einzelnen Ei, zum anderen von der Strahlendosis, die von diesem aufgesogen wird. Bei der Bestrahlung von Eiern werden Salmonellenniveaus praktisch 100 bis 10.000 Mal substantiell verringert. Die Effizienz steht in Abhängigkeit zum Abstand des Eies von der Strahlungsquelle.

Es ist jedoch unwahrscheinlich, dass durch eine einzige Bestrahlung eine Verkleinerung um 5-Log. erzielt wird. Der jüngere Kenntnisstand über die Bestrahlung von Eiern zeigt, dass zwar eine hochgradige Verringerung der ursprünglichen Salmonellenbelastung erreichbar ist, dass aber keine Gewährleistung für eine totale Eliminierung der Salmonellen gegeben werden kann; denn die Verringerung mikrobieller Belastung fällt unter derselben Strahlendosis nicht in jedem Fall gleich effizient aus. Die bestrahlten Eier müssen daher in Übereinstimmung mit 21 CFR 179.26 beschriftet werden. Die abschließende Richtlinie, welche die bestehenden Nahrungsmittelzusatzregelungen ändert und dadurch den Gebrauch von ionisierender Strahlung für die Verringerung von Salmonellen in Frischeiern ermöglicht, wurde am 21. Juli 2000 im Bundesregister veröffentlicht (Center for Food Safety and Applied Nutrition 2000).

### 1.1.2 Knoblauch: Taxonomie, Medizin und ernährungsphysiologische Bedeutung

Seit 1550 v. Chr. wird der Knoblauch als Heilmittel gegen viele Beschwerden verwendet. Bereits bei den Pharaonen in Ägypten und den alten Griechen wurde über die Heilwirkung dieses Gewürzes berichtet. In Indien wurde Knoblauch als Bestandteil einer septischen Lotion zur Reinigung von Wunden verwendet (Rezeptur bekannt aus dem „Bower Manuskript“).

Knoblauch gehört der Familie der *Alliaceae* an, der Gattung *Allium*, der Art *sativum*, der Klasse *Liliopsida* und der Ordnung *Asparagales* (u. a. Fritsch u. Friesen 2002). Die Gattung *Allium* ist in den gemäßigten und warmgemäßigten Zonen der nördlichen Hemisphäre weit verbreitet. Sie besitzt Entfaltungszentren in Südwestasien, von der Türkei bis zu den mittelasiatischen Republiken, im Iran, in Afghanistan, im östlichen Mittelmeergebiet und im westlichen Nordamerika. Einige Arten, zumeist Kulturpflanzen, sind inzwischen fast über die ganze Erde verbreitet. Mehrere davon werden als Gemüse- und Gewürzpflanzen angebaut (Hegi 1939, Hanelt 1994), wie z. B. *Allium cepa* (Küchenzwiebel), *Allium sativum* (Knoblauch), *Allium porrum* (Lauch), *Allium schoenoprasum* (Schnittlauch) und *Allium ascalonicum* (Schalotte).

Die Bedeutung vom Knoblauch der Gattung *Allium* liegt u. a. in seinem Gehalt an schwefelhaltigen Kohlenwasserstoffen, der tatsächlich seit noch gar nicht langer Zeit erforscht ist. In einer der frühesten Studien wurde von dem deutschen Chemiker Wertheim über die Wirkung von Knoblauch, bezogen auf den Gehalt von Schwefelallyl (Allylsulfur), berichtet (Wertheim 1844). Jahre später gelang es einigen anderen Wissenschaftlern, wässrige Allylschwefel-Verbindungen, u.a. Diallyldisulfid, Diallyltrisulfid, sowie Ölextrakte zu gewinnen, in denen das Allicin als fungizid und antibakteriell identifiziert wurde (Sendl 1995).

Stoll und Seebeck extrahierten 1948 zum ersten Mal aus Knoblauch das geruchlose Alliin als Vorstufe des Allicins. Wie durch die Einwirkung der Alliinase als C-S-Lyase bei der Zerquetschung einer Knoblauchzehe unter Raumtemperatur auf Alliin (+)-S-

Allyl-L-Cystein-sulfoxid die typische Geruchssubstanz (Allicin) ausgelöst wird, beschrieben 1971 Bronitz et al.. Hierbei wurde festgestellt, dass Allicin bei Raumtemperatur als instabile Substanz bezeichnet werden kann, die langsam u.a. zu Allyl-sulfid, -disulfid, und -trisulfid unter Entwicklung von Schwefeldioxid umgesetzt wird.

Erfreulicherweise findet man bis heute zumeist positive Berichte über zahlreiche heilende bzw. therapeutische Anwendungen von Knoblauch (Koch u. Lawson 1996). Dazu zählen neben der Therapie von Nervenkrankheiten (Erleichterung bei Stress und Erschöpfung) Linderung von Zahnschmerzen, Vorbeugung von Arteriosklerosen, Einsatz als Anticoagulant (Pablo F. et al. 2007, Block E. et al. 1997), Cholesterinsenkung (Christopher D et al. 2007, Charlson M. et al. 2007), Senkung des Bluthochdrucks sowie des Blutzuckerspiegels und der Harnzuckerausscheidung bei Diabetikern. Der Einsatz von Knoblauch erzielte ebenfalls Erfolge bei den Bemühungen um Potenzsteigerung, Schutz vor Krebs an verschiedenen Organen wie Prostata, Gebärmutter, Dickdarm und Magen (Hirsch, K., et al., 2000). Er wird ebenso eingesetzt als antioxidativ wirkendes Mittel (Ichikawa et al. 2003), bei der Behandlung von Fußpilz und verschiedenen humanpathologischen Hefen sowie zum Schutz vor Infektionskrankheiten, die von Parasiten übertragen werden. Knoblauchöl und –saft wirken extrem toxisch auf Moskitos (Malaria), Flöhe und Zecken (gelegentlich statt FSME-Impfung empfohlen).

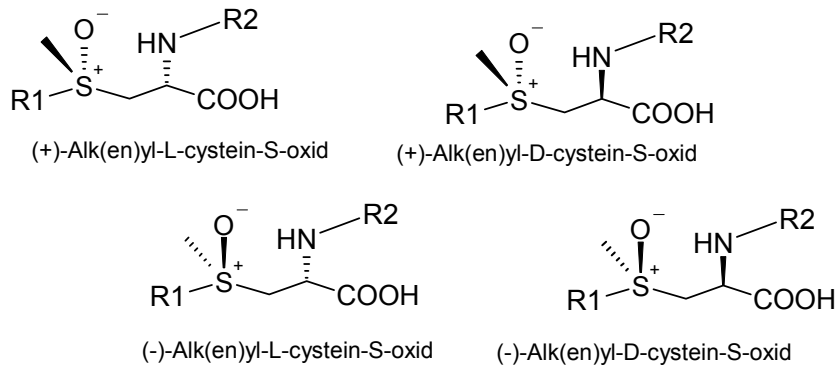
### **1.1.3 Inhaltstoffe des Knoblauchs (*Allium sativum*)**

Neben den 65 % Wasser und 28 % Kohlenwasserstoffen, 3% Proteinen bzw. Aminosäuren, 1,5 % Rohfasern und 0.5 % Mineralstoffen sind die bedeutsamsten Inhaltsstoffe vor allem 2% schwefelhaltige (Gamma-Glutamylcysteine, Cysteinsulfoxide) und schwefelfreie (Adenosin, Saponine, Scordenin, Lektine) Wirkstoffe.

#### **1.1.3.1 Schwefelhaltige Wirkstoffe**

Die wichtigste Substanzklasse in der Gattung *Allium* bilden die Cysteinsulfoxide (CS), vertreten durch S-Methyl-[Mithiin], S-Propyl, S-1-Propenyl-[Isoalliin] und S-2-Propenyl-L-cystein-S-oxid [Alliin] „Abbildung in Abschnitt 3.1.5.2“. Von den Cysteinsulfoxiden gibt es jeweils vier Diastereomere. Daneben befindet sich auch

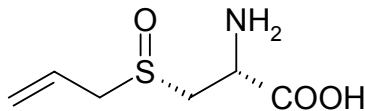
eine „Lagerform“ der CS-Verbindung, die an der Aminogruppe substituierte  $\gamma$ -Glutamyl-Derivate haben.



### Diastereomere Formen der Cystinsulfoxide

R1: Methyl-, Ethyl-, Propyl-, Vinyl-, Allyl-  
R2: H,  $\gamma$ -Glutamyl

**1- Alliin** kommt im Knoblauch in 10-fach höherer Menge vor als die anderen CS-Verbindungen. Gleichwohl wird es nur in Form von (+)-S-Alk(en)yl-L-Cysteinsulfoxiden in der Natur gefunden.

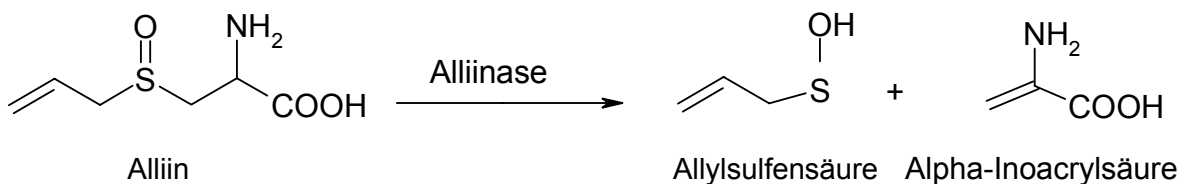


### Alliin ((+)-S)-Allyl-L-Cysteinsulfoxid)

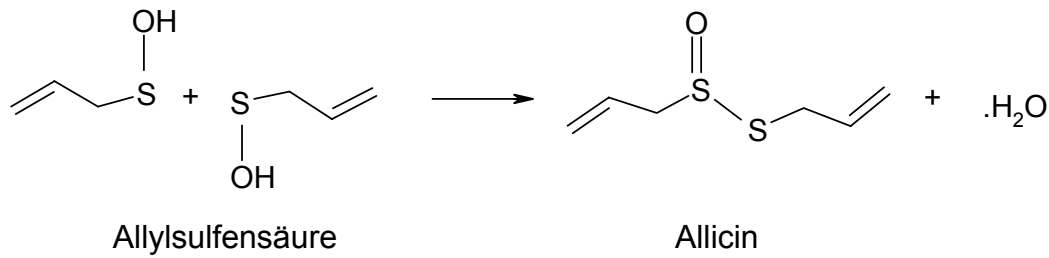
Das möglicherweise an  $\text{NH}_2$  substituierte  $\gamma$ -Glutamyl bei der Lagerform kann durch eine  $\gamma$ -Glutamyl-Transferase (EC 2.3.2.2) abgespalten werden (Koch u. Lawson, 1996).

**2- Allicin** gehört zu den Abwehrstoffen und wirkt antimykotisch bzw. antimikrobiell (Unal R et al. 2001, Ankri, S. et al. 1999).

Es sorgt für den typischen Geruch dieser Gattung, und seine antibiotische Wirksamkeit gilt als Schutzfaktor gegen Magenkrebs, der auf eine Nitrosaminbindung zurückzuführen ist. Denn das S-Allylcystein, als Folgeprodukt der Umsetzung von Allicin, hemmt die Bildung von Nitrosaminen. Die Entstehung von Allicin durch C-S-Lyase analog zu den anderen Cysteinsulfoxiden lässt sich folgendermaßen verstehen:

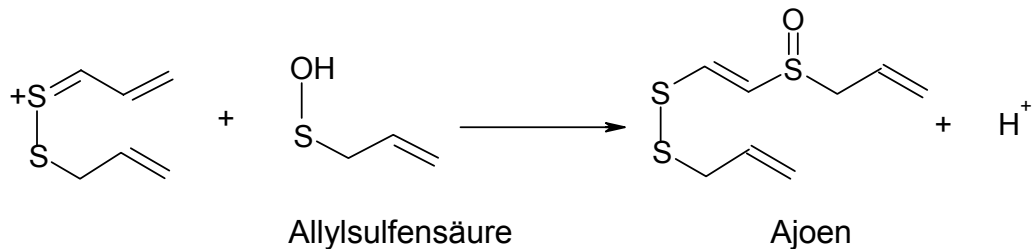


Eine Kondensierungsreaktion von zwei Allylsulfensäuren führt unter Ausschluss von Wasser zur Allicinbildung.



Das Allicin ist auf Grund seiner hohen Reaktivität Ausgangsprodukt für fast alle später entstehenden schwefelhaltigen Verbindungen, wie z. B. Ajeon, welches beim Kochen von Knoblauch entsteht (Koch H.P. et al. 1988).

### 3- Ajeon ((E,Z)-4,5,8-trithioundeca-1,6,10-trien-8-oxid)



Das beim Kochen von Knoblauch entstehende Ajoen trägt maßgeblich zur antithrombotischen Wirkung von Knoblauchextrakten bei. Daneben löst es in vitro bei menschlichen Leukämiezellen die Apoptose aus. Ferner sind die mykotoxische Wirkung bzw. Bekämpfung von Fußpilzen auf Ajoen zurückzuführen.

**4- Diallyldisulfid** ist ein Produkt, welches u. a. durch Hydrolyse von Sulfonium-Ionen, Angriff von Allylsulfensäure an Allicin bzw. durch Proportionierung des Allicins entsteht. Diallyldisulfid ist für seine Funktion beim Aufbau von Häm-Proteinen bzw. Cytochrom P450 (prothetische Gruppe, die Prophyrinring Häm enthält) bekannt. Ebenso spielt es eine Rolle beim Auf- bzw. Abbau vom Hämoglobin. Dieser Effekt ist für die meisten Menschen harmlos, verschlimmert jedoch die Symptomatik bei Porphyriekranken (Erbkrankheit mit gestörter Synthese des Blutfarbstoffes, rezessiver Erbgang).

**5- (S)-Allylcystein** ist als AGE-Produkt (Aged Garlic Extract) bekannt und gilt als Leber schützend (z.B. bei Hepatitis); daneben wirkt es als Anticancerogen bei Zellkulturen von Prostatazellen.

### 1.1.3.2 Schwefelfreie Wirkstoffe

Als wichtigste schwefelfreie Verbindung im Knoblauch gilt das **Allixin**, welches bekannt ist für seine antibakterielle Wirkung bzw. als Antimutagen, Anticancerogen und als Neurotoxin. Daneben findet man **Adenosin** mit seiner Wirkung gegen Bluthochdruck sowie Blutgerinnung, die durch Bindung an spezifische Rezeptoren erzielt wird; es hemmt die Adenosin-Desaminase, welche beim Verzehr von Knoblauch einen erhöhten Adenosinspiegel im Organismus auslöst.

Zuletzt kommen die **Saponine** im Knoblauch in etwa 1 g/kg vor. Diese Stoffklasse hat durch ihre Zuckerreste viele Kombinationsmöglichkeiten und dementsprechend eine beachtliche Strukturvielfalt. Damit haben Saponine immunologische sowie antimykotische Effekte bzw. Wirkungen gegen humanpathogene Hefen wie *Candida*, die auf das Saponin **Erubosid** zurückzuführen sind (Michahelles E. 1974).

Einige Medikamente beinhalten hauptsächlich Knoblauch als Wirkstoff. Beispiele dafür sind **Beni-cur N** (Hersteller: Sabona;), **Kwai N** (Hersteller: Klosterfrau), **Kwai forte** 300. sowohl als Dragees als auch als Mazerat, Tinkturen und Öl-Extrakte. In diesen Produkten kommt der Knoblauch in Reinform vor, während er in anderen Erzeugnissen als Komposition mit weiteren Stoffen dargeboten wird. So findet man vom Hersteller Abtei: **Knoblauch-Mistel-Weißdorn-Kapseln** oder verpresstes, verkapseltes Knoblauchpulver (traditionell angewendet zur Vorbeugung allgemeiner Arteriosklerose).

## 1.2 Biosensorik

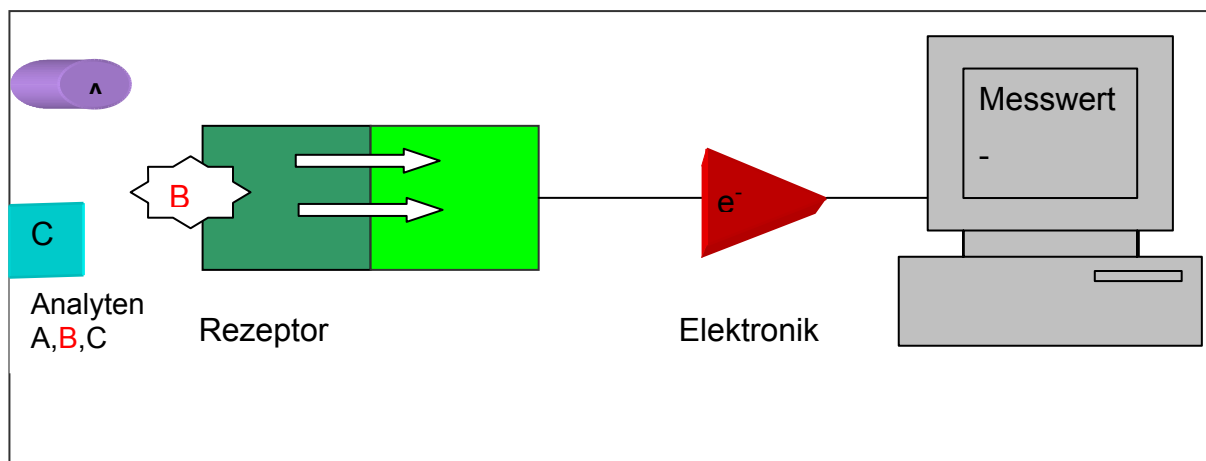
Unter Biosensoren versteht man nach der Definition von International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) Systeme bzw. regenerierbare Verfahren, mit denen nach direktem Anschluß an sogenannte Transducer (zur Umwandlung in elektrische Signale), spezifisch qualitative und quantitative Information über bestimmte biochemische Vorgänge gegeben werden kann. Ebenso betont dieses Komitee, dass eine Unterscheidung vorzunehmen ist zwischen der Bezeichnung von Biosensoren und sogenannten Einmal-Biosensoren. (Thevenot et al. 1999). Biosensoren finden vielfältig Einsatz: In der klinischen Chemie werden zum Beispiel Glukosesensoren



entwickelt, mit denen der Blutzucker bei Diabetikern einfach und schnell gemessen werden kann; Biosensoren können zum Aufspüren winziger Tumore in der Krebsdiagnostik eingesetzt werden, in der Allergiediagnostik oder zur Erforschung des menschlichen Erbgutes. Doch es werden auch andere Biosensor-Systeme entwickelt, mit denen etwa die Schwermetallkonzentration im Abwasser gemessen werden kann oder sogenannte Optoden, die zur Prozessüberwachung in Fermentern genauso eingesetzt werden wie in der "Point-of-Care"-Diagnostik, also der medizinischen Routinediagnostik mit tragbaren Kleingeräten

([www.Roch.at/diagnostics](http://www.Roch.at/diagnostics)).

Bei der Point-of-Care-Diagnostik kommen Geräte zum Einsatz zur Messung von chemisch-physikalischen Lebensvorgängen an und in Lebewesen, wie z.B. Atmung, bioelektrische Potentiale (EKG, EEG, Elektroretinogramm), Blutdruck, Herzfrequenz, Körpertemperatur, Magensalzsäure und Darmbewegungen. Diese Vorgänge werden durch entsprechende Messfühler (z.B. Elektroden, Druckwandler, Thermometer) in elektrische Signale umgewandelt, elektronisch verstärkt und üblicherweise in Form von Kurven aufgezeichnet. Meyers Universallexikon definiert den Biosensor als eine Technik, die zur Erfassung einer spezifischen biologischen Reaktion dienen kann. Wie ist das zu verstehen? Abbildung (1.1) schematisiert das Prinzip eines Biosensors.



**Abb. 1.1:** Schematischer Aufbau eines Biosensors

Bei einem Biosensor hat die zu analysierende Substanz (B) nur die Möglichkeit, mit der biologischen Komponente spezifisch zu interagieren. Infolge dieser Reaktion bzw. Änderung wird durch einen sogenannten Transducer ([Schöning M.J. 2000](#)) ein elektrisches Signal ausgelöst. Durch eine elektronische Schaltung wird das Signal verstärkt und an ein Auswertungsgerät weitergegeben.

Die biologischen Komponenten werden als Signalgeber bezeichnet und können Mikroorganismen, Zellverbände, Antikörper, Makromoleküle, also DNA, oder Enzyme (Hall E.A. 1995) sein. Die biologische Komponente ist dann mit einem Transducer kombiniert. Der Transducer (Signalwandler) kann auf einer Vielzahl von physikochemischen Detektionsmethoden beruhen, wie z.B. der elektrischen, elektrochemischen, thermischen oder magnetischen Methode (Scheller F. et al. 1992; Müller A. Zürn, 1994).

Bei einer optischen Detektionsmethode bzw. optischen Transducern ist hierfür die Absorption bzw. Reflexion (Keusgen M. 1999) oder Fluoreszenzmessung von großer Bedeutung.

### **1.2.1 Etablierung eines fluorimetrischen FIA- Messsystems**

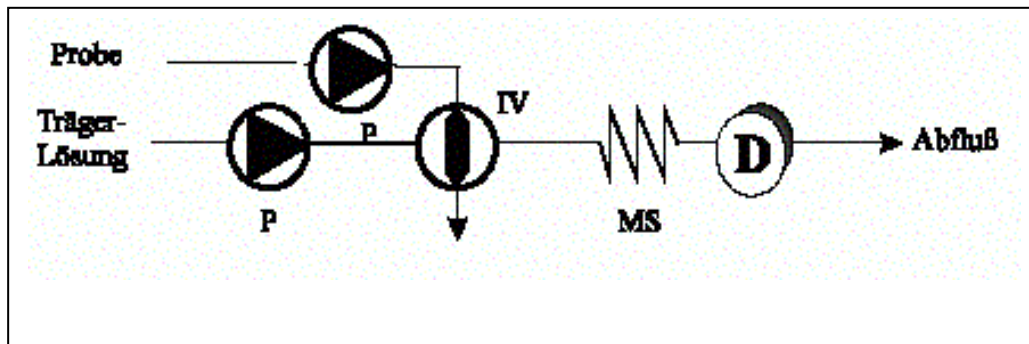
In dieser Arbeit sollte ein biosensorisches Durchflusssystem (**FIA**, **Flow Injektion Analyser**) auf der Basis eines fluorimetrischen Durchflussdetektors und immobilisierter Allinase etabliert werden.

#### **1.2.1.1 Durchflussanalyse**

Bei der Flow-Injektion-Analyse handelt sich um eine Methode, bei der ein definiertes Volumen ( $V_s$ ) einer Reagenzlösung oder Probe in einen nicht-segmentierten Strom einer Trägerlösung (T) injiziert wird ([Ruzicka et al. 1975](#)).

Eine Einstellung der Konstanten der Verweilzeitverteilung zwischen der Injektionsstelle und dem Durchflussdetektor führt zu einem gut reproduzierbaren Konzentrationsprofil, welches durch einen geeigneten Durchflussdetektor direkt oder durch Indikatorreaktion aufgenommen wird (Ruzicka J. u. Hansen E.H. 1981). Die sogenannte FIA konnte aufgrund ihrer hohen Einsatzflexibilität in vielen Anwendungsbereichen der Analytik zur quantitativen Konzentrationsanalytik eingesetzt werden (Ruzicka, J u. Hansen; Möller 1987).

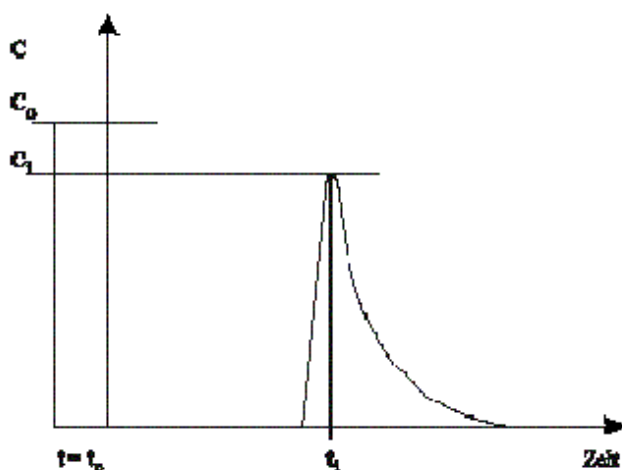
Eine FIA- Anordnung ist schematisch auch in Abb. 3.2. zu sehen (s. Ergebnisse).



**Abb. 1.2** : Einfaches FIA-System, IV Injektionsventil, D Detektor MS Mischschleife

Wie aus der Abb.1.2 zu entnehmen ist, wird die Probe über eine Pumpe in die Probeninjektionsschleife geführt, in die ein bestimmtes Volumen aus der Probe eingeschlossen wird.

Eine Trägerlösung oder gegebenenfalls eine Indikatorreaktion führt das eingeschlossene Volumen in die Mischschleife zum Detektor weiter, welche durch geeignete Durchflussreaktoren ersetzt werden könnte. Je nach Detektionsmöglichkeit wird das hervorgerufene Signal vom Detektor aufgenommen, verarbeitet, aufgezeichnet und entsprechend ausgewertet. Bei der Führung der Probe wird eine Vermischung der Probe mit der Trägerlösung stattfinden, was in der Probenkonzentration eine Verdünnung verursacht (Abbildung 1.3).



**Abb.1.3:** Konzentration/Zeit-Profil

**C<sub>0</sub>** Probenkonzentration vor der Vermischung mit der Trägerlösung

**C<sub>i</sub>** Probenkonzentration nach Vermischung mit der Trägerlösung

**t<sub>0</sub>, t<sub>i</sub>** Start und vorläufige Zeit jeweils

Die Probe wird mit der Konzentration **C<sub>0</sub>** injiziert und das sich ausbildende Konzentrationsprofil durch den Verdünnungsfaktor **D<sub>i</sub>** zum jeweiligen Zeitpunkt **t<sub>i</sub>** beschrieben (Gleichung 1.1).

$$D_i = C_0 / C_i$$

**Gleichung (1.1)**

Der Verdünnungsfaktor **D<sub>i</sub>** wird durch die laminare Strömung im Durchflusskanal und bei relativ langen Verweilzeiten auch durch die radiale und axiale Diffusion bestimmt.

Eine Bestimmung des hydrodynamischen Verhaltens bei dem verwandten FIA-System lässt sich über die Abhängigkeit des Verdünnungsfaktors **D<sub>i</sub>** von der Zeit beschreiben (Gl. 1.2).

$$D_i(t) = C_0(t) / C_i(t)$$

**Gleichung (1.2)**

Aus diesem Grund sind die Verdünnung **D<sub>i</sub>** und der Umsatzgrad der Bestimmungsreaktion von großer Bedeutung für dieses Messverfahren.

In der vorliegenden Arbeit wurde bei der Etablierung auf die o.g. Effekte geachtet und in angemessener Weise verfahren. (Die Luftbläschen zwischen Trägerlösung und Probe sind absichtlich eingeschlossen, um eine Vermischung der Lösungsmittelfronten zu verhindern).

### **1.2.1.2 Fluorimetrische Detektion**

In dem eingesetzten FIA-System wurde eine fluorimetrische Detektion angewandt. Das Signal/Rausch-Verhältnis war für die hohe fluorimetrische Sensitivität in der selektierten Anregungswellenlänge 415 nm sehr gut. Die Fluoreszenzintensität **I<sub>f</sub>** lässt sich durch folgende Gleichung beschreiben (Gle.2.1).

$$I_f = k_g \Phi_f I_0 (1 - e^{-\epsilon c d}) \quad (2.1)$$

wobei

- $k_g$**  die Gerätekonstante,
- $\Phi_f$**  die Fluoreszenzquantenausbeute,
- $I_0$**  die Intensität des Anregungslichtes,
- $\epsilon$**  der molare Extinktionskoeffizient,
- $d$**  die mit  $I_0$  berücksichtigte Schichtdicke der Lösung und
- $c$**  die Konzentration der zu detektierenden Substanz ist.

Entwickelt man die Exponentialfunktion in einer Reihe, so kann diese für verdünnte Lösungen nach dem zweiten Glied abgebrochen werden, da  $c$  sehr klein ist (siehe Gl. 2.2) (Schmidt, W.1994).

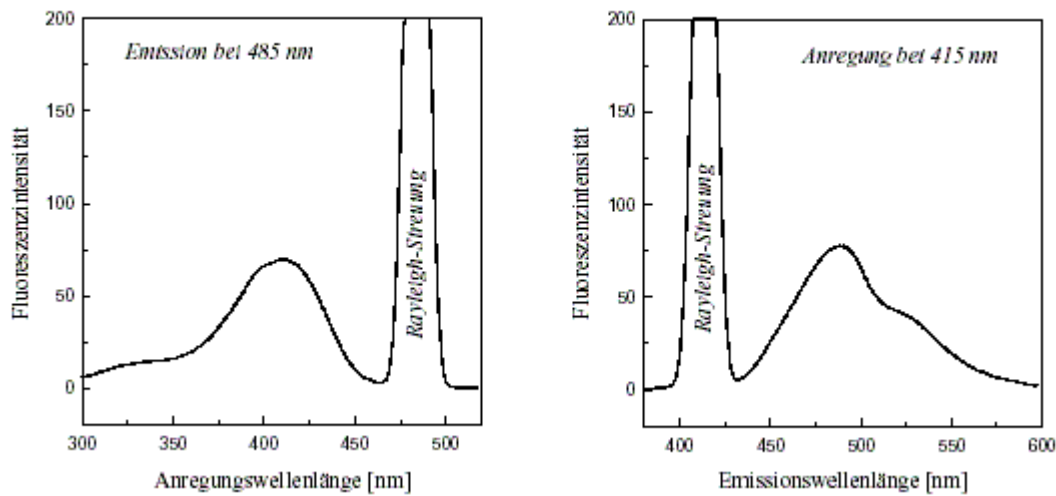
Unter dieser Voraussetzung ist die Fluoreszenzintensität bei konstantem  $I_0$  proportional zur Konzentration des fluoreszierenden Stoffes, so dass eine Eichkurve für Konzentrationsbestimmungen aufgenommen werden kann.

$$I_f = k_g \Phi_f I_0 \epsilon c d \quad (2.2)$$

Da die Fluoreszenzintensität proportional ist zur Intensität des Anregungslichts und der Quantenausbeute, wird für jedes absorbierte Photon ein energieärmeres Photon als Fluoreszenzstrahlung emittiert. Bei der Vermessung des Fluoreszenzsignals können durch auszuschaltende Effekte Störungen auftreten (Bisswanger H.1994; Galle H.J.1988, Schulman S.G.1985), wie z.B. die Raman- und Rayleigh-Streuung.

Eine Überlagerung der Rayleigh-Streuung (elastische Streuung) kann man auch in der Abbildung 1.4 erkennen. Diese Art von Streuung (Rayleigh) könnte durch sogenannte Grenzflächen in der zu messenden Lösung, wie z.B. an Luft/Zellwand- oder Zellwand/Lösung-Grenzflächen oder auch durch koloidale Partikel, verstärkt werden (Schrader B. 1995).

In dieser Arbeit wurde die Emission eines Isoindolderivates, das von Ammoniak und Thioglycolsäure abgeleitet wurde, detektiert. Abb.3.1.1 im Abschnitt „Ergebnisse“.



**Abb. 1.4:** Das Emissions- und Anregungsspektrum eines von Ammoniak und Thioglycolsäure abgeleiteten Isoindolderivates (Jansen, H. et al. 1985).

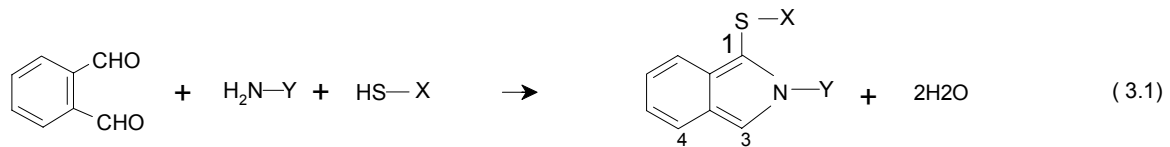
Um die Anregungswellenlängen ordnet sich symmetrisch eine nicht-elastische Streuung an. Die Photonen des Anregungslichtes treten mit allen in der Probenlösung befindlichen Molekülen in Wechselwirkung, wodurch die Photonenenergie übertragen bzw. entzogen wird. Diese Art von nicht-elastischer Streuung (Raman-Streuung) konkurriert mit dem emittierten Licht und verursacht eine Minderung bzw. Abschwächung der Ausbeute einer Fluoreszenzemission, insbesondere wenn sie in überlappenden Bereichen auftritt.

Daneben könnte die Fluoreszenzausbeute auch von anderen Vorgängen und geometrischer Platzierung beeinträchtigt bzw. durch einen Quencher oder Ähnliches die vorhandenen Konzentrationen der Probenlösung abgedämmt werden (Löschungseffekte).

### 1.2.1.3 Ableitung von substituiertem Isoindol und o-Phthalaldehyd

Da die Reaktion der primären Amine mit Ortho-Phtalaldehyd in alkalischem Medium in vielen analytischen Verfahren erprobt wurde (Roth M. 1971), steht das FIA-Verfahren in dieser Arbeit in primärem Fokus.

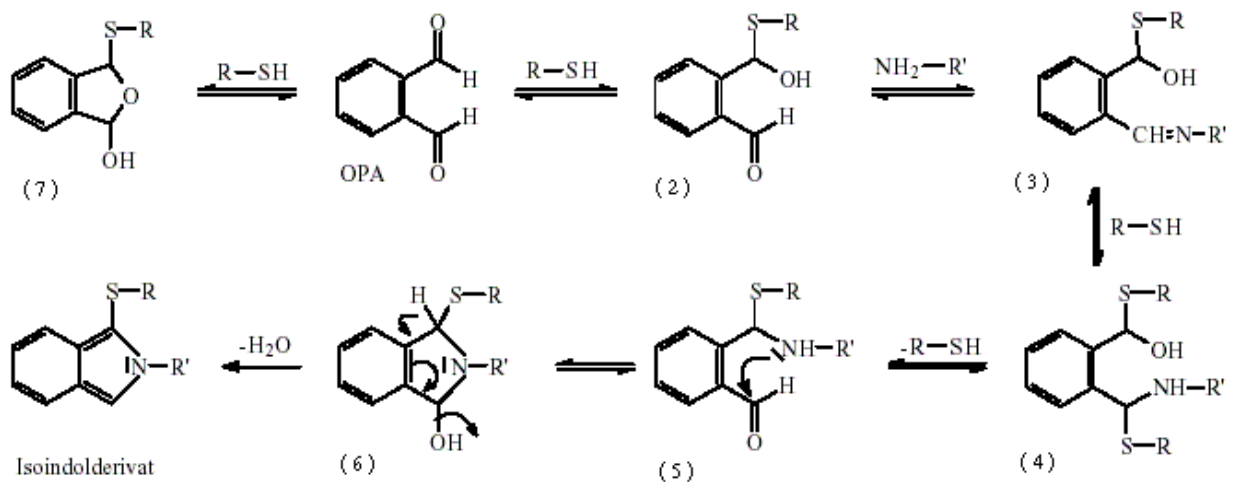
O-Phthalaldehyd reagiert mit primärem Amin in alkalischem Medium in Anwesenheit von reduzierender Schwefelverbindung (Merkaptoethanol) und ergibt die fluoreszierende Substanz [1-(Alkyl) thio-2-alkylsubstituierte Isoindolderivate] (Reaktion 3.1) (Garcia Alvarez-Coque M.C. et al. 1989).



X: H oder R  
Y: H oder R'

1-( Alkyl) thio-2-(alkyl )-  
substituiertes Isoindol

Die entstehenden Isoindolderivate sind sehr reaktiv und weisen eine dementsprechende Instabilität auf (Simons S.S. et al. 1978). Für die Entstehung der Isoindolderivate wurden diesbezüglich verschiedene Reaktionsmechanismen diskutiert. Laut Simons S.S. and Johnson 1978 reagiert OPA mit der Thiolgruppe und nachfolgend mit dem Amin (s. Schema 3.2).



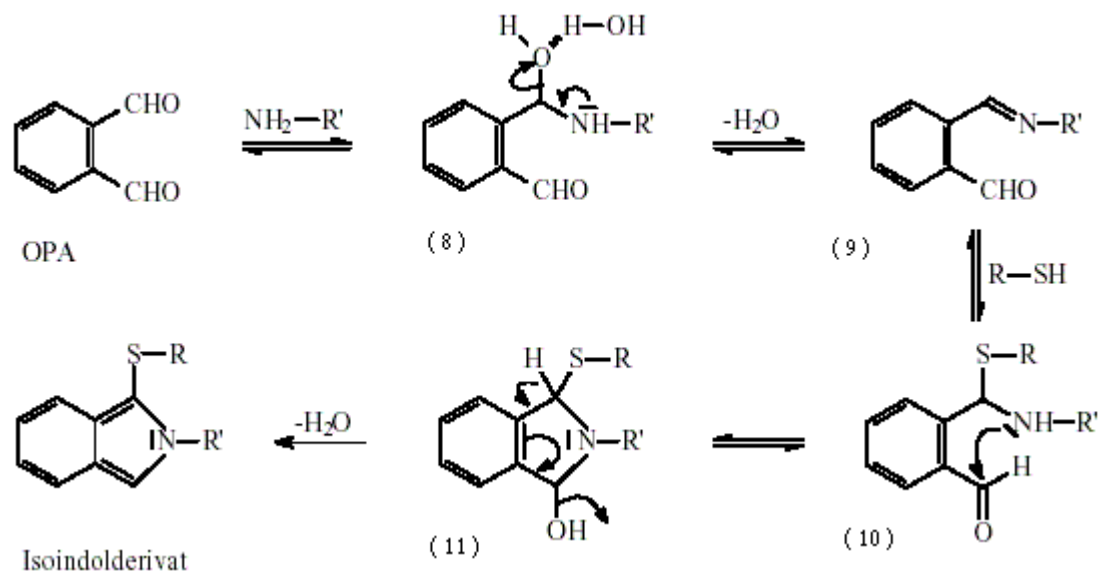
**Schema 3.2** Reaktionsmechanismus von OPA mit primärem Amin in Anwesenheit von Thiol-Verbindung nach Sternson et al. 1985; Simon S.S.1978.

OPA und Thiol reagieren zu einem Hemithioacetal (2), das mit dem Amin zu einem Imin (3) umgesetzt wird. Durch den nukleophilen Angriff einer weiteren Thiogruppe entsteht das Hemithioacetal (4), das sich in das  $\alpha$ -Alkylaminobenzylsulfid (5) umwandelt. Der Isoindolring (6) wird durch intramolekularen nukleophilen Angriff des

sekundären Amins auf die freie Carbonylgruppe gebildet. Nach Dehydratation entsteht das Isoindolderivat.

Das OPA nach dem Schema 3.2 ist im Gleichgewicht mit dem cyclischen Thiol in Anwesenheit von Thiolverbindung (7) (Sternson et al. 1985).

Der alternative Reaktionsweg wurde von Sternson et al. 1985 vorgeschlagen ( Schema 3.3 ).



**Schema 3.3** Mechanismus der Reaktion von OPA mit Thiolverbindung in Anwesenheit von primärem Amin nach Simon et al. 1978

OPA reagiert erst mit dem primären Amin zu einem Carbinolamin (8), das im nächsten Schritt zum reaktiven Imin umgewandelt wird. Dies wird von der Thiolgruppe angegriffen, wobei das  $\alpha$ -Alkylaminobenzylsulfid (5) entsteht.

Im Weiteren verläuft die Reaktion analog dem Schema 3.2. Entscheidend bei den hier diskutierten Abläufen dieser Reaktion ist der pH-Wert. Einige Aussagen für die Stabilität der Isoindolderivate wurden von Stobaugh et al. 1983 getroffen.

Stobaugh et al. 1983 Fanden heraus, dass die zunehmende Verzweigung der Thiole zu einer Stabilisierung der Isoindolderivate beiträgt; dabei stellten sie fest, dass die Stabilität von den N-Substituierten und dem  $\alpha$ -C-Atom des Amins abhängig und auf sterische Faktoren zurückzuführen ist.



## **1.3 Bestrahlung**

### **1.3.1 Geschichtlicher Überblick**

Kurz nach der Entdeckung von Bremsstrahlung durch Röntgen 1895 wurde von Becquerel 1896 die natürliche Radioaktivität entdeckt und im gleichem Jahr die Behandlung von Lebensmitteln mit ionisierenden Strahlungen von Mensch vorgeschlagen.

1921 wurde durch die Bekämpfung von Trichinen in Nahrungsmitteln von Schwarz beschrieben und von Wüst 1923 zur Lebensmittelbestrahlung patentiert.

Im Jahr 1951 initiierte die US-Atom-Energie-Kommission diesbezüglich ein einschlägiges Forschungsprogramm, und im Jahr 1959 wurde mit der kommerziellen Bestrahlung von Gewürzen in Stuttgart, Germany, begonnen (BFE-Presse-Mitteilungen).

Im Institut für Strahlentechnologie der Lebensmittel in Karlsruhe, Germany, wurde 1966 der erste Internationale Kongress über Lebensmittelbestrahlung abgehalten und Karlsruhe 1970 zum Sitz für internationale Projekte auf dem Gebiet der Bestrahlung von Lebensmitteln erklärt.

FAO/ IAEA/ WHO Joint Expert Committee on Food Irradiation erklärte im Jahr 1980 die Zulassung bis **10 kGy** in gesundheitlicher Hinsicht als unbedenklich; Anfang 1988 wurde diese Entscheidung bei der Internationalen Konferenz „Acceptance, Control of, and Trade in Irradiated Food“ in Genf bestätigt.

### **1.3.2 Definitionen und Begriffe**

Unter dem Begriff Lebensmittelbestrahlung versteht man die Behandlung von Lebensmitteln mit einer besonderen Art von Energie bei sorgfältiger Kontrolle der Strahlendosen (WHO 1991). Dabei dringen elektromagnetische Wellen in Materie ein, die durch ihre große Energiemenge aus den Elektronenhüllen von Atomen und Molekülen herausgestoßen wurden, wodurch es zur Bildung von Ionen kommt. Dieses führt zu der Bezeichnung ionisierende Strahlung, welche sich von der Behandlung der Lebensmittel mit Mikrowellen unterscheidet.

Durch eine Behandlung der Lebensmittel mit ionisierender Strahlung als Konservierungsmethode wird keine massive Veränderung hervorgerufen, wodurch ein nachträglicher Nachweis von bestrahlten Lebensmitteln mit vielen Schwierigkeiten verbunden sein kann (Ehlermann, Delince 1998). Auch der

Radioaktivitätsgehalt des mit ionisierenden Strahlen behandelten Lebensmittels bleibt im unmessbaren Bereich (WHO1991).

Deshalb wurde die Behandlung von Lebensmitteln mit ionisierender Strahlung seit einiger Zeit als Hilfsmethode für eine Konservierung bzw. Reduzierung der potenziellen Belastung an pathogenen und anderen Mikroorganismen in Lebensmitteln eingesetzt und dadurch eine Lagerfähigkeits-Verlängerung erzielt (WHO 1994, Diel 1995). Einen Überblick über die meist verwendeten Bestrahlungen von Lebensmitteln gibt Tab.1.1.

<b>ZWECK</b>	<b>DOSIS*</b>	<b>PRODUKTE</b>
<b>Niedrige Dosis (bis 1 kGy)</b>		
Hemmung der Keimung	0,05 - 0,15	Kartoffeln, Zwiebeln, Ingwerwurzeln, Yam-Wurzel
Bekämpfung von Insekten und Parasiten	0.15 - 0,75	Getreide und Hülsenfrüchte, frische und getrocknete Früchte, Trockenfisch, roher Fisch, Trockenfleisch, Schweinefleisch, Schinken
Verzögerung physiologischer Prozesse (z.B. Reifung )	0.25 - 1.0	Frische Früchte und Gemüse (Mango, Papayas, Bananen, Champignons)
<b>Mittlere Dosis (1-10 kGy)</b>		
Haltbarkeitsverbesserung	1.0 - 3.0	Frischfisch, Erdbeeren
Ausschaltung von verderbnis- und krankheitserregenden Mikroorganismen	1.0 - 10	Frische und gefrorene Meeresfrüchte, rohes und gefrorenes Geflügel und Fleisch, Eiprodukte, Camembert, Gewürze, Trockengemüse
Verbesserung technische Eigenschaften	2.0 -7.0	Trauben (erhöhte Saftausbeute), Trockenfrüchte (verbesserte Rehydratisierung)
<b>Hohe Dosis (10-75 kGy)**</b>		
Industrielle Sterilisation (in Kombination mit milder Erhitzung)	30 - 75	Fleisch, Geflügel , Meeresfrüchte, Fertiggerichte, sterilisierte Krankenhausdiäten
Dekontamination von Zutaten und Zusatzstoffen	10-50	Gewürze, Enzympräparate, Naturgummi
<p><b>Tab. 1.1:</b> Anwendungsmöglichkeiten der Bestrahlung im * [Gy: Gray: Einheit der Energiedosis 1Gy=1Joule/kg]** nur für bestimmte Zwecke, wie Astronauten- und Krankenhauskosten.</p>		

### 1.4.2.1 Definitionen:

**Aktivität** ist ein Maß für die Zahl der zerfallenden Kerne pro Zeiteinheit (Bq: Kernzerfall/ Second) (Eder et al. 1986).

**Halbwertszeit** für ein Isotop ist die Zeitspanne, innerhalb der die Hälfte der Atomkerne zerfallen werden (Diehl 1995).

**Bestrahlungsdosis / Energiedosis / absorbierte Dosis** ist definiert als die im Mittel pro Maßeinheit im Gewebe deponierte Energie und wird in Gray angegeben (Edel et al.1986).

$$1 \text{ Gy} = 1 \text{ J/ kg} = 1 \text{ W* s/ kg}$$

$$1 \text{ kGy} = 1 \text{ J/g}$$

$$10 \text{ kGy} = 1 \text{ Mrad}$$

**Strahlenenergie / Quantenenergie** wird als die von den Strahlen transportierte Energie bezeichnet und mit **eV** gemessen. (Edel et al.1986).

$$1 \text{ MeV} = 1,602 \times 10^{-13} \text{ Joule}$$

**Dosisleistung** ist die absorbierte Energiedosis pro Zeiteinheit [Gy/s] (für Gammaquellen etwa unter 10 Gy/s bei Elektronenstrahlen zwischen  $10^4$  und  $10^9$  Gy/s, Diehl 1995)

**Dosimeter** nennt man ein Material oder Gerät, das in reproduzierbarer Weise auf Strahlung anspricht. Dieses kann dazu verwendet werden, die absorbierte Dosis an einem bestimmten Ort zu messen. Dazu werden die nachstehenden drei Klassen von Dosimetern verwendet:

**1- Primär Dosimeter** (Nationale Normale)

- Ionisationskammern
- Kalorimeter

**2- Referenz Dosimeter**

- Alanin

- Dichromat- Lösungen
- Ceric-Cerus-Sulfat-Lösung

### **3- Routine Dosimeter**

- eingefärbte Polymethylmethacrylate PMMA „RED PERESPEX“
- Cellulose-Triacetatfolien
- Alanin (Tablette bzw. beschichtete Folie).

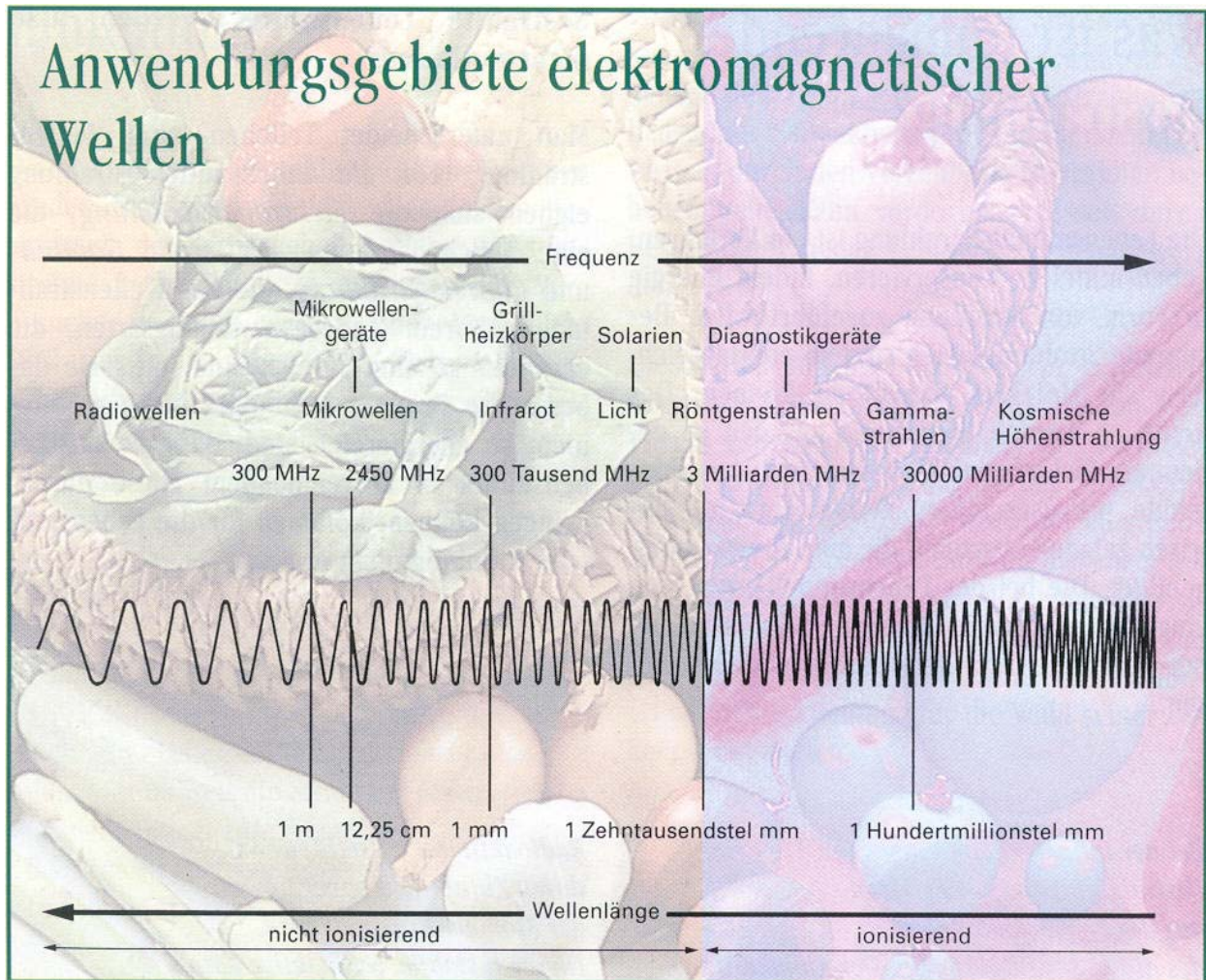
### **1.3.3 Strahlenquellen und Strahlenarten**

Bei Transport von Energie im Raum ohne tragendes bzw. umgebendes Medium spricht man von Energietransport durch Strahlung, also Bestrahlung (Eder et al. 1986).

Für die Lebensmittelbestrahlung wurde nach dem „General Standard For Irradiated Food“ sichergestellt, dass keinerlei natürliche Radioaktivität bei der Behandlung mit ionisierender Strahlung entsteht und nur folgende Strahlenarten eingesetzt werden gemäß dem „Codex Alimentarius“ (Commission 1984):

- **Elektronenstrahlen** bis zu einer Energie von 10 MeV
- **Gammastrahlen** des radionukliden Kobalt  $^{60}\text{Co}$  oder  $^{137}\text{Cs}$
- **Röntgen** bis zu einer Energie von 5 MeV

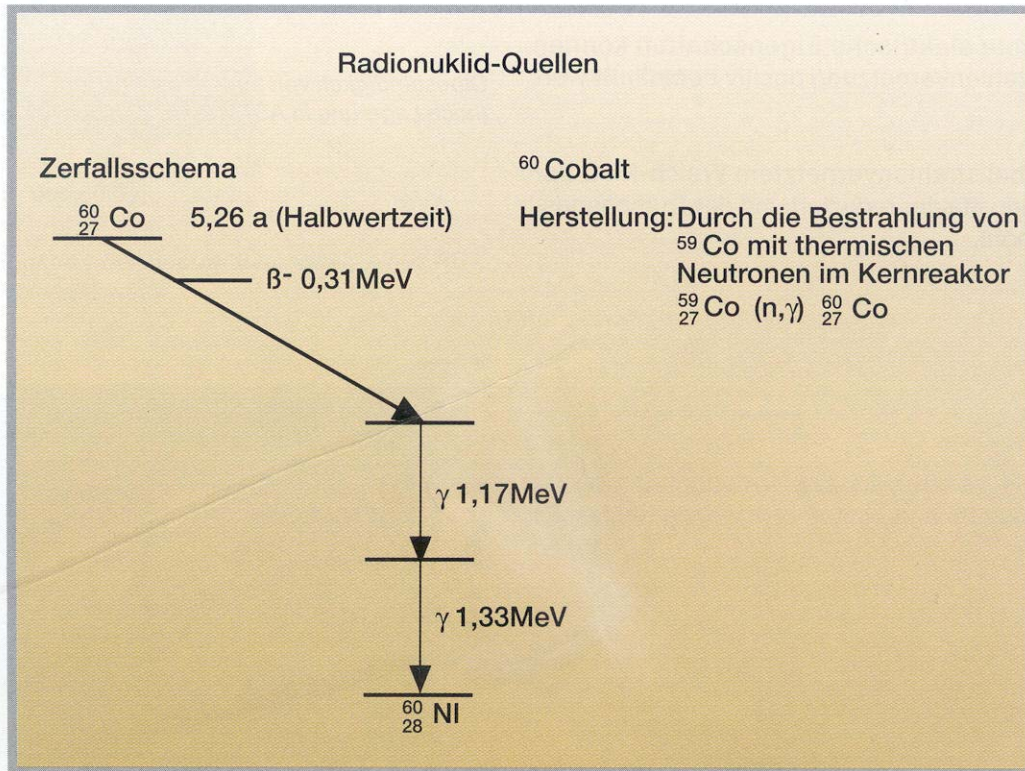
Nachfolgende Darstellung verdeutlicht den Frequenz-Bereich der o.g. verwendeten Strahlungen (BGS).



- Bei der **Elektronenstrahlung** werden Elektronen abgestrahlt, die durch Einwirkung eines Beschleunigers auf das entsprechende Energie-Niveau gebracht und an ein Target angeschossen werden. Im Gegensatz zu Photonenstrahlung dringen diese Elektronen in verhältnismäßig dünne Schichten ein und erreichen eine endliche Reichweite von einigen Zentimetern (Eder et al.1986).

- Der radioaktive  $^{60}\text{Co}$  (Cobalt) wird als künstlich hergestellter **Gammastrahler** in der Lebensmittelkonservierung verwendet (WHO 1991).

Er entsteht, wenn natürlicher  $^{59}\text{Co}$  im Kernreaktor einer Neutronenstrahlung ausgesetzt wird.



Zerfallschema Co-60

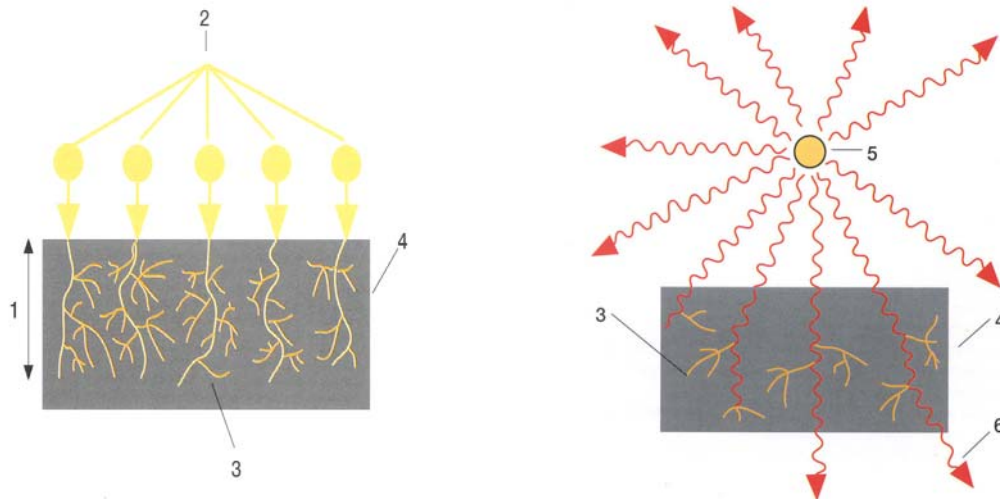
Beim radioaktiven Zerfall des  ${}^{59}\text{Co}$  (Halbwertszeit  $\sim 5.26$  Jahre) entsteht  ${}^{60}\text{Co}$  durch Emission von Gamma-Strahlung mit einer Energiemenge von 1,17 MeV und 1,33 MeV sowie Beta-Strahlung mit 0,31 MeV (Zerfallschema  ${}^{60}\text{Co}$ ). Dabei entsteht das stabile Isotop  ${}^{60}\text{Ni}$ .

(Eder et al. 1986, Urban 1986, Stroppe 1987, Heyer et al. 1991).

Das weiterhin verwendete Radionuklid ist Cäsium  ${}^{137}\text{Cs}$ , welches als Nebenprodukt bei der Wiederaufarbeitung abgebrannter Reaktor-Brennelemente gebildet wird und eine Halbwertszeit von 30,2 Jahren hat. Beim radioaktiven Zerfall tritt neben Beta-Emission mit 0,51 und 1.17 MeV eine Gamma-Strahlung mit 0,662 MeV auf, und stabiles  ${}^{137}\text{Ba}$  entsteht (Diehl 1995, Stroppe 1987).

Oft wird bei der Bestrahlung auf radioaktives Quellenmaterial verzichtet und parallele Schienen-Strahlung eingesetzt (maschinell erzeugt), denn das Erwirken einer Umgangsgenehmigung sowie die ausreichende Abschirmung des radioaktiven Quellenmaterials erfordern einen erhöhten Aufwand.

Bei **Röntgenstrahlen** werden beschleunigte Elektronen durch Wechselwirkung mit fester Materie abgebremst; dadurch entsteht Bremsstrahlung (Röntgenstrahlung.). Dabei wird oft Wolfram oder Tantal als Strahlungskonverter (Target) eingesetzt (Eder et al. 1986). Jedoch entspricht die Ausbeute an Röntgenstrahlung nur 10 % der beschleunigten Elektronen; diese Ineffizienz wird von Anon. 1994, Diehl 1995 als wesentlicher Nachteil erkannt.



**Abb.1.4: Elektronenstrahlen** (Links)

**Gammastrahlen** (Rechts)

1 Eindringtiefe des Elektrons, 2 Primärelektronen, 3 Sekundärelektronen, 4

Während bei Gamma-Strahlung, z.B. durch  $^{60}\text{Co}$ -Anlage, eine große Eindringtiefe (Abb.1.1) bzw. eine unendliche Reichweite erreicht werden kann und als vorteilhaft bei Palettenbestrahlung "Zwiebel, Kartoffeln, Getreide" eingesetzt worden ist, zeichnen sich Elektronenstrahlen bei rasantem Transport von Energie am Target aus; somit wird eine schnellere Erreichung der erwünschten Dosen erzielt.

Nachteilig ist bei Gammastrahlen die Bestrahlungszeit bei hohen Dosen, denn die Dosisleistung ist im Vergleich zu jener von Elektronenstrahlung geringer.

Die durch Elektronenbeschleuniger entstandene Elektronenstrahlung kann in beliebiger Stärke erzeugt und zu jeder Zeit abgeschaltet werden, was zur Sicherheit des Verfahrens und zur Handhabungsflexibilität beiträgt.

Nachteilig ist jedoch die geringere Durchdringungsfähigkeit in eine Materie, denn diese ist abhängig von der Höhe der Strahlenenergie (bei einer Energie von 10 MeV

etwa 5 cm in Wasser, bei 5 MeV etwa 2,5 cm, hingegen bei 2 MeV nur um die 0,9 cm) (Diehl 1995).

### **1.3.4 Strahlung / Materie Wechselwirkung**

Die Aktion der Strahlung und die damit verbundenen Einflüsse auf die Materie sowie die Materie-Reaktionen und deren Einwirkung auf die Ausbreitung der Strahlung sind sehr komplex und hängen sowohl vom **Typ der Energiestrahlung** und deren Zusammensetzung ab als auch vom **Zustand** und der **Temperatur** des absorbierten Materials und der **Umgebung**. Dies führt zu einer Schwächung der Strahlung und zur Energiedeposition in der Materie (Eder et al. 1986).

Beim Eindringen der Elektronenstrahlen in Materie finden Zusammenstöße bzw. energetische Anregungen zwischen den geladenen Teilchen ( $e^-$ ) und den Materiemolekülen und Atomen statt. Dadurch verlieren die Elektronen ihre Energie. Ist letztendlich das Strahlungsteilchen auf thermische Energie abgebremst, hat es längs seiner Bahn zahlreiche Elementarprozesse ausgelöst. Seine Energie hat es dabei direkt portionsweise auf mehrere Moleküle übertragen.

Dagegen passieren Photonen (Gamma und Röntgenstrahlung) die Materie über längere Strecke ungehindert, um dann bei einem Zusammenstoß einen Teil ihrer Energie abzugeben. Hierdurch bzw. durch die kinetische Energie der Photonen werden von der Materie Elektronen abgelöst, die in der Lage sind, Ionisierungen und weitere Anregungen auszulösen (Heyer et al. 1991).

### **1.3.5 Chemische Veränderung**

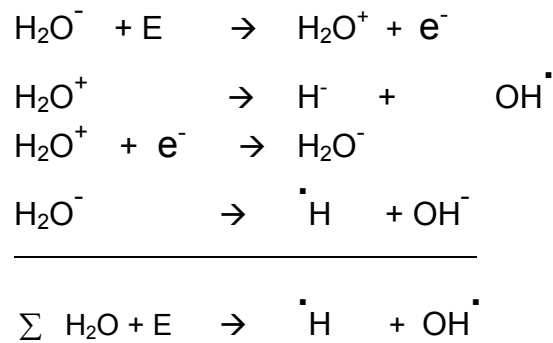
Die Zusammensetzung der Lebensmittel ist äußerst komplex. Durch Behandlung mit ionisierender Strahlung kommt es zur Spaltung chemischer Bindungen und Entstehung neuer Verbindungen, die wiederum von vielen Strahlungsbedingungen wie Temperatur, Sauerstoff und Dosis sowie dem Wassergehalt abhängig sind (Ehlermann 1998).

Nachfolgend wird über wichtige Inhaltstoffe und deren chemische Veränderungen berichtet.



### 1.3.5.1 Radiolyseprodukte des Wassers

In vielen Lebensmitteln ist der Wassergehalt ziemlich hoch; sogar trockene Nahrungsmittel oder Nahrungsergänzungsmittel beinhalten bis zu 15% Wasser. D.h., bei der Bestrahlung wird ein Großteil der Strahlungsenergie vom Wasser absorbiert, und es kommt zur Zersetzung von Wassermolekülen. Die primäre Radiolyse des Wassers läuft nach folgender Reaktion ab:



Die primäre Bildung der kurzlebigen Wasserstoffradikale [ $\text{H}^\cdot$ ] und Hydroxylradikale [ $\text{OH}^\cdot$ ] ist nach  $10^{-7}$  Sekunden abgeschlossen. Zunächst entstehen durch Ionisation ionisierte Wassermoleküle ( $\text{H}_2\text{O}^+$ ) und Elektronen ( $\text{e}^-$ ). Letztere reagieren mit Wassermolekülen und bilden u.a. hydratisierte Elektronen (solvatisiertes  $\text{e}^-_{\text{aq}}$ ). Durch homolytische Spaltung kommt es zur Bildung von Hydroxylradikalen und Wasserstoffatomen. Diese reagieren entweder untereinander zu Wasserstoffperoxyd und molekularem Wasserstoff oder verursachen durch Wechselwirkung mit anderen Substanzen indirekte Bestrahlungseffekte (Reaktions-Überblick von Eder et al. 1986).

- |       |  |                                      |
|-------|--|--------------------------------------|
| 1)    | $\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{H}_2\text{O}^+ + \text{e}^-$   | Ionisierung                          |
| 2)    | $\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{H}_2\text{O}^*$  | & Anregung                           |
| 3)    | $\text{H}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{H}_3\text{O}^+ + \text{OH}^\cdot$   | Bildung OH Radikal                   |
| 4)    | $\text{e}^- + n\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{e}^-_{\text{aq}}$  | Bildung solvatisiertes Elektron      |
| 5)    | $\text{H}_2\text{O}^* \rightarrow \text{H}^\cdot + \text{OH}^\cdot$  | Bildung von Radikalen                |
| 6)    | $\text{H}^\cdot + \text{OH}^\cdot \rightarrow \text{H}_2\text{O}$  | Rückbildung von $\text{H}_2\text{O}$ |
| 7)    | $\text{H}^\cdot + \text{H}^\cdot \rightarrow \text{H}_2$   | Bildung von Wasserstoff              |
| 8)    | $\text{OH}^\cdot + \text{OH}^\cdot \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2$   | Bildung von Wasserperoxyd            |
| <hr/> |  |                                      |
| 9)    | $4,18 \text{H}_2\text{O} \rightarrow 2,65 \text{H}_3\text{O}^+ + 2,65 \text{e}^-_{\text{aq}} + 0,55 \text{H}^\cdot + 2,70 \text{OH}^\cdot + 0,45 \text{H}_2 + 0,75 \text{H}_2\text{O}_2$ |                                      |

### 1.3.5.2 Radiolyseprodukte von Kohlenhydraten

Bei einem Modellversuch wurde erkannt, dass kohlenhydrathaltige Lebensmittel durch Bestrahlung eine chemische Veränderung erfahren. Dabei wurden Reaktionen der OH\*-Radikale beobachtet, bei denen Wasserstoff an der H-C Bindung abgespalten wird (von Sonntag C. 1980). Detaillierte Beschreibungen der Radikalmechanismen und Reaktionswege sind bei v. Sonntag 1987 zu finden.

Wichtig bei der Bestrahlung von Kohlenhydraten ist, dass es zu einer sogenannten Depolymerisierungsreaktion von Polysacchariden kommt, so dass z.B. Stärke in Dextrine abgespalten und dementsprechend eine Abnahme der Viskosität gemessen werden konnte (Scherz H. 1974).

$\text{OH}^* + \text{H-ROH} \rightarrow \cdot\text{ROH} + \text{H}_2\text{O}$  Kohlenwasserstoffradikal ( $\cdot\text{ROH}$ ) reagiert weiter.

Abhängig von den resultierenden Molekülarten und der Position der R=O Doppelbindung entstehen Säuren, Ketone oder Aldehyde. Da das OH\* nach der o.g. Reaktion vom C6-Körper der Glucose von allen sechs Kohlenstoffatomen abgespalten werden kann, sind in dieser Stoffgruppe theoretisch sehr viele Folgeprodukte möglich. Allein für Glucose sind 34 Radiolysen beschrieben worden.

### 1.3.5.3 Radiolyse von Lipiden

Fette setzen sich in Nahrungsmitteln aus verschiedenen Modifikationen zusammen (gesättigt, ungesättigt, fest, flüssig). Da ein großer Teil der Fette als Triglyceride vorkommt, werden vor allem sie von der Strahlung getroffen. Aufgrund der Wasserunlöslichkeit der Triglyceride werden sie jedoch nicht unmittelbar beeinflusst, sondern von Wasserradiolysen oder anderen reaktionsfähigen Radiolysen verändert, also durch indirekte Einwirkung. Direkte Strahleneinwirkung führt jedoch zur Bildung von Kohlenstoffradikalen, die eine Dimerisierung oder Spaltung der Kohlenwasserstoffkette verursachen. Nach Nawar 1977 sind in einem Triglyceridmolekül um die Carbonylgruppe fünf Angriffspunkte vorhanden, an denen bevorzugt radiolytische Spaltung auftritt. Es kann aber auch an der C-C Bindung zur Spaltung kommen.

Die Anwesenheit von Sauerstoff beschleunigt die Autooxidation der vorhandenen Hydroperoxide, so dass sich Aldehyde, Ketone, freie Fettsäuren oder Polymere bilden können. Die entstehenden Radiolysen unterscheiden sich nicht von den

thermisch gebildeten Produkten. In keinem Fall entstehen jedoch aromatische oder heterocyclische Ringe. Diese Reaktionen ergeben sich hingegen beim Kochen mit höheren Temperaturen.

Weitere wichtige Radiolyseprodukte der Triglyceride sind abgespaltene Fettsäuren, verbleibende Propan- oder Propen-Dioldiester, abgespaltene Aldehyde und durch Ringschluss gebildete **2-Alkylcyclobutanone** (2-ACB). Diese konnten nur in bestrahlten fetthaltigen Lebensmitteln nachgewiesen werden.

Kürzlich wurde offensichtlich, dass eine gewisse Toxizität von 2-ACB bei fetthaltigen Lebensmitteln vorhanden ist (EUROPEAN\* COMMISSION, Final 3 July 2002) und daher weitere Untersuchungen diesbezüglich notwendig sind (joint FAO/WHO 2002). Konkretes ist bis heute (2008) noch nicht bekannt.

#### **1.3.5.4 Radiolyse von Protein**

Bei Bestrahlung einzelner Proteine wurden in wässrigen Lösungen bereits chemische Veränderungen beobachtet. Dabei wurde festgestellt, dass diese von vielen Faktoren abhängig sind, nämlich von Proteinstrukturen, ob globulär oder fibrillär, ob nativ oder denaturiert; je nach Zusammensetzung, Konzentration, Begleitsubstanzen, zusätzlich zu den Bestrahlungsbedingungen Temperatur, Dosis, Dosisleistung, Anwesenheit von Sauerstoff usw.

Proteine werden durch Bestrahlung entweder zu Fragmenten gespalten, oder es findet eine Quervernetzung zu Aggregaten statt. Ebenso wenig sind bei bestrahlten Proteinen Ringbildungen gefunden worden, wie sie bei der Pyrolyse von

---

\* In summary, as the adverse effects noted refer almost entirely to *in vitro* studies, it is not appropriate, on the basis of these results, to make a risk assessment for human health associated with the consumption of 2-ACBs present in irradiated fat-containing foods. The genotoxicity of 2-ACBs has not been established by the standard genotoxicity assays nor are there any adequate animal feeding studies in existence to determine no-observed-adverse effect levels (NOAELs) for various alkylcyclobutanones. Reassurance as to the safety of irradiated fat-containing foods can be based on the results of the large number of feeding studies carried out with irradiated foods which formed the basis for the wholesomeness assessments of irradiated foods published hitherto by WHO/FAO/IAEA2 and the acceptance of the safety of the technology under appropriate conditions by the Committee in its Report on Food Irradiation<sup>3</sup>.

Aminosäuren und Proteinen vorkommen und zu mutagenen / karzinogenen Verbindungen, wie heterozyklischen Aminen, führen (Strahlen Chemie Elias, PS. 1983).

Nach der Bestrahlung von Lebensmitteln wurden nur sehr geringe Veränderungen von Proteinen beobachtet. Im Gegensatz zu den Ergebnissen der Modellversuche mit den einzelnen Proteinen werden bei der Bestrahlung von Lebensmitteln die Proteine kaum angegriffen, da sich die zahlreichen Inhaltstoffe gegenseitig schützen. Die Zerstörung von Aminosäuren ist äußerst gering. Daher wird die biologische Wertigkeit praktisch nicht verändert (Diehl JF. et al. 1991). Eine Darstellung der Proteinoxidation durch Bestrahlung verdeutlicht eine Abbildung im Anhang, ähnlich den möglichen strahlungsausgelösten Radikalen wie peroxy ( $\text{ROO}^*$ ), alkoxy ( $\text{RO}^*$ ) and hydroxyl ( $\text{HO}^*$ ) Radicale, die in einer Wechselwirkung in Kettenreaktion mit Aminosäuren eintreten.

Die schwefelhaltigen Stoffe sind von besonderer Bedeutung für die Ausprägung von Geruchsveränderungen. Die Abspaltung der Bruchstücke kann durch Bestrahlung bei Gefriertemperatur verringert werden. Dies führt zu einer besseren Qualität (Wierbicki E 1981).

### **1.3.6 Biologische Veränderung**

#### **1.3.6.1 Mikrobielle Veränderung**

Je höher eine biologische Gattung entwickelt ist, desto geringere Dosen können zu einer Schädigung führen. Während eine Ganzkörperdosis von nur 6 Gy beim Menschen zum Tode führt, sind zur Eliminierung widerstandsfähiger Mikroorganismen 25-50 kGy erforderlich (Hyer et al. 1991).

Die meisten Erreger von Lebensmittelvergiftungen beim Menschen (Salmonellen, Staphylokokken, Campylobakter usw.) sind strahlensensitiv. Jedoch sind sporenbildende Mikroorganismen meist resistenter gegen Bestrahlung (WHO 1991).

Unabhängig von der Anzahl der Mikroorganismen im Lebensmittel kann ein gewisser Anteil der mikrobiellen Population durch bestimmte Strahlendosen abgetötet werden. Durch die Bestrahlung werden die unterschiedlichen verderbensbedingten sensorischen Veränderungen von Geruch, Geschmack und Aussehen nicht verdeckt.

Daher müssen auf diese Art behandelte Lebensmittel ebenso wie durch andere Methoden konservierte Erzeugnisse nach dem Verfahren hygienisch gehandhabt werden, um frühzeitiges Verderben oder Rekontamination dieser Produkte zu vermeiden. Bereits vorhandene Mykotoxine oder bakterielle Toxine sind gegen Bestrahlung sehr resistent, so dass für ihre Zerstörung eine Strahlendosis benötigt würde, die für die Lebensmittelbestrahlung ungeeignet wäre (Elias 1992).

#### **1.3.6.2 DNA- und RNA-Veränderungen**

Hohe Makromoleküle wie DNA und RNA sind Träger von Erbinformation in tierischen und pflanzlichen Zellen.

DNA-Moleküle sind sehr groß im Vergleich zu anderen Molekülarten und reagieren somit empfindlicher auf Bestrahlung. Strahlenbedingte Veränderungen wie Veränderungen der Pyrimidin- oder Purinbasen, Strangbrüche, Bindung zusätzlicher Quervernetzung und Verbindungen kann Auswirkungen auf den gesamten Stoffwechsel der Zelle haben, da eine fehlerhafte Codierung sich sowohl bei der Synthese neuer DNA als auch bei der Protein-Translation ergibt und zu veränderten Molekülen führt, deren Funktionsfähigkeit erheblich beeinträchtigt sein kann (Gensik 1988, Diehl 1995).

#### **1.3.7 Veränderungen des Nährwertes**

Die komplexe Zusammensetzung der Inhaltstoffe von Lebensmitteln bewirkt einen gegenseitigen Schutz vor möglichen Schädigungen, die durch Bestrahlung entstehen können. Dies zeigt sich dadurch, dass einzelne Inhaltstoffe in verdünnter wässriger Lösung eindeutige Schädigungen aufweisen und in Folgeprodukten zersetzt werden.

Die für den Nährwert der Lebensmittel entscheidenden Bestandteile wie Proteine, Kohlenhydrate und Lipide werden daher bei den für die Lebensmittelbestrahlung in Frage kommenden Dosen nur wenig verändert. Es kommt weder zu einem signifikanten Verlust an essentiellen Aminosäuren, noch werden die Verdaulichkeit und der biologische Wert der Proteine verändert (Ehlermann 1998).

Mineralstoffe und Spurenelemente reagieren auf alle Behandlungen einschließlich Bestrahlung (Anon1994). Einige Vitamine (Riboflavin, Niacin, Vitamin D) sind relativ

widerstandsfähig gegen Bestrahlung; andere Vitamine wie Vitamin A, B1, E, K, sind leichter zerstörbar. Letztendlich ist die Bedeutung des durch die Bestrahlung verursachten Vitaminverlustes abhängig von der Wichtigkeit der Nahrung als Vitaminquelle der Ernährung (Diehl et al. 1991).

## 1.4 Zielsetzung

Zahlreiche Erkrankungen und Komplikationen sowie mikrobielle Toxikationen werden bei Konsumenten durch den Verzehr von unzureichend kontrollierten Nahrungsmitteln, durch Einnahme eines präparierten Nahrungsergänzungsmittels oder eines Arzneimittels hervorgerufen.

Phytopharmaka, zu denen Knoblauchpräparate als wichtigste Vertreter für die Prävention und Heilung diverser Gesundheitsprobleme zählen, sind einer strengen, vom Gesetzgeber vorgeschriebenen Qualitätskontrolle unterworfen. Die Wirksamkeit und die Unbedenklichkeit eines Pharmakons müssen bewiesen und belegt werden. Nicht anders verhält es sich bei Nahrungsergänzungsmitteln, wie eiweißangereicherten Pulvern und anderen Präparaten unterschiedlicher Formulierungen.

Deshalb wächst in der Lebensmittel- und Pharmaindustrie sowie in der Bioprozessanalytik der Bedarf an Qualitätskontrollen und Bestimmungsverfahren mit höherer Selektivität, Empfindlichkeit, Genauigkeit und Zuverlässigkeit.

Eins der Ziele dieser Arbeit war deshalb die Entwicklung eines schnellen, spezifischen und empfindlichen Bestimmungsverfahrens, nämlich des späteren sogenannten Biosensors mit fluorimetrischer Detektion, welcher durch ein Fördersystem (FIA) unterstützt werden und der sowohl bei Lebensmitteln als auch bei klinisch relevanten Analysen einsetzbar sein sollte.

Der FIA-Biosensor sollte eine schnelle Bestimmung der vorkommenden Cysteinsulfoxide und deren medizinischer Relevanz als Vorstufen der bioaktiven Thiosulfinate in dem bedeutenden Pharmakon Knoblauch<sup>1</sup> ermöglichen. Eine klassische Bestimmung durch HPLC als Vergleichs-Auswertungsmethode sollte zur Bestätigung der FIA-Analyse herangezogen werden.

---

<sup>1</sup> 1. Klasse *Liliopsida*; 2. Unterklasse *Liliidae*; 3. Überordnung *Lilianae*; 4. Ordnung *Amaryllidales*; 5. Familie *Alliaceae*; 6. Unterfamilie *Allioideae*; 7. Stamm *Allieae*; 8. Gattung *Allium* (Fritsch 2002).

Um eine Auskeimung und Infektionen von Pilzen und anderen schädlichen Mikroorganismen zu minimieren bzw. komplett zu verhindern, wird Knoblauch als Ausgangsmaterial für Knoblauchpräparate (Öl, Tabletten u.ä.) wie für andere Lebensmittel einer Behandlung mit ionisierender Strahlung unterworfen. Deshalb war auch die Untersuchung des Einflusses der ionisierenden Strahlung auf die gesamten Cysteinsulfoxide in Knoblauch sowie auf die Alliinaseaktivität in dieser Arbeit von großem Interesse.

Um die Auswirkung einer Bestrahlung auf Knoblauch zu untersuchen, wurde zur Kontrolle eine bewährte DNA-Scanmethode zum Einsatz gebracht, nämlich der „Comet Assay“ (Mikrogelelektrophorese).

Nicht weniger bedeutend für den menschlichen Organismus (u.a. bei Sportlern und Schwangeren aufgrund des erhöhten Bedarfs) sind erwiesenermaßen reine Proteine sowie proteinangereicherte Supplemente und Konzentrate, die u.a. durch Bestrahlung konserviert werden. Der Nachweis des Bestrahlungseinflusses auf Eiklar stellte nach wie vor eine Herausforderung und damit das zweite Hauptziel der vorliegenden Arbeit dar. In diesem Sinne galt es, die Auswirkungen der Bestrahlung in einem Modellversuch an verschiedenen Eiklar-Varietäten zur Sicherung der Qualität von proteinhaltigen Lebensmitteln nachzuweisen. Da noch keine standardisierte Nachweismethode existiert, lag die Notwendigkeit der Entwicklung einer einfach durchzuführenden Routinekontrollmethode auf der Hand.

Dieses Ziel sollte vor allem mit Hilfe der Kapillarelektrophorese als neuer und schnellerer Analysetechnik angestrebt werden; es gelangten aber auch andere zeitsparende Scantechniken wie die Infrarotspektroskopie zum Einsatz.



## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Biosensorik**

#### **2.1.1 Gewinnung der Alliinase**

Da in der Pflanze Substrat und Enzyme durch Zellmembranen getrennt sind, müssen für eine Enzymgewinnung die Zellwände zerstört werden. Gleichwohl muss das Enzym durch ein geeignetes Verfahren nativ bzw. intakt erhalten bleiben.

Im Rahmen dieser Studie wurde die Alliinase aus den Knoblauchproben nach der Methode von Koch und Lawson (1996) isoliert, die u. a. auf der alten Methode von Rabinkov A. und Zhu X. (1994) basiert. Da verschiedene Verarbeitungsformen von Knoblauch zur Extraktion verwendet wurden, stellte sich heraus, dass getrockneter Knoblauch, sei es in Form von Pulver oder von Chips, eine größere Ausbeute an Alliinase ergab als frischer Knoblauch. (Tab.3.13).

##### **2.1.1.1 Extraktion aus Frischmaterial**

Für die Gewinnung der Alliinase wurden frische Pflanzenmaterialien von 1 bis 3 g genau abgewogen, geschält, gesäubert und mit 10 ml Phosphatpuffer „Alliinase-Vollpuffer“ bei 4°C (60 mM, pH 7) in einem eisgekühlten Mörser zerkleinert. Eine Spatelspitze Seesand wurde hinzugegeben und bis zur Homogenität zermörsert. Das Homogenisat wurde bei 10000 g für 35 min bei 4 °C zentrifugiert.

In einem Dialyseschlauch (SERVAPOR® - Dialyseschläuche; Dialysis tubing 44144; 21 mm Durchmesser; Protein-Ausschlußgröße 10 kDa) wurde der Überstand nach dem Zentrifugieren sorgfältig überführt und in Dialyse-Puffer bei 4°C gegen 5 Liter Alliinase-Dialysepuffer über Nacht (12 Stunden) dialysiert.

Anschließend wurde je nach Einsatz das Dialysat in 1 ml-Volumina portioniert und direkt verwendet oder für eine spätere Verwendung bei – 20 °C eingefroren.

Ein Auftauen für eine spätere Ansetzung des Dialysates wurde schrittweise vorgenommen, indem man es erst bei 4 °C für 12 Stunden belassen und dann möglichst bei Temperaturen unter 20 °C verwendet hat.

Die verwendeten Chemikalien und Puffer-Lösungen für die Extraktion sind in der Tabelle (2.1) aufgeführt.

**Tabelle 2.1 Puffer Lösungen für Gewinnung der Alliinase als Rohextrakt aus Knoblauch**

Bezeichnung	Bestandteile		Herstellung
Alliinase-Dialysepuffer	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	17,7 g	H <sub>2</sub> O auf 5 L
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O	36,3 g	
	Saccharose	500 g	
	NaCl	50 g	
	P-5`-P	132 g	
	Natriumazid	1 g	
Sörensen-Puffer (60mM) Phosphatpuffer	Phosphatpuffer pH 7,0 [60 mM] 100 ml	Thimerosal/Nateriumazid 0,2 g	H <sub>2</sub> O auf 1 L
Phosphatpuffer pH 7 600 mM (10 x)	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	35,4 g	H <sub>2</sub> O auf 1 L
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	72,52 g	
Alliinase-Vollpuffer	Saccharose	500 g	H <sub>2</sub> O auf 5 L
	NaCl	50 g	
	P-5`-P	132 g	
	Natriumazid	1 g	
	10x Sörensen-Puffer	500 ml	

### 2.1.1.2 Extraktion aus Trocken-Knoblauch (Chips, Granulat, Pulver)

Die getrockneten Knoblauchverarbeitungsformen konnten einfacher aufgearbeitet werden als frischer Knoblauch. Zwischen 0.5 und 1 g wurde je nach Variante abgewogen.

Die Aufarbeitung wurde hierfür genau so gehandhabt wie beim frischen Knoblauch.

Da die hinzugegebene Menge von Alliinase-Vollpuffer (10 ml) recht klein war im Verhältnis zur Probenmenge, wurde von den 10 ml immer jeweils ein Teil zum Nachspülen zurückbehalten. Alle Varietäten wurden von der Firma Finzelberg, Germany, geliefert.

## 2.1.2 Bestimmung der Proteinkonzentration und der Alliinase-Aktivität

Die Bestimmung der Proteinkonzentration könnte nach zwei verschiedenen bekannten Methoden durchgeführt werden, nämlich nach Lowry (1951) oder nach Bradford (1976).

In dieser Arbeit wurde die Konzentration des Proteines nach Lowry (Lowry et al. 1951) bestimmt, weil es sich hier um ein Glykoprotein handelt, welches von der Methode nach Bradford Comasie brilliant Bleu G2-250 nicht vollständig erfasst werden könnte.

### 2.1.2.1 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Lowry

Die Lowry-Methode basiert auf der Biuret-Reaktion, also der Bildung eines Komplexes zwischen den Proteinen und dem  $\text{Cu}^{2+}$ , wobei sich eine blaue Färbung ergibt. Gibt man Folin-Ciocateus-Reagenz, ein Phosphorsäuregemisch aus Wolframat und Molibdat, zu diesem Cu-Protein-Komplex, so können einige Aminosäuren vom Wolframat/Molibdat oxidiert werden. Dabei entsteht ein Gemisch aus verschiedenen intensiv blau gefärbten Verbindungen mit einem Absorptionsmaximum von 540 nm.

#### Ausführung

Folgende Lösungen wurden zuerst vorbereitet:

Lösung 1: 16 ml Lowry A (10g  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 2 g NaOH ; in 100 ml  $\text{H}_2\text{O}$ )

800  $\mu\text{l}$  Lowry B (100 mg  $\text{Cu}_2\text{SO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ ; in 10 ml)

800  $\mu\text{l}$  Lowry C (200 mg K-Na-Tartarat; in 10 ml  $\text{H}_2\text{O}$ )

Lösung 2: 5 ml Folin-Ciocalteus-Reagenz in 50 ml  $\text{H}_2\text{O}$  [Firma Merck]

Ebenso bewährte sich folgende Verdünnungsreihe der Knoblauchproben:

5-fach (100 Probe + 400  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$  )

10-fach (60  $\mu\text{l}$  Probe +540  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$  )

20-fach (300  $\mu\text{l}$  Verdünnung Nr.2 +300  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$ )

50-fach (300  $\mu\text{l}$  Verdünnung Nr.3 + 450  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$ )

100-fach (300  $\mu\text{l}$  Verdünnung Nr.4 + 300  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$ )

200-fach (300  $\mu\text{l}$  Verdünnung Nr.5 + 300  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$ )

400-fach (300  $\mu\text{l}$  Verdünnung Nr.6 + 300  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$ )

Zuerst wird eine Kalibrationsgerade von einer BSA-Stocklösung der Konzentration 1, 10, 20, 30, ..... 90, 100 µg/µl erstellt. Man pipettiert die einzelnen Konzentrationen jeweils in Einwegküvetten und füllt auf 100 µl mit destilliertem Wasser auf. Ebenso wurden wieder Blindproben je 100 µl dest. Wasser vorbereitet.

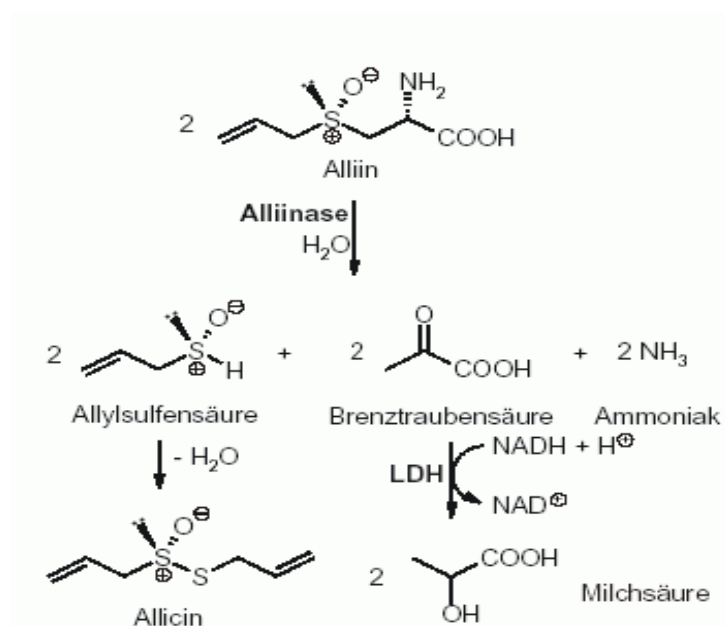
Nun wurden in eine Küvette 100 µl unverdünnten Extrakts gegeben. Weitere 7 Küvetten wurden mit je 100 µl der Verdünnungsschritte 1-7 befüllt.

In alle Küvetten wurden nun 335 µl von Lösung 1 gegeben und durchgemischt.

Nach 15 Minuten wurde zu jeder Probe 1 ml Lösung 2 zupipettiert und wieder durchgemischt.

Nach weiteren 45 Minuten wurden die Proben photometrisch bei 590 nm gemessen; die Errechnung der weiteren Proteinkonzentration erfolgte mit dem Microsoft Excel-Programm.

### 2.1.2.2 Bestimmung von Alliinase-Aktivität



Um die Alliinaseaktivität zu bestimmen, wurde der Verbrauch des NADH vermessen, der für die Umsetzung der Brenztraubensäure ins Laktat benötigt wird.

Ein Pyruvat entsteht wiederum erst bei der Umsetzung des Alliin mit der Katalysierung von der Alliinase (Abb. 2.1).

**Abb. 2.1** Alliinase Reaktion und NADH - Verbrauch. Bei 340 nm wurde photometrisch die NADH Abnahme vermessen, wobei ein Mol Pyruvat ein Mol NADH benötigt.

Hierfür wurde LDH und NADH in Überschuss zu einer Alliin / Alliinase-Mischung gegeben und die Geschwindigkeit des NADH-Verbrauchs, sprich die

Geschwindigkeit der Pyruvatbildung, gemessen. Aus dieser Messung kann man die Geschwindigkeit der Alliin-Alliinase-Reaktion bestimmen.

### Ausführung

Am Spektrophotometer (Kontron, Uvikon 820) wurden folgende Einstellungen vorgenommen:

Papierschub (Chart speed): 1 cm/ min.

Empfindlichkeit (rec scale): 1 bis 2, je nach Aktivitätsgrad oder Verdünnung des Extraktes. Wellenlänge: ( $\lambda$ ) 340 nm (Abs. Maximum von NADH).

Die Küvettemperatur wurde über einen Kryostaten (MGW Lauda K4R Electronic) auf 25 °C eingestellt.

In zwei Quarzglasküvetten wurden jeweils

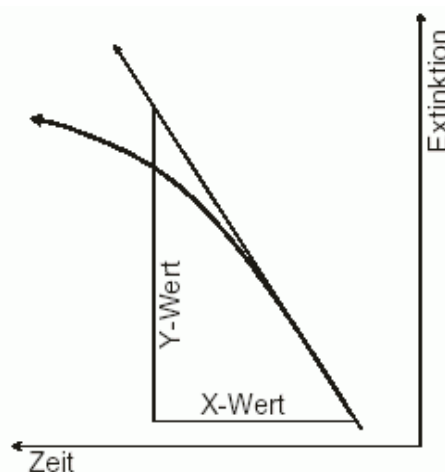
- 800  $\mu$ l Phosphatpuffer pH 7 (60 mM Soerensen-Puffer)
- 50  $\mu$ l NADH (6 mg/ ml; Sigma)
- 50  $\mu$ l LDH (18,5 U, Sigma)
- 50  $\mu$ l Alliinase Lösung

gegeben, durchgemischt und 2-4 Minuten im Spektrophotometer temperiert.

Da hier eine Abnahme bzw. ein Verbrauch des NADH vermessen wird, wird die Küvettenposition im Spektrophotometer so gewählt, dass je nach Polarisierung des Schreibers (Uvikon Recorder 21) positive Werte aufgenommen werden.

Zum Volumenausgleich werden nun 50  $\mu$ l Sörensenspuffer in eine der Küvetten eingefüllt, in die zweite werden 50  $\mu$ l vom Substrat (4 $\mu$ M racemisches Alliin) gegeben, sofort durchgemischt und die Starttaste betätigt.

Die Messungen dauerten ca. 2-5 Minuten bis Schreibvollausschlag. Der Verlauf und die Auswertung sind in Abbildung 2.2 dargestellt. Beim Auftreten eines



**Abb. 2.2** Tangentenverfahren

Schreiberausschlags wurde die Alliinaselösung um den Faktor 10 mit Vollpuffer verdünnt (200 µl Alliinaselösung in 1800µlVollpuffer).

### Auswertung

Die Enzymaktivität wird nach einer dem Lambert-Gesetz abgeleiteten Formel berechnet:

$$A_s = VF \cdot V_k / \epsilon \cdot d \cdot V_p \cdot C_{\text{prot}} \cdot \Delta E / \Delta t \quad [\mu\text{M} / \text{min} \cdot \text{mg}] \quad \text{Gleichung (1) wobei}$$

$A_s$  spezifische Aktivität

$VF$  Küvettenvolumen (1 ml)

$\epsilon$  NADH molarer Extinktionskoeffizient bei 340 nm ( $6,22 \text{ cm}^2 / \mu\text{M}$ )

$d$  Schichtdicke der Küvette (1 cm)

$V_p$  eingesetztes Probenvolumen (50 µl)

$C_{\text{prot}}$  Proteinkonzentration [mg/ml]

$\Delta E$  Absorption

$\Delta t$  Zeit [Minute].

Um den Term  $\Delta E / \Delta t$  zu ermitteln, wird eine Tangente an die Anfangssteigung angelegt, aus dem Schreiber Ausdruck werden die X- und Y-Werte berechnet und in die Gleichung 2 eingesetzt.

$$\Delta E / \Delta t = RS \cdot Y / MS \cdot X \quad \text{Gleichung (2), wobei}$$

$RS$  Schreiberempfindlichkeit (Rec Scale)

$MS$  maximaler Ausschlag (25 cm)

$X/Y$  Seitenlänge des Steigungsdreiecks jeweils in X/Y-Richtung (Y-Werte in Schreibervorschubsrichtung) ist.

Bei einer Schreibervorschubsgeschwindigkeit von 1 cm/min werden die X- und Y-Werte auch in cm ausgemessen, zusammengefasst und für die Berechnung der spezifischen Aktivität  $A_s$  in Gleichung 3 eingesetzt.

### **2.1.2.3 Die spezifische Aktivität: Berechnung, Umrechnung.**

$$A_s = VF \cdot RS \cdot Y / 7,775 \cdot X \cdot C_{\text{prot}} \quad [\mu\text{M} / \text{min} \cdot \text{mg}] \quad \text{Gleichung (3)}$$

Für die Umrechnung der Aktivitätseinheit in [nKat/mg] muss die Einheit in Gleichung 3 mit 16,67 multipliziert werden.

$$[\mu\text{mol} / \text{min} \cdot \text{mg}] \cdot 16,67 = [\text{nKat} / \text{mg}] \quad \text{wobei } [\mu\text{mol} / \text{min} \cdot \text{mg}] = [\text{U} / \text{mg}].$$

### 2.1.2.4 Bestimmung des pH / Temperatur-Optimums

Für die Bestimmung des Temperatur-Optimums wurde das gleiche Verfahren angewandt wie in den oben beschriebenen Schritten zur Bestimmung der Aktivität. Während für die Bestimmung des Temperaturoptimums lediglich die Temperatur variiert und alles andere fixiert wurde, wurde bei der Bestimmung des pH-Optimums der pH-Wert des Phosphatpuffers (Soerensen) zwischen pH 3- 7 variiert.

### 2.1.2.5 Michaelis-Menten Kinetik

Bei welcher Substratkonzentration würde die Zunahme der Geschwindigkeit der Enzym-Substrat-Reaktion zu einem Sättigungsgrad kommen?

Hierfür hilft die Michaelis-Menten Gleichung (4)

$$V = V_{\max} [s] / K_m + [s] \quad \text{Gleichung (4)}$$

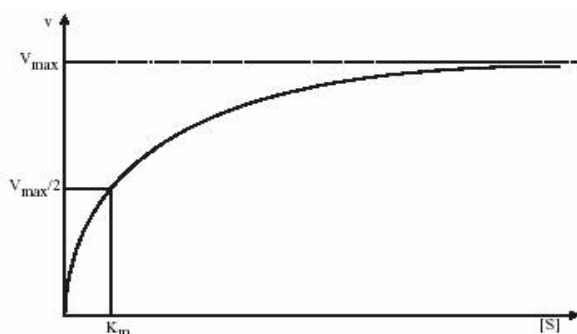
$V_{\max}$  der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit

$K_m$  lässt sich in diesem Fall von dem  $(K_1 + K_2) / K_1$  ableiten, wobei

$K_1$ ,  $K_2$  Geschwindigkeitskonstanten sind für die Bildung des Enzym-Substrat-Komplexes und jeweils der erneuten Freisetzung des Enzyms. Dies soll wie folgt veranschaulicht werden:



Komplex.

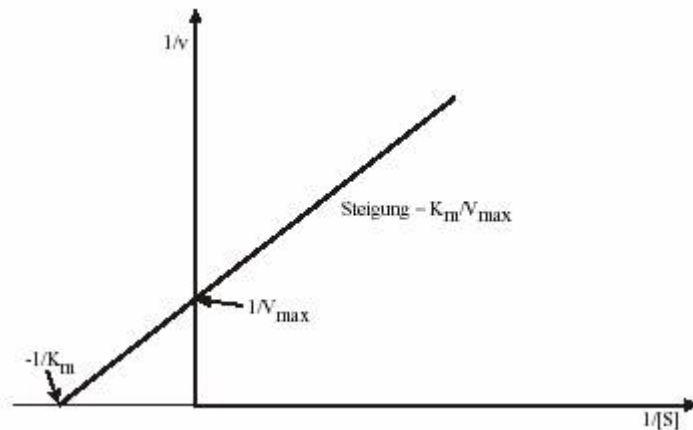


**Abb. 3.3** Michaelis-Menten- Kurve

$K_{-1}$  Geschwindigkeitskonstante der Rückreaktion des Komplexes zu Substrat und Enzym. Eine Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Substratkonzentration, vertreten durch  $K_m$  und  $V_{\max}$ , ergibt die sogenannte Michaelis-Menten-Kurve Abbildung 3.3, Gleichung (

4 ) Bestimmt man theoretisch die Hälfte der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit, wird die  $K_m$  entsprechend von der Konzentrationsachse (X) (Abb. 3.3) abgelesen und  $v$  aus der Michaelis –Menten-Gleichung berechnet.

Praktisch sind die Sättigungskonzentration sowie  $V_{\max}$  nicht erreichbar. Deswegen stellt man die Messwerte der sogenannten Reziproken der Aktivität gegen die Reziproken der Substratkonzentration in linearer Form, nämlich im Lineweaver-Bruk-Diagramm, Abb. 2.4, dar.



**Abb. 2.4** Lineweaver-Bruk-Diagramm

der Y-Achse, während die Steigung der Gerade aus  $K_m/V_{\max}$  berechnet wird.

Nach der sogenannten doppelten reziproken Auftragung verlängert man die erstellte Gerade bis zum Schnittpunkt  $-1/K_m$ , der als negativer reziproker  $K_m$ -Wert bezeichnet wird.

Die reziproke maximale Aktivität ( $V_{\max}$ ) ergibt sich aus dem Schnittpunkt mit

### 2.1.3 Fluorimetrische Bestimmung des Ammoniaks mittels der Durchfluss-Injektions- Analysenanlage ( FIA )

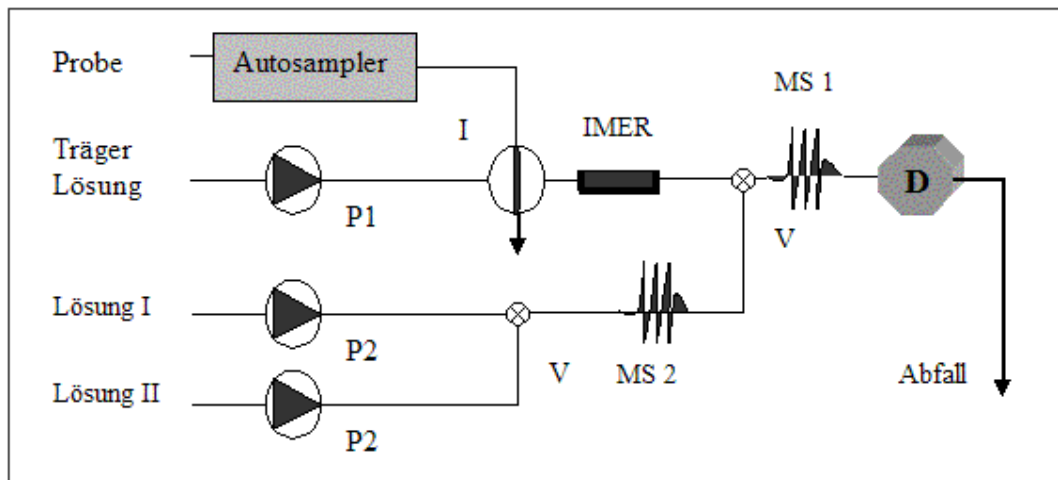
In dieser Arbeit wurde für die Bestimmung des gesamten Gehalts an Cysteinsulfoxiden in *Allium*-Arten („Lauchgewächse“) eine Durchfluss-Injektions-Analysenanlage (Flow Injection Analyser; FIA) eingesetzt.

Der Gehalt an Cysteinsulfoxiden [CS] lässt sich durch fluorimetrische Bestimmung des durch Alliinase frei werdenden Ammoniaks ermitteln.

Die eingesetzte Analysenanlage kann in vier Einheiten unterteilt werden (Abb. 2.5):

- 1- Pumpen
- 2- Autosampler
- 3- Haupteinheit
- 4- Datenerfassungseinheit



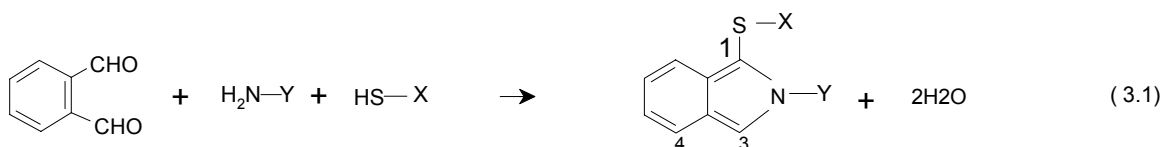


**Abb. 2.5** : Schematische Darstellung des Flow Injection Analysers .P 1-2: Pumpen, I: Injektionskammer, V: Verbindungsschleife, MS: Mischschleifen, IMER: Immobilisenzymreaktor, D: Detektor

### 2.1.3.1 Erläuterung des Mechanismus der FIA- Anlage

Ein Autosampler entnimmt aus im Rack stehenden 5 ml Plastikröhrchen die Probe und sie in die 40 µl Injektionsschleife (6 Wegventil I) führt. Das Ventil I ist so geschaltet, dass nur das gewünschte Volumen gehalten wird und der Rest in den Abfall abgeleitet wird. Während der Führung der Probe zur Injektionskammer wird das Puffersystem (15 mM OPA; 60 mM Thioglicolat Lösung I; 0,8M Boratpuffer pH 12-Lösung II) mit 0,07-0,1ml/min unter Verwendung einer peristaltischen Pumpe P2 transportiert und 1:1 in der Mischschleife MS2 (gehäkelte Schlauchschleife) gemischt, wobei das alkalisierte OPA mit dem entstehenden Ammoniak reagiert. Dabei wird das Ammonium im Enzymreaktor IMER gebildet.

Die Trägerlösung (Wasser/ Puffer) transportiert das Probenvolumen je nach Bestimmung in den Enzymreaktor **IMER** [Innenvolum 150 µl], wo die Umsetzung des Substrats vonstatten geht, und führt das entstehende Produkt nach MS1 (Mischen) mit dem Detektionspuffer zum Detektor weiter. Die zu detektierende Substanz (Isoindolderivat; siehe 3.1) wird mit der Trägerlösung weiter in den Detektor (20 µl Durchflusszelle) geleitet, wo die Detektion stattfindet.



X: H oder R  
Y: H oder R'

1-( Alkyl) thio-2-(alkyl )-  
substituiertes Isoindol

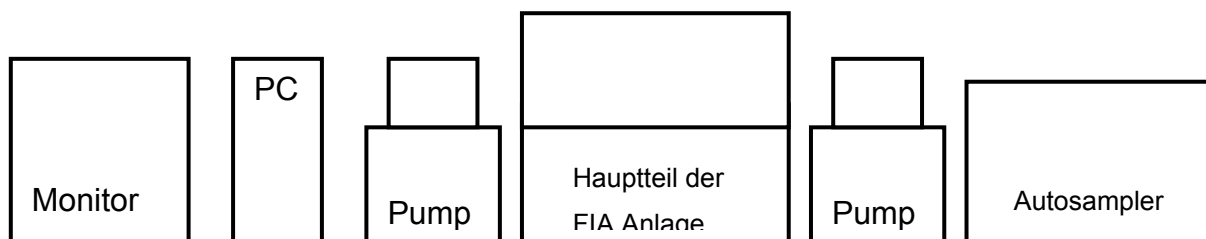
**Chemische Darstellung der fluorimetrischen Detektion im FIA-Analysesystem.**

O-Phtalaldehyd reagiert mit primärem Amin in alkalischem Medium in Anwesenheit von reduzierender Schwefelverbindung (Mekaptoethanol) und ergibt die fluoreszierende Substanz [1-(Alkyl) thio-2-alkylsubstituierte Isoindolderivate] (Reaktion 3.1), (Garcia Alvarez-Coque, M.C. et al 1989).

Das Isoindolderivat lässt sich bestens bei 415 nm anregen, wobei die Emission jedoch erst bei 485 nm liegt (siehe Abb. 1.4 Einleitung). Die Ausbeute an Fluoreszenz wird dann durch den Fluoreszenzdetektor erfasst und in späteren Schritten aufgezeichnet und bewertet.

### 2.1.3.2 Apparatur

Eine schematische Darstellung der Anlage könnte wie in (Abb. 2.6) aussehen.



**Abb. 2.6** Apparatur der eingesetzten FIA Anlage

Es folgt eine Zusammenstellung der Apparatureinheiten und ihrer Herkunft:

- Fluoreszenzdetektor SFM-25(Kontron, Milano, Italy); 20 µl Durchflusszelle
- Autosampler 232-401 mit Software V 3.1 (Gilson Medical Electronix France)
- PTFE ID 0.5 mm–Schläuche (Tygon®, Germany)
- 4x15 Aluminium-temperierbares Rack B49462 cod 32 (Tygon Germany)
- 45 µl Probenvolumen Injektionsschleife (Tygon Germany)
- (MS1,MS2) gehäkelte PTFE – Schläuche (Polytetrafluoroethlen); (Tygon; Germany)
- IMER Enzymreaktor, in Abb. 3.8 beschrieben. (Die Bestandteile wurden über Projektpartner geliefert bzw. eigens angefertigt; Institut für Technische Biochemie e.V., Kurt Mothesstr.3, 06120 Halle an der Saale, Germany)
- Orange-Gelb Tygon 0.51 mm Innendurchmesser mit Reiter-Schläuchen
- Ventil von der Firma MFAVALCO MFA-Module (Germany)

- MFA Software für Windows 98, V0.8 (Dataviewer, Methodeneditor, Methodentest, htm).
- Miniplus 3 Pumpen (Gilson, France). Flussrate: Standard-Flussrate (1, 2, 4, oder 8 Channels): 0,3  $\mu\text{L}/\text{min}$  bei maximalem Druck 0.5 MPa.

Höchstflussrate (2 oder 4 Channels): 0,1 ml/min-220 mL bei Max. Druck 0.3 MPa. Eingesetzt wurde Miniplus 3 mit 4 Channels.

Die Rotationsgeschwindigkeit konnte von 0 bis 48 U/min durch 0.01 U/min Stufensprünge bis zu 9.99 U/min und durch 0.1 U/min Stufensprünge über 10 U/min eingestellt werden. **Compact Design:** 15 cm x 17.5 cm x 18 cm (W x D x H); lightweight.

Power requirements: Frequency: 47–63 Hz Voltage: 90–132 or 180–264V; main voltage fluctuations not to exceed  $\pm 10\%$  of the nominal voltage consumption: Full load 45W at 220V; no load 35W at 220V



**Abb. 2.7** Peristaltische Pumpe mit einem Einbahnkopf (Mitte), Pumpenkopf (links), Kopfschema (rechts).

Die Pumpen waren ein Hauptbestandteil dieser Anlage, da der Durchfluss aller Lösungen in der Anlage lediglich durch das eingesetzte peristaltische Pumpensystem ermöglicht wurde.

In der Abb. 2.7 wird ein Überblick über das Pumpprinzip der Schlauchpumpen schematisch vermittelt. Das Abdrücken oder Abquetschen eines flexiblen Pumpenschlauchs erfolgt an einer oder mehreren Stellen und durch Bewegung der abgedrückten Stelle in gewünschter Förderrichtung der Flüssigkeit. Deshalb werden die Schlauchpumpen manchmal auch Schlauchquetschpumpen oder Quetschschlauchpumpen genannt.

Die Bewegung der abgedrückten Stelle wird mit Hilfe eines Pumpenrotors realisiert, an dessen Umfang sich walzenförmige Rotorrollen befinden. Die Rotordrehzahl (Bewegungsgeschwindigkeit der abgedrückten Stelle; steht in der Methodenentwicklung Steuerprogramm) und der Schlauch-Innendurchmesser des Pumpenschlauchs bestimmen die Förderleistung.

Eine Übersicht über die FIA-Anlage wurde (Abb. 2.8) mit einer Digitalkamera im Laboratorium des Instituts für Pharmazeutische Biologie der Universität Bonn aufgenommen.



**Abb. 2.8** Aufnahme der *Durchflussanalysenanlage [FIA]*, (Autosampler mit Racks, Isolierbox enthält den Enzymreaktor [unten rechts], PC, 2 Pumpen)

### 2.1.3.3 Enzymimmobilisierung

Unter dem Begriff „Immobilisierte Enzyme“ versteht man, dass sich alle Enzyme in einem Zustand befinden, der ihre Wiederverwendung erlaubt (*Definition der European Federation of Biotechnology 1983*).

Um Enzyme bzw. biologische Komponenten zu immobilisieren und sie z.B. in biosensorischen Applikationen einsetzen zu können, braucht man einen Träger aus organischem oder anorganischem Material, an dem sie angebracht werden können. Viele Faktoren innerhalb der Reaktionsbedingungen führen in einer hier bevorzugten kovalenten Enzymbindung zu einer besseren Enzymimmobilisierung, wie z.B. pH-Wert, Ionenstärke, Konzentration gelöster Proteine (Piza N. et al. 2004). Eine

Wiederverwendung der Enzyme und somit geringerer Enzymverbrauch führt meistens zu höherer Reproduzierbarkeit und Enzymstabilität (Uhig H. 1991).

#### **2.1.3.3.1 Immobilisierung von Alliinase**

Zunächst wird Alliinase, wie oben beschrieben, gewonnen und dann entweder im Direkteinsatz (Frischmaterial) oder (bei eingefrorenem Material) nach zwei Auftauschritten verwendet. Hierbei werden die eingefrorenen Portionen der Alliinase zunächst von -20 °C bei 5°C für 12 Stunden aufgetaut und anschließend der Raumtemperatur angepasst.

Die Alliinase kann in unterschiedlichen Verfahren und an verschiedenen Trägern immobilisiert werden. Einige der Möglichkeiten sollen hier erwähnt werden:

- Immobilisierung von Alliinase an Teflon als inertes Trägermaterial und dessen Konditionierung zur Erhaltung von reaktionsfähigen funktionalen Gruppen sind umfassend bereits in den Arbeiten von Dwight und Riggs sowie Shults et al. im Jahr 1974 ausgeführt worden; Keusgen arbeitete 1999 an der Weiterentwicklung und verwendete sie bei der biosensorischen potentiometrischen Ammoniak-Elektrode. Teflon bietet auch gewisse Vorteile als Füllmaterial für Enzymreaktoren, da es unter Druck nur geringfügig komprimiert wird und somit eine hohe Robustheit aufweist.

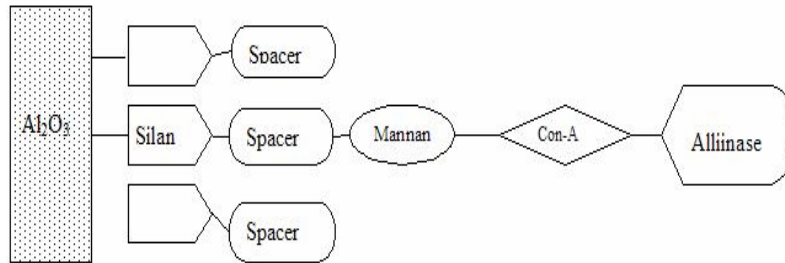
- Immobilisierung von Alliinase an Aluminiumoxid als poröser Träger (Milka et al. 2000; Weetall, 1976)

Hier hat man auch die Möglichkeit, die Alliinase bei erhöhtem Druck problemlos an einen Träger zu immobilisieren, da Aluminiumoxidmembranen im Gegensatz zu Agarose wenig verformbar ist, was sich bei einer erhöhten Druckbedingung natürlich als Vorteil bemerkbar macht. Auch so verfügen Aluminiumoxidmembranen durch eine kontrollierte Porosität bei der Herstellung über größere Immobilisierungsoberflächen und deren Vorteile.

So wurde von Keusgen 1999 Alliinase auf eine dünne Aluminiumoxidmembran mit einem Durchmesser von 13 mm mit einer Porenweite von 0,2µm immobilisiert.

Zunächst wurden die Oberflächen der Membrane mit 3-Aminopropyltriethoxysilan einseitig überzogen. Über die freie Aminogruppe konnte die Kupplung mit einem bifunktionalen Epoxid durchgeführt werden (Abb. 2.9). Am anderen Ende des Epoxides wurde mit dem Oligosaccharid Mannan bei pH 10 verethert, welches wiederum unter physiologischen Bedingungen eine mit Con-A stabile Bindung

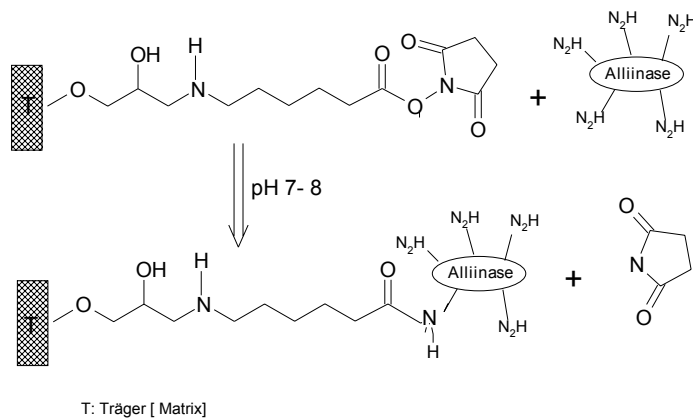
begünstigt. Das Lektin Con-A konnte über seine weiteren Bindungsstellen Alliinase fixieren.



**Abb. 2.9** Sukzessive Derivatisierung einer porösen Membran aus Aluminiumoxid als Trägermaterial

- **Immobilisierung von Alliinase an Agarose (NHS-aktivierten HiTrap<sup>®</sup>-Säulen)**

In solchen Säulen besteht das Füllmaterial aus hochgradig quervernetzten, sphärischen Agarose-Partikeln (Sephargose, Pharmacia), die wiederum über Spacer-Moleküle mit N-Hydroxysuccinimid NHS derivatisiert sind und unter physiologischen Bedingungen die Carboxylfunktion der Spacer aktivieren, um mit dem Protein über eine Säureamid-Bindung immobilisiert werden zu können (Pharmacia 1995) (Abb. 2.10).



**Abb. 2.10** Immobilisierung von Alliinase auf NHS-aktivierter Sepharose<sup>®</sup>

- ***Immobilisierung von Alliinase an Agarose Concanavalin A (Con-A).***

Nach reiflichem Abwägen und unter Berücksichtigung der Kenntnis über die oben erläuterten Möglichkeiten wurde in der vorliegenden Arbeit für den Einsatz des Enzymreaktors der Durchflussanalysenanlage selektiv das folgende Immobilisierungsverfahren ausgeführt:

Ausführung

Zunächst wurde 1 ml von der portionierten Alliinase für 12 Stunden von – 20°C auf 4 °C erwärmt, denn während des langsamen Auftauens des Enzyms bleibt seine Aktivität nahezu vollständig erhalten. Als zweiter Schritt wurde dann die Alliinase mit Con-A Lagerpuffer pH 7 um den Faktor 10 verdünnt (Tab2.2).

Das Enzymreaktorgehäuse wurde unterdessen mit dem Enzymträger luftbläschenfrei etwa 180 µl hoch befüllt, und zwar mit dem quervernetzten Lektin Concanavalin-Agarose 4%, nachdem es mit Filterpapier abfiltriert werden war (Puffer Suspension 15-30 mg Concanavalin A Protein pro mL der Fa. Sigma); anschließend wurde es von beiden Seiten mit porösen high density Polyethylen-Fritten (PTFE) eingeschlossen. Das Enzymreaktorschema ist im Ergebnis –Abschnitt veranschaulicht (Abb. 3.8). Dann wurde über eine peristaltische Pumpe mit 0,1 ml/min die 1:10 verdünnte Alliinase in den Reaktor eingebracht.

Zwecks einer vollständigen Immobilisierung wurde der enzymbeladene Reaktor 20 Minuten bei Raumtemperatur belassen. Dann wurde mit Con-A Lagerpuffer gründlich gespült, um alle ungebundene Alliinase aus dem Reaktor zu entfernen. Der Reaktor wurde daraufhin in die FIA-Anlage eingebaut oder für einen späteren Einsatz mit Con-A Lagerpuffer (Con-A Stabilität) befüllt und möglichst unter genügend Feuchte bei 4 °C aufbewahrt (Falkon Tubes).

**Tabelle 2.2 Con-A-Lagerpuffer**

Bezeichnung	Bestandteile			Herstellung
Con-A-Lagerpuffer	10x Sörensenpuffer	100	ml	Phosphatpuffer, 800 ml H <sub>2</sub> O. Salze zusammengeben, 5 min rühren, Thimerosal hinzugeben und weiter ad 5 Liter vollständig auflösen.
	NaCl	58,4	g	
	CaCl <sub>2</sub> x2H <sub>2</sub> O	147	mg	
	MgCl <sub>2</sub> x6H <sub>2</sub> O	203,3	mg	
	MnCl <sub>2</sub> x2H <sub>2</sub> O	161,8	mg	
	P-5-P	26. Jun	mg	
Thimerosal	200	mg		

Eine Regenerierung des Con-A-Trägermaterials erfolgte problemlos durch das Durchpumpen von neuer 1:10 verdünnter AlliinaseLösung.

Es besteht noch eine andere Regenerierungsmöglichkeit, nämlich eine Verdrängung der verbrauchten Alliinase mit mannosehaltiger Lösung. Dies ist aber umständlicher und wurde deshalb nicht für diese Arbeit eingesetzt.

#### 2.1.4 Fluorimetrische Bestimmung des Ammoniaks in Lauchgewächsen

Die Bestimmung von Ammonium ist eine der häufigsten Fragestellungen in der analytischen Chemie und setzt deshalb eine schnelle Analyse der oft infolge NH<sub>3</sub>-Flüchtigkeit instabilen Probenlösung voraus.

Nach der Probenaufbereitung, wie sie in den letzten Abschnitten geschildert wurde, wurde das geeignete Steuerprogramm erstellt und die Durchfluss-Analysen-Anlage in Betrieb genommen. Die Entnahme der Knoblauchproben wurde auf zwei Weisen in der Anlage gehandhabt. Dies erforderte die Erstellung zweier Steuerprogramme. Einmal wurden die Proben jeweils einzeln in das Gerät gegeben (siehe Tab.3.1 Ergebnis).

Zum anderen wurden sie nach einem Automatisierungsschritt aus einem temperierbaren 4x15 Aluminium-Rack entnommen (Tab.3.3, Ergebnis sowie Abb. 2.8)

##### 2.1.4.1 Probenaufbereitung für biosensorische Ammoniak-Bestimmung

Für die fluorimetrische Ammoniakbestimmung mit Hilfe der relativ neuen Analyseverfahren „Durchflussanalysenanlage“ wurden die Proben dem einfachen Aufbereitungsverfahren unterzogen, welche bei dieser Art von Analysensystem



bevorzugt wird. Im Folgenden wird über die Aufbereitung des eingesetzten Pflanzenmaterials berichtet.

#### **2.1.4.1.1 Pflanzenmaterial:**

*Allium sativum* L. wurde in der vorliegenden Arbeit in unterschiedlichen Verarbeitungsformen (Varietäten) untersucht: als Pulver, Granulat, Chips und frische Knoblauchzehen. Die verschiedenen Knoblauchvarietäten wurden von der Firma Finzelberg, Germany, zur Verfügung gestellt:

- Knoblauchpulver: (Artikel. 0105800; Bulbus Allii Sativi, Pulvis ; Charge 99 52 0006)
- Knoblauch-Granulat:(Artikel. 0105801; Bulbus Allii Sativi, Granulat; Charge 99 57 0001)
- Knoblauch-Granulat: (Artikel. 210 50 10 Bulbus Allii Sativi, Chips; Charge 02110487)
- frische Knoblauch-Zwiebeln wurden bezogen aus dem Plus-Markt, Bonn, Bezeichnung: Klasse I, Kal: 45-60 mm, 46.824Quesa,Valencia/Spanien.

##### **2.1.4.1.1.1 Knoblauch–Probenaufbereitung**

- aus **frischem** Knoblauch:

Als frischer Knoblauch werden nachfolgend Knoblauchzehen bezeichnet, die keinen Verarbeitungs- oder Bearbeitungsprozessen unterlagen, mit Ausnahme des Erntens. Sie wurden entweder frisch auf dem Markt beschafft oder waren bereits gelagert, bevor sie für die Analyse geliefert worden sind.

In der vorliegenden Arbeit wurden Knoblauchproben des Projektpartners vom Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung [Gatersleben/ Germany; [www.ipk-gatersleben.de](http://www.ipk-gatersleben.de)] sowie der Bundesanstalt für Züchtungsforschung an Kulturpflanzen [[www.bafz.de/ipa](http://www.bafz.de/ipa)] herangezogen. Dieser Knoblauch wurde mit der Gaterslebener *Allium* Akk-Nr. mit dem in Klammern angefügten Erntemonat und Jahr bezeichnet. Ein Teil der Lieferung wurde gleich nach Eingang aufgearbeitet und analysiert; der Rest wurde zur sofortigen Entfernung der überreifen Teile bei 1°C bis zur weiteren Probenanalyseaufbereitung aufbewahrt.

Die Aufbereitungsknoblauchzehen wurden schonend gehandhabt, denn eine mögliche Verletzung oder Zerquetschung der Knoblauchzehen hätte eine

enzymatische Freisetzung des Ammoniaks katalysieren können (siehe Aliinase-Alliin Reaktion Abb. 1).

Nach Säuberung und Befreiung der Knoblauchzehen von unerwünschten Fremdbestandteilen wurden 0,4- 0,8 g genau abgewogen und sofort in einen bereits mit 20 ml MeOH gefüllten Rundkolben (Kegelhülse-100 oder 250 Rundkolben Artkl. 9011840) gegeben. Es wurde bei der Entnahme der gewünschten Abwage berücksichtigt, dass möglichst homogene Teile der identischen Stelle aus den verschiedenen Knoblauchzehen mit einem scharfen Messer herausgeschnitten wurden.

Um eine statistische Auswertung zu ermöglichen, wurden von einer Zwiebel zwei unterschiedliche Proben entnommen, die dann jeweils mehrfach vermessen wurden. Unter Rückfluss wurde die Probe bei mittlerer Temperatur erhitzt und für 10 Minuten sieden lassen. Nach einigen Minuten Abkühlung wurde der gesamte Ansatz in einen geeigneten Mörser gegeben und das Zellgewebe möglichst gründlich zerquetscht. Danach wurden die Probe und das Methanol quantitativ in den Rundkolben zurückgegeben und der Mörser mit wenig Methanol nachgespült. Erneut wurde die Probe unter Rückfluss bei mittlerer Temperatur zum Sieden gebracht, für 10 Minuten gekocht und in zwei Schritten mit 20 ml H<sub>2</sub>O versetzt.

Nun wurde der abgekühlte Ansatz durch einen Faltenfilter (Schleicher & Schuell Aschenfrei Größe mm Ø 595½/110; Germany) in einem saubereren 100 ml Rund- oder Spitzkolben filtriert. Der Filter wurde mehrmals mit kleinen Portionen Methanol nachgespült. Unter Berücksichtigung eines Siedeverzuges wurden die Filtrate bei etwa 30 °C am Rotationsverdampfer soweit eingengt, bis eine viskose Masse zurückblieb.

**Bei diesem Schritt wurde die Probe zum späteren Einsatz bei -18 °C bis -20 °C aufbewahrt oder erneut mit dem Sensorpuffer aufgelöst und mittels FIA-Anlage sowohl für die Ammoniak- als auch für die gesamte Cysteinsulfoxid-Bestimmung verwendet. Dabei wird die FIA zur Ammoniumbestimmung ohne Enzymreaktor betrieben.**

Die wie oben beschrieben aufbereiteten Proben aus frischem Knoblauch wurden mit 40 ml Biosensorpuffer aufgelöst und mit einem 0,45 µm Spritzenfilter in den 5 ml Röhrchen filtriert und analysiert.

### 2.1.4.1.1.2 Knoblauch Pulver ; Chips; Granulat

Diese Varietäten von Knoblauch wurden ebenfalls in dieser Arbeit analysiert, denn Knoblauchpulver wird als Ausgangsmaterial zur Tablettenherstellung in der Pharmaindustrie eingesetzt; die anderen Darreichungsformen finden Verwendung in der Lebensmittelindustrie und bei Forschungsstudien zur Gewinnung der Alliinase, da Pulver und Chips eine größere Ausbeute an Alliinase ergeben (Tab. 3.13).

Zur Bestimmung des Ammoniaks oder der Cysteinsulfoxide wurden von

Knoblauch-Pulver 0,5-0,6 g

Knoblauch-Chips 0.3-0,4 g

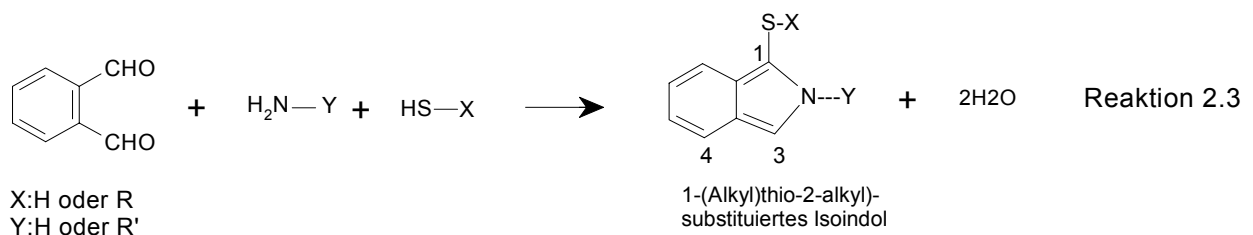
Knoblauch-Granulat 0,5-0,6 g genau abgewogen und wie frischer Knoblauch weiter behandelt.

Beim Pulver war auf Siedeverzüge zu achten, da bei der Erhitzung ein ziemlich dichter Niederschlag im Rundkolben entstand. Durch die Verwendung von Siedstein konnte dieses Problem gelöst werden.

### 2.1.4.1.1.3 Herstellung der verwendeten Puffersysteme für die biosensorische Analyse

Für die biosensorische Analyse wurde eine schnelle und leistungsfähige fluorimetrische Detektion eingesetzt. Dies erfolgte durch eine Online-Derivatisierung des enzymatisch freigesetzten Ammoniaks in alkalischem Milieu, welches durch den Einsatz von dem Reagenz o-Phthaldialdehyd (OPA) begünstigt wurde.

o-Phthaldialdehyd reagiert mit primärem Amin in alkalischem Medium in Anwesenheit von reduzierender Schwefelverbindung (X) und ergibt die fluoreszierende Substanz [1-(Alkyl)thio-2-alkylsubstituierte Isoindolderivate] (Reaktion 3.1), (Garcia Alvarez-Coque M.C. et al. 1989).



Wenn man bei der Derivatisierungsreaktion des primären Amins in alkalischem Medium (Re.2.3) das Thiol (S-X) durch Thioglycolsäure und das primäre Amin

(H<sub>2</sub>N-Y) durch das enzymatisch gebildete Ammoniak ersetzt, erhält man das fluoreszierende Derivat des Isoindol (1-glycolsäure 2 Isoindol).

In der FIA-Messanordnung für die Bestimmung von Ammoniak und Cysteinsulfoxiden wurde das verwendete Puffersystem als Lösung I und Lösung II benannt.

#### Lösung I:

15 mM OPA (o-Phthaldialdehyd, Merck Best.Nr. 11452) wurden in ammoniakfreiem Wasser (Merck Best.Nr.1.16754.9010) suspendiert (0,201g OPA/ 100 ml Wasser).

Anschließend wurden 60 mM Thioglycolsäure (0,55 ml/100 ml) (Sigma Cat.no. T-37858) unter ständigem Rühren zugegeben und mit Wasser auf 100 ml aufgefüllt. Dies erfolgte erst nach einer Einstellung des pH-Wertes mit 5 M NaOH auf pH 9 (Dieser Vorbereitungsschritt wurde unter dem Abzug durchgeführt). Die Lösung konnte in geschlossenen Gefäßen bis 3 Wochen stabil im Dunkeln bei 4 °C gelagert werden.

Sollte eine Oxidation der Lösung auftreten, welche durch eine Vergilbung erkennbar war, wurde das Reagenz nicht mehr verwendet und durch ein frisch zubereitetes ersetzt.

#### Lösung II :

0.8 M Borsäure (4,95 g / 100 ml; Merck) wurde in 50 ml ammoniakfreiem Wasser aufgelöst und tropfenweise mit 5M NaOH auf pH 12 eingestellt. Anschließend wurde auf 100 ml aufgefüllt. Anmerkung: Es bedurfte nahezu 45 ml NaOH, bis pH 12 erreicht wurde.

#### Biosensorpuffer:

In 950 ml ammoniakfreiem Wasser wurden die u.g. Komponenten (Merck) unter ständigem Rühren bis zur vollständigen Auflösung angesetzt.

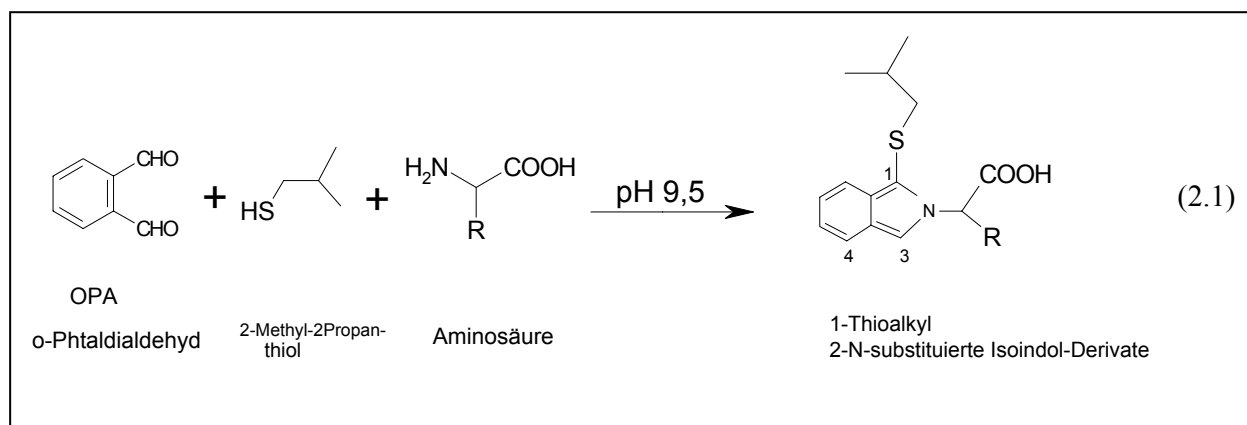
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x2H <sub>2</sub> O	1,1554	g
NaHPO <sub>4</sub> x2H <sub>2</sub> O	2,226	g
NaCl	10	g
Timerosal	5	mg

Trägerlösung: Als Trägerlösung wurde ammoniakfreies Wasser für die Ammoniak-Bestimmung und der Biosensorpuffer für die Bestimmung von Cysteinsylfoxiden eingesetzt.

## 2.2 HPLC–Analytik

Ein Nebenversuch für die Bestimmung der Cysteinsulfoxide im Knoblauch wurde mittels HPLC nach Ziegler und Sticher 1989 und Keusgen 1999 durchgeführt.

Die Knoblauchproben wurden zunächst wie bei der vorher beschriebenen biosensorischen Analyse aufgearbeitet bis zu dem Schritt, bei dem der Extrakt über den Rotationsverdampfer eingeeengt wurde und eine viskose Masse zurückblieb. Anschließend wurde diese Masse mit genau 5 ml Derivatisierungsreagenz (OPA) versetzt und nach Ablauf von 30 min im Dunkeln über einen 0,45 µm Spritzenfilter filtriert und analysiert. Eine Derivatisierung lief nach der Reaktion 2.1 ab. Das entstandene Isoindolderivat lässt sich in alkalischen Bedingungen und die Anwesenheit des Thiois bei 335 nm detektieren.



**Reaktion.(2.1)** *ortho*-Phthaldialdehyd-Derivatisierungsreaktion mit schwefelhaltiger Aminosäure (Cysteinsulfoxiden) im alkalischen Medium

### 2.2.1 Verwendete Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien für die HPLC-Analyse mit deren Bezugsquellen sind in der Tabelle (2.3) zusammengestellt.

**Tab.2.3** Chemikalien, Bezugsquelle

<b>Bezeichnung</b>	<b>Bezugsquelle</b>
Phthaldialdehyd (OPA)	Merck-Schuchardt,

---

2-Methyl-2-propanthiol	Hohenbrunn, Germany
Acetonitril H. P. L. C.; Methanol	Peypin (Frankreich)
di-Natriumhydrogenphosphat Dihydrat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ )	Merck, Darmstadt, Germany
Natriumdihydrogenphosphat Monohydrat $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$	Merck, Darmstadt, Germany
Natriumhydroxid $\text{Na}_2\text{O}$	Merck, Darmstadt, Germany
Natriumtetraborat Decahydrat Seesand	Fluka, Switzerland
Wasser	Milli-Q Reagent-Anlage Millipore, Eschborn, Germany

---

## 2.2.2 Herstellung der verwendeten Reagenzen

### 2.2.2.1 *ortho*-Phthaldialdehyd als Derivatisierungsreagenz

140 mg *o*-Phthaldialdehyd wurden in 5 ml Methanol unter dem Abzug gelöst und mit 0,2 ml 2-Methyl-2-propanthiol unter Schütteln versetzt. Das Reagenz wurde gründlich mit 50 ml (0,05 M, pH 9) Natriumtetraborat-Puffer 12 Stunden vor der Analyse hergestellt.

**Borat-Puffer:** Es wurde genau 4,77 g  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \times 10\text{H}_2\text{O}$  in 200 ml gelöst und mit NaOH der pH 9,5 Wert eingestellt sowie auf 250 ml aufgefüllt. Die Einstellung des pH-Wertes wurde über ein pH-Meter (PMX-3000 WTW, Germany) nach einer Kalibration mit Standardpuffer (pH 4,00; 6,87; 9,18) der Firma WTW ausgeführt.

### 2.2.2.2 Herkunft des Pflanzenmaterials

Die untersuchten Knoblauchproben (HPLC) sind wie bei den übrigen analysierten Proben (FIA) von den Projektpartnern, dem Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung (Gatersleben/Germany; [www.ipk-gatersleben.de](http://www.ipk-gatersleben.de)) und der Bundesanstalt für Züchtungsforschung an Kulturpflanzen [[www.bafz.de/ipa](http://www.bafz.de/ipa)] angeliefert worden.

Nach Eingang der Lieferung wurden die Proben von möglichen Fremdteilen befreit und bis zur Analyse in Papier (Saat-Tütchen) bei 1 °C gelagert.

Eine Tabelle der untersuchten Proben mit dem in Klammern angefügten Erntemonat und Jahr ist im Kapitel über die HPLC Ergebnisse eingefügt.

### 2.2.3 HPLC- Laufbedingung

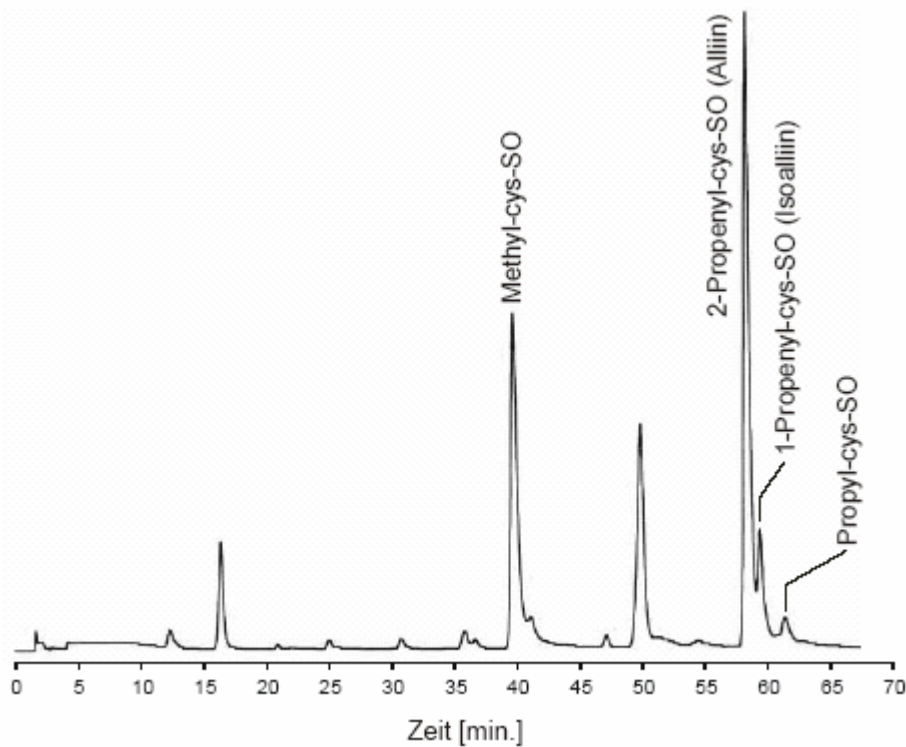
Nachfolgend sind die Laufbedingung der HPLC-Anlage und ihre Eigenschaften aufgeführt.

Injektionsvolumen:.....	10µL, nach Bedarf auch weniger
Gerät .....	Shimazu LC-4A Chromatographie mit integriertem Programmer, UV-Detektor Chromatopac C-R3A.
Säule.....	Sephermarge 80-ODS2 RP Säule( 5µm Korngröße; 250 x 4 mm mit integrierter Vorsäule mit gleichem Füllungsmaterial der Säule)
Elutionsmittel.....	A) Phosphatpuffer pH 6,5, 0,05 M und Acetonitril (70:30 V/V) B) Phosphatpuffer pH 6,5, 0,05 M und Acetonitril (85:15 V/V) (Phosphatpuffer: 4,927g NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O und 2,528 Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O werden mit H <sub>2</sub> O auf 1 Liter ergänzt)
Flussrate .....	1,1 ml/min
Analysenzeit.....	65 Minuten
Wellenlänge .....	335 nm
Empfindlichkeit.....	Faktor 0,08

Ein Gradientensystem bei der Messung mit einer Flussrate von 1,1 ml wurde wie folgt eingesetzt.

Min	Fließmittel A	Fließmittel B
0	70	30
10	40	60
20	40	60
40	20	80
45	0	100
50	0	100
55	70	30
65	70	30

### 2.2.3.1 HPLC Gradientenprogramm:



**Abb. 2.11** HPLC- Musterchromatogramm der typischerweise im Knoblauch vorkommenden Cysteinsulfoxide.

Um sich einen Überblick über das Profil von den meist vorkommenden Cysteinsulfoxiden in Knoblauch (Zwiebeln) verschaffen zu können, ist in der Abbildung 2.11 ein HPLC-Musterchromatogramm zur quantitativen Bestimmung der einzelnen CS dargestellt.



#### **2.2.4 Standardlösung und Identifizierung der CS Peaks**

Um eine quantitative und qualitative Bestimmung der Cysteinsulfoxide zu ermöglichen, wurde ein interner Standard angefertigt.

Abgewogen wird 1-2 mg des jeweiligen Standards (Mithiin, Alliin, Isoalliin, Propiin) und in 1,0 ml destilliertem Wasser aufgelöst. Davon wurden 25-80 µl entnommen, mit Derivatisierungsreagenz in Eppendorf-Tubes auf 1 ml aufgefüllt und im Dunkeln 30 Minuten belassen. Anschließend wurde eine Mischung von 40 µl des jeweiligen Standards hergestellt und in die HPLC-Anlage injiziert; dann wurden die Retentionszeiten der einzelnen CS bestimmt.

Um eine Zuordnung der Peaks des Chromatogramms der analysierten Proben mit dem Chromatogramm des Standards ermöglichen zu können, wurde auch ein Co-Chromatogramm angefertigt, in dem man die o.g. Standardmischung (40 µl CS jeweils) mit 880 µl von der derivatisierten Knoblauchprobe versetzte und 100 µl davon in der HPLC-Anlage analysierte.

Die Zunahme der Peakflächen der einzelnen CS bei dem Co-Chromatogramm wurde mit dem Chromatogramm der Probe verglichen. Durch die Betrachtung der Retentionszeit des Chromatogramms des Standards erhielt man einen Hinweis zur Identifizierung der einzelnen CSs.

#### **2.2.5 Quantitative HPLC-Analyse der Cysteinsulfoxide**

Eine quantitative Bestimmung der einzelnen und der gesamten Cysteinsulfoxide im Knoblauch war in der vorliegenden Arbeit ebenfalls von Interesse. Deshalb wurde eine Eichgerade aus Mithiin als ausgewähltes CS erstellt, denn es verfügt über eine kürzere Retentionszeit verglichen mit anderen CSs, besitzt jedoch einen gleichen molaren Absorbtionskoeffizienten. Die (-)-Isomere der Referenzsubstanzen zeigten jeweils eine um 1 – 4 min kürzere Retentionszeit als die entsprechenden (+)-Isomere. Mit OPA wurden verschiedene Konzentrationen im Bereich von 0,016 - 0,115 µmol/ml Mithiin derivatisiert und damit eine Kalibration vorgenommen.

Nach der Peakfläche erfolgte eine Integration der Mithiin-Peaks, und dementsprechend wurde die Eichgerade erstellt, indem man die Werte der Peakflächen gegen die eingesetzte Konzentration auftrug.

In einer Geradengleichung wurden dann die Peakflächen der identifizierten Cysteinsulfoxide eingesetzt und daraus die Konzentration der jeweiligen Cysteinsulfoxide in der Probe berechnet.

## **2.3 Bestrahlung**

Die Behandlung von Lebensmitteln mit ionisierenden Strahlen ist eine der neueren Konservierungsmethoden. Diese Methode hat ihre Hauptanwendung in der Praxis bei der Abtötung von unerwünschten Mikroorganismen, Parasiten oder Insekten. Dabei verbessert die Bestrahlung die hygienische Qualität der Lebensmittel und verhindert Krankheiten, die sonst durch Verzehr von mit Parasiten oder pathogenen Mikroorganismen kontaminierten Nahrungsmitteln verursacht werden können. Weiterhin ermöglicht die Bestrahlung für bestimmte Lebensmittel eine Verbesserung der Haltbarkeit.

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei wichtige Lebensmittel, nämlich das Eiklar als wichtige Proteinquelle sowie der Knoblauch und seine Relevanz in der Medizin und gleichzeitig als Lebensmittel, mit ionisierender Strahlung behandelt und mit Hilfe verschiedener schneller Analyseverfahren untersucht.

### **2.3.1 Bestrahlung von Knoblauch**

Um eine mögliche Beeinträchtigung der Cysteinsulfoxide festzustellen, wurden verschiedene Varietäten an Knoblauch mit ionisierender Elektronenstrahlung behandelt. Die Bestrahlung wurde wie folgt durchgeführt:

- 1- Frischer Knoblauch mit den Dosen ( 0; 1; 1,5; 2; 3,5; 4; 5; 5,5; 6 kGy)
- 2- Knoblauchchips mit den Dosen ( 0; 0,5; 1; 1,5; 2; 3,5; 4; 5; 5,5; 6 kGy)
- 3- Knoblauchpulver mit den Dosen ( 0; 1; 1,5; 2; 3 kGy)
- 4- Knoblauchgranulat mit den Dosen ( 0; 1; 1,5; 2; 3 kGy)

### 2.3.2 Probenvorbereitung für die Behandlung mit Elektronenstrahlen

Die behandelten Proben besitzen die gleiche Herkunft wie die bereits bei der Ammoniakbestimmung mittels FIA- Analyse (siehe Abs. 2.6.1) genannten.

#### **-Frische Proben:**

Es wurde eine Knoblauchzwiebel derart in Zehengruppen verteilt, dass man eine möglichst große Homogenität unter den zu bestrahlenden Zehen erhält und mögliche Abweichungen des CS- /Ammoniak-Gehaltes der unterschiedlichen Herkünfte ausschließt.

Diese gesäuberten Zehengruppen wurden in luftdurchlässige Plastiktütchen thermisch eingeschweißt.

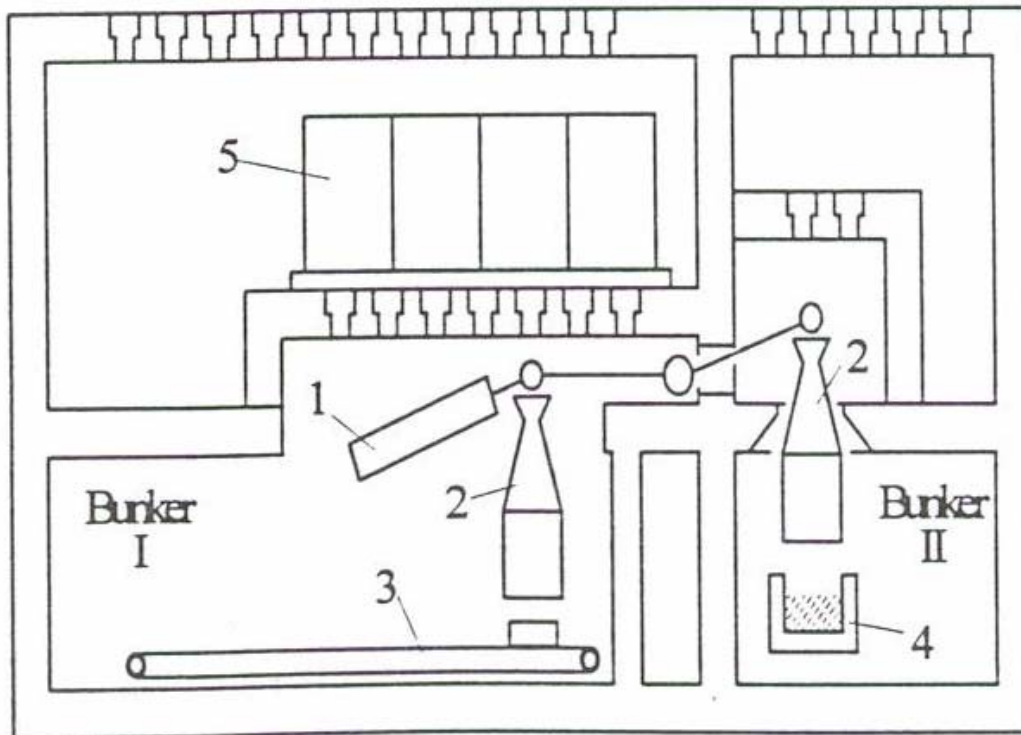
- Getrocknete Knoblauchproben (**Pulver, Chips, Granulat**) wurden mit 2 Teelöffeln jeweils in die o.g. Tütchen gefüllt und elektrisch weiter eingeschweißt.

Zu beachten ist, dass die Dicke der zu bestrahlenden Materie in den Tütchen nicht über 2 cm beträgt und möglichst keine Luft eingeschlossen ist (siehe Anhang Abb.6.3.1).

#### 2.3.2.1 Bestrahlung

Mit Hilfe des Elektronenbeschleunigers bei der BFE-Karlsruhe (LINAC: Model CIRCE III; Thomson-CSF Linac, St. Aubin, France) wurden die Knoblauch-Proben bei Raumtemperatur bis 6 kGy bestrahlt (Auswertung Dosimetrie: GAF DM-1260 Film mit Filterphotometer 257 -CIBA CORNING bei 405nm; Eichkurve bis 35 kGy; McLaughlin et al. 1979).

Bei og. Anlage (Abb. 2.12) werden durch angelegte Hochspannung Elektronen von der Glühkathode abgezogen, vorbeschleunigt und magnetisch in den Scanner abgelenkt, der für die Bündelung und Auslenkung zuständig ist.



**Abb. 2.12** Schematischer Aufbau des Linearbeschleunigers der BFE. 1-Beschleunigungsrohr, 2- Scanner, 3-Transportband, 4- Transportsystem für großvolumige Produkte, 5-Kontrolleinheit

Die Anlage kann Strahlenergien von 5 bis 10 MeV und eine Strahlungsleistung von 10 kW produzieren. Die Dosisleistung beträgt  $10^7$  Gy/sec (Ehlermann und Bauer, 1999). Die Proben wurden mit einem Transportband in den während der Bestrahlung nicht zugänglichen Bestrahlungsbunker befördert und unter dem Scanner hindurchgeführt, während die Bestrahlung von oben erfolgte.

Formel zur Dosisberechnung für Filmdosimeter GAF DM-1260:

Dosis = f + 10 ((Abs-d)/e): d:0,110193445;e:1.2133339081;f:-1,568924758

Die optische Absorption der Filmstückchen (3 Stück/Probe), die auf die Proben geklebt worden waren, wurde bei 405 nm gemessen und mit Hilfe der og. Formel die Dosis in kGy berechnet.

### 2.3.2.1.1 Detektion von DNA-Strangbrüchen in bestrahltem Knoblauch

DNA-Strangbrüche wurden mit der Einzelzell-Gelelektrophorese (Single-cell gel electrophoresis; SCGE oder Comet Assay bzw. Mikrogelelektrophorese) gemessen. Dabei handelt es sich um eine semiquantitative Methode, mit der DNA-Strangbrüche in primären oder kultivierten Zellen mikrobiellen, pflanzlichen, tierischen oder menschlichen Ursprungs gemessen werden können. Ursprünglich wurde die SCGE

für die Untersuchung von Schäden durch radioaktive Strahlung entwickelt, heute werden auch genotoxische und antioxidative Effekte verschiedener Substanzen *in vitro* und *in vivo* mit der SCGE untersucht (McKelvey-Martin *et al.* 1993; Fairbairn *et al.* 1995; Möller & Loft 2002).

In der vorliegenden Untersuchung wurde nach der Anleitung von Cerda *et al.* 1993 gearbeitet, die auf der Methode von Östling & Johanson 1984 basiert.

### **Prinzip**

Eine Einzelzellsuspension wird auf Objektträgern in Agarose eingebettet. Nach dem Gelieren der Agarose werden die Zellen mit Hilfe eines Detergens lysiert, um Membranen und Proteine zu entfernen. Danach werden die Zellen einer Elektrophorese unterworfen. Brüche in den DNA-Molekülen stören deren komplexe Struktur, so dass entspannte Teile der DNA im Verlauf der Elektrophorese zur Anode wandern können. Eine Färbung mit einem DNA-bindenden Farbstoff macht die Migration der DNA als „Kometen“ mit einem stark fluoreszierenden Kopf und einem schwächer leuchtenden Schweif fluoreszenzmikroskopisch sichtbar. Die SCGE gilt als sensitive Methode, die geeignet ist, oxidativen Stress und die Wirkung nutritiver Antioxidantien *in vitro* sowie *in vivo* zu untersuchen (Lenton *et al.* 1995).

### **Praktische Durchführung**

#### Geräte

Objektträger (approx. 76x26 mm Merck)

Mega Horizontal Gelbox Safety (Molecular Bio-Products, San Diego, USA)

Spannungsquelle (Consort E 122 Berlin Germany)

Fluoreszenzmikroskop Leitz DM RB (Leica, Bensheim, D)

CCD-Kamera (Cohu, San Diego, USA)

Bildanalysesystem Comet Assay II (Perceptive Instruments, Suffolk, GB)

#### Reagenzien und Aufbereitungen

**PBS** 10 mM, pH= 7,4 bei Bedarf konnte mit 1 M HCl der pH Wert eingestellt werden.

9,55 g (1 Päckchen) PBS-Pulver (Sigma Aldrich) wurden mit *aqua bidest.* auf 1 L aufgefüllt.

*Alternativ* wurden (8.0 g NaCl, 0,2 g KCl, 3,58 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 12H<sub>2</sub>O und 0,24 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> in 900 ml bidest. Wasser aufgelöst und nach der Einstellung des pH-Wertes auf 1000 ml aufgefüllt. Diese Lösung wurde bei 120 °C für 20 Minuten autoklaviert. Alternative: Sterilfiltration.

**Agarose zur Beschichtung von Glasobjektträgern** (0,5 % in dest. Wasser)

Genau 100 g niedrig schmelzende Agarose (Serva, Heidelberg, Germany) wurden in 20 ml bidest. Wasser aufgekocht bzw. in der Mikrowelle zur vollständigen Auflösung gebracht. Anschließend wurde die Lösung im Wasserbad für 20 min auf 80°C gehalten und vor der Verwendung auf 60°C für die Vorbeschichtung belassen. Auf mit Ethanol gesäuberten und bei 60 °C getrockneten Glasobjektträgern wurden 300 µl warmes (60°C) Gel an einem Ende aufgetragen und mit einem weiteren Träger bis an das andere Ende verteilt, so dass eine möglichst homogene rissfreie Schicht auf dem Träger gebildet wurde, die besonders an den Kanten der Träger geschlossen war. Anschließend wurden die so beschichteten Träger an der Luft etwa 30 Min trocknen lassen und bis 2 Wochen haltbar in Behältern bei 4 °C aufbewahrt.

**Zellensuspensions-Vorbereitung** (*im DUNKELN*)

Mit Hilfe einer Küchenreibe wurden fremdfreie Teile der Knoblauchzehen in möglichst sehr kleine dünne Flocken verwandelt und etwa 0.3 g davon in Schnappdeckelgläschen mit 3 ml eisgekühltem PBS versetzt sowie für 5 Minuten bei 500 rpm gerührt. Anschließend wurde sie sequentiell durch 200 µm und 100 µm Nylon-Siebe filtriert. Das Filtrat wurde genau 20 Minuten absetzen lassen, um die Suspension von möglichen Kontaminanten befreien zu können. Nach einer längeren Zeit wäre die Ausbeute an einzelnen Zellen nicht mehr ausreichend.

**Gieß-Gel-Lösung und Proben-Auftragung** (0.8 % Agarose in PBS); (*im DUNKELN*)

160 mg von o.g. Gel wurden in PBS in 20 ml (PBS pH7,4 frei von jeglicher Art von DNA) mit Hilfe einer Mikrowelle aufgelöst und im Wasserbad auf 50 °C aufgehallen. 250 µl von der Knoblauchzellen-Suspension wurden in 750 µl Gieß-Gel in 2 ml Eppendorf Caps vermischt und davon 100 µl auf den Objektträger aufgetragen und wie oben in einer Schicht auf den bereits vorher beschichteten Objektträger aufgetragen.

**Lyse- Puffer**

25,0 g Natriumlaurylsulfat (SDS), 10,0 g N-Lauroylsarcosinat und 7,305 g Ethylendiamin-tetraessigsäure (EDTA) (alle Sigma Aldrich), wurden mit *aqua demin.* auf 1 L aufgefüllt. Der pH-Wert wurde zuvor mit 10 M NaOH auf 8,5 eingestellt.

**Elektrophoresepuffer (45 mM Tris-Borate, 1 mM EDTA).**

14,2 g Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, D), 5,6 g Borat (Merck) und 0,74 g EDTA (Sigma Aldrich) wurden mit *aqua demin.* auf 1 L aufgefüllt. Der pH-Wert der Lösung liegt bei 8,3.

**Propidiumiodid 25 µM**

Es wurde eine Propidiumiodid-Stammlösung (1 mg/mL in *aqua bidest.*) hergestellt. 3,08 g Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Amersham Pharmacia Biotech) und 1,468 g NaCl wurden in 200 mL *aqua bidest.* gelöst. 4,175 mL der Propidiumiodid-Stammlösung wurden zugegeben und der pH-Wert mit 1 M HCl auf 7,5 eingestellt. Anschließend wurde mit *aqua demin.* auf 250 ml aufgefüllt.

**2.3.2.1.1 Analysenansatz**

I Es wurden die vorbeschichteten Objektträger zuerst einmal vorbereitet, wie in o.g. Schritt (2) durchgeführt, oder die bereits beschichteten Träger wieder auf Raumtemperatur gebracht

und auf Platten nebeneinander gelegt, um sie für die nächste Beschichtung vorzubereiten. ***Um in den nachfolgenden Schritten DNA-Strangbrüche durch UV-Strahlung zu vermeiden, wurde das Labor abgedunkelt. Alle Inkubationsschritte wurden in einer Styroporkiste im Dunkeln durchgeführt.***

II 250 µl Suspensionszellen (aus Schritt 3) wurden mit 750 µl 0,8 % in PBS gelöstem Gel vermischt und 100 µl davon als Schicht auf den Träger gebracht (Details in Schritt 4) und zum Aushärten etwa 20 Minuten bei 4°C belassen. (Die Platte wurde auf Eis gelegt.)

III Nachdem die Schicht (Zellen + Gel) fest war (ca. 20 Minuten), wurden die so beschichteten Glasobjektträger in eigene Träger eingesetzt und in Lyse-Puffer für 16 Minuten inkubiert.

IV Nach Ablauf der o.g. 16 Minuten wurden die Träger für 5 Minuten in Elektrophorese TBE-Puffer zur Konditionierung vor der Elektrophorese inkubiert.

**V *Elektrophorese***

Die Objektträger wurden in die Elektrophoresekammer gelegt und mit dem Elektrophoresepuffer (4°C) gerade bedeckt. Die Elektrophorese erfolgte für 4 min bei 2 V/cm (Elektrodenabstand 39 cm). Die Bedingungen wurden so gewählt, dass auch die Kometen der unbehandelten Zellen erkennbare Schweife aufwiesen. Dadurch wurde sichergestellt, dass alle durch Bestrahlung erzeugten Strangbrüche durch eine weitere Migration der DNA in den Schweif sichtbar werden [80 Volt/ 4 mA für 2 min und 12 Sekunden].

## **VI Haltbarmachung der Gele**

Nach der Elektrophorese konnten die Gele anschließend noch einmal für 10 min in *aqua demin.* (4°C) gewaschen und dann auf einer Wärmeplatte bei etwa 50°C für 20 – 30 min getrocknet werden. Die fertigen Präparate wurden bis zur Auswertung bei – 20°C aufbewahrt.

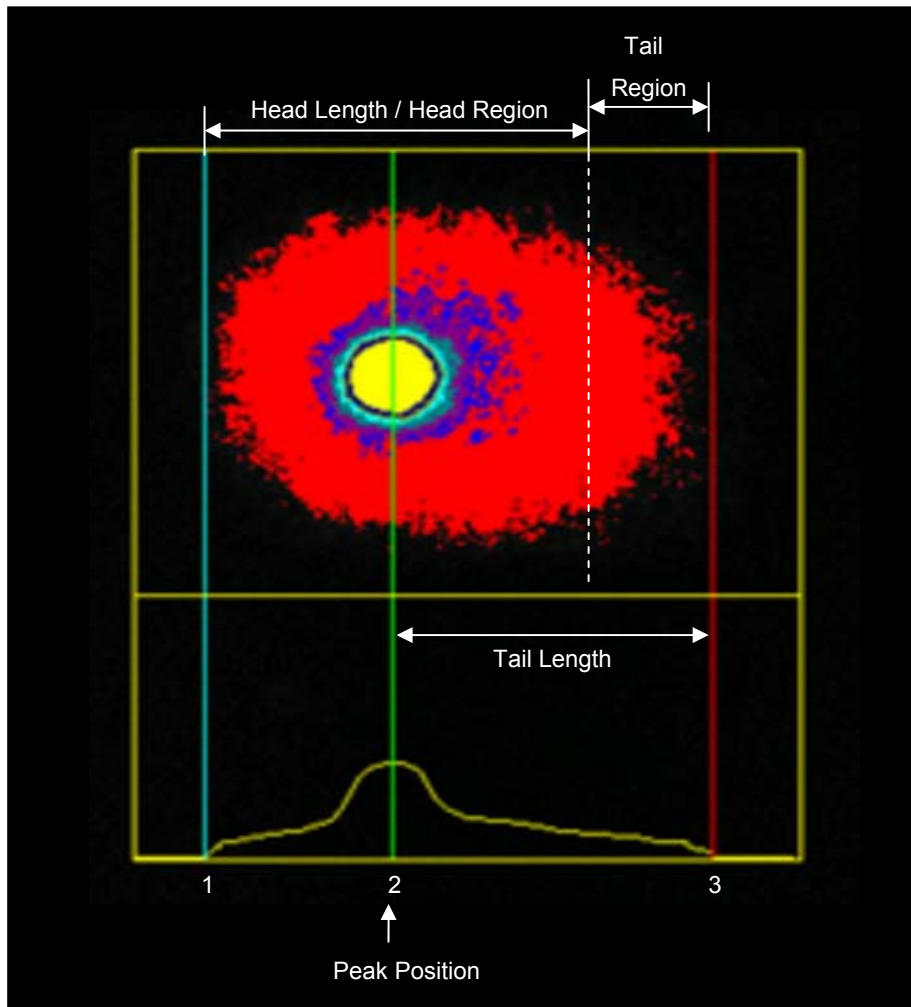
## **VII Messung**

Die Mikrogele wurden 10 min in *aqua bidest.* bei Zimmertemperatur rehydriert und mit je 150 µL Propidiumiodid-Lösung gefärbt. Nach 20 min Inkubation im Dunklen bei 4°C wurden die Kometen bei 400-facher Vergrößerung am Fluoreszenzmikroskop (Leica), ausgestattet mit einer 50-W-Quecksilberlampe und einem Filter zur Grünanregung, sichtbar gemacht. Die Fluoreszenz wurde mit dem Bildverarbeitungsprogramm Comet Assay II (Perceptive Instruments) gemessen, das über die CCD-Kamera (Cohu) mit dem Mikroskop gekoppelt war. Pro Objektträger wurden 50 zufällig ausgewählte Zellen gemessen. Für die weiteren Berechnungen wurde das arithmetische Mittel der 50 Einzelwerte herangezogen. Von allen Proben wurden Doppelbestimmungen durchgeführt. Bei Verlust einzelner Gele im Verlauf der Aufarbeitung wurde im verbleibenden Gel die doppelte Anzahl an Zellen gemessen.

### **2.3.2.1.1.2 Auswahl der Messparameter**

Das Programm Comet Assay II bietet eine Reihe von Parametern an, mit denen die Verteilung der DNA in Kopf und Schweif der Kometen beschrieben wird. In Abb. 2.13 sind diese anhand einer Beispielmessung dargestellt.





**Abb. 2.13: Messung einer Zelle nach Einzelzell-Mikrogelelektrophorese mit dem Comet Assay II-System.**

Die äußeren Linien begrenzen das Messfenster, in dem die Zelle in Falschfarben dargestellt wird. Die linke (1) und die rechte Linie (3) im Messfenster markieren die Ausdehnung des Kometen, die mittlere Linie (2) den Punkt der höchsten Fluoreszenz (Peak Position). Die Länge des Kopfes (Head Length) entspricht dem doppelten Abstand zwischen 1 und 2, die Länge des Schweifs (Tail Length) dem Abstand zwischen 2 und 3. Alle Punkte innerhalb der Kopfreion gehören zur Intensität des Kopfes (Head Intensity), zwischen dem Ende der Kopfreion und dem Ende des Kometen liegt die Schweifregion, die Summe der Punkte darin bildet die Schweifintensität (Tail Intensity).

In der Literatur werden üblicherweise die Länge des Schweifs (Tail Length), der prozentuale Anteil der DNA im Schweif (Tail Intensity,  $TI^2$ ) oder das Tail Moment ( $TM^3$ ), ein Produkt aus der Länge des Schweifs und dem Anteil der DNA im Schweif,

<sup>2</sup> Tail Intensity = Fluoreszenzintensität im Schweif / Fluoreszenzintensität des gesamten Kometen in %

<sup>3</sup> Im Handbuch für das Programm Comet Assay II wird die Formel zur Berechnung des Tail Moment angegeben als: Tail Moment = Tail Intensity [%] / Sum Comet Intensity [%] \* (Tail Centre of Gravity – Peak Position), wobei Sum Comet Intensity = Gesamtfluoreszenzintensität des Kometen, Tail Centre of Gravity = Summe der Strecken aller Fluoreszenzpunkte der Schweifregion / Anzahl der Messpunkte und Peak Position = Bereich der höchsten Fluoreszenzintensität. Die Angabe erfolgt in willkürlichen Einheiten.

angegeben. Da die Tail Length nur begrenzt mit der Anzahl der DNA-Strangbrüche korreliert ist (McKelvey-Martin *et al.* 1993; Fairbairn *et al.* 1995), wurde in der vorliegenden Studie auf die Auswertung dieses Parameters verzichtet.

### **2.3.2.2 Untersuchung der Strahlungseinflüsse auf den gesamten Gehalt von Ammoniak und Cysteinsulfoxiden mit Hilfe des FIA –Messverfahrens**

Um den Einfluss der Elektronenstrahlungen sowohl auf den gesamten Ammoniak als auch auf den CS-Gehalt im Knoblauch zu bestimmen, wurde die FIA als schnelles Messverfahren verwendet. Die Probenvorbereitungen für die FIA-Analyse erfolgten genau so wie in den vorhergegangenen Abschnitten bei der Ammoniak- und CS – Bestimmung mit Hilfe des FIA (Abschnitt 2.6).

#### **2.3.2.2.1 Knoblauchprobenvorbereitung zur Bestrahlung**

Wie in den vorausgegangenen Abschnitten wurden die unterschiedlichen Knoblauchvarietäten folgendermaßen behandelt:

##### **- Frische Proben**

Es wurde eine Knoblauchzwiebel so in Zehengruppen verteilt, dass man eine möglichst hohe Homogenität der zu bestrahlenden Zehen bekommt und mögliche Abweichungen des CS /Ammoniak-Gehaltes der unterschiedlichen Herkünfte ausschließen kann.

Diese gesäuberten Zehengruppen wurden in luftdurchlässige Plastiktütchen thermisch eingeschweißt.

## - Getrocknete Knoblauchproben

**Pulver, Chips und Granulat** wurden in Portionsgrößen von jeweils etwa 2 Teelöffeln in die o.g. Tütchen gefüllt und thermisch eingeschweißt sowie mit der LINAC-Anlage (Abschnitt 2.8.1.2) bestrahlt.

Die o.g. Vorbereitungen für die Behandlung der Knoblauchproben mit ionisierenden Strahlungen gelten sowohl für die Analyse mit Hilfe des FIA als auch für die mit der MIR- erfassten Spektren und für die Bestimmung der Aktivität der Alliinase in bestrahltem Knoblauch.

### 2.3.2.3 Untersuchungen von bestrahltem Knoblauch mittels MIR

Um eine mögliche qualitative Unterscheidung zwischen bestrahltem und unbestrahltem Knoblauch zu erreichen, wurde die MIR-ATR-Technik (MIR - Mittlere IR-Spektroskopie, ATR – attenuated total reflection) als schnelles Scanverfahren eingesetzt; Spektren wurden im Bereich  $650\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$  aufgenommen sowie mit den unbehandelten Kontroll-Proben verglichen.

**Geräteeinstellungen:** Auflösung:  $4\text{ cm}^{-1}$ , 1 Scan, Messbereich:  $4000\text{ - }650\text{ cm}^{-1}$ , Perkin Elmer Spectrum one-Spektrometer.

Die eingesetzte Software für die Aufnahme der Spektren trägt die Bezeichnung *Ph.Eur, method 2.2.24*.

[PerkinElmer FTIR Spektrum one ATR (Abb. 2.14)]. Dazu wurde pulverisierter Knoblauch auf die Diamant-Oberfläche gegeben, von der abgedeckten Probe wurden MIR- Spektren bei Raumtemperatur ( $22 \pm 1\text{ °C}$ ) aufgenommen.

### 2.3.2.4 Bestimmung der Alliinaseaktivität in bestrahltem Knoblauch

Genau so wie in den oben aufgeführten Schritten zur Proteinbestimmung, Abschnitt 2.3, wurde die spezifische Aktivität von Alliinase bei bestrahlten Knoblauchvarietäten (Chips, Frisch....) bestimmt und mit den Unbestrahlten verglichen.

Die Bestrahlungsschritte sowohl für die FIA-Analyse als auch für die Aktivität waren gleich wie die in Abschnitt 2.8.1.4.1 beschriebenen.

### **2.3.3 Bestrahlung von Eiklar**

#### **2.3.3.1 Materialien**

Eier, in verschiedenen Einkaufsmärkten (Einzelhandel) gekauft.

Weiterhin

von Diana Ei-Produkte GmbH & Co KG, Bonn

-a- Kristall-Eiweiß

von Firma REX & Emsland Eiprodukte, Quakenbrück

-b- Eiweißpulver

-c- unpasteurisiertes flüssiges Eiweiß (Rohware)

von Firma Juchem GmbH, Eppelborn

-d- pasteurisiertes Eiweiß.

Die kommerziellen Eiprodukte sind entsprechend der Eiprodukte-Verordnung, dem LMBG, sowie allen anderen betroffenen Gesetzen, Verordnungen, Richtlinien und Leitsätzen hergestellt.

sowie:

-einzelne Eiklar-Proteine ( Lysozym, Ovalbumin, Ovotransferrin ) von SERVA (Heidelberg)

-Phosphatpuffer pH 2.5, LPA-Gel (Biorad, München).

#### **2.3.3.2 Probenvorbereitung für die Bestrahlung**

Es wurden fünfzehn Eier (5 aus jedem Einkaufsmarkt) per Hand geöffnet und das Eiklar mit einem Plastik-Eitrenner separiert.

Das flüssige Eiklar wurde vorsichtig mit Hilfe eines Glasstäbchens verquirlt und möglichst ohne Luftbläschen in Portionen zu etwa 50 ml in Plastiktütchen gefüllt und thermisch eingeschweißt.

Das Pulver und das Kristall-Eiweiß wurden vor der Bestrahlung nicht aufgelöst, sondern in trockener Form in Plastiktütchen (10 cm x 10 cm x 0,5 cm) gefüllt und eingeschweißt.

### 2.3.3.2.1 Bestrahlung

Die Eiklar-Proben wurden mit Hilfe der oben beschriebenen LINAC-Anlage (Abschnitt 2.8.1.2) bei 0 °C mit Dosisleistung von  $10^7$  Gy/sec bis 10 kGy bestrahlt. Die Proben wurden mit einem Transportband in den während der Bestrahlung nicht zugänglichen Bestrahlungsbunker befördert und unter dem Scanner hindurchgeführt, während die Bestrahlung von oben erfolgte.

**Nach** der Bestrahlung wurden flüssige Proben in 2ml Eppendorf-Röhrchen verteilt und bis zur Vorbereitung zur Analyse **bei -19°C** aufbewahrt, während die Pulver- und Kristallproben bei 5 °C gelagert wurden.

Tabelle 2.4: Auswertung Dosimetrie mit GAF DM-1260

<u>Dosimeter</u> <u>Nr.</u>	<u>Zieldosis</u> <u>in kGy</u>	<u>OD/Absorption</u>			<u>Dosis in</u> <u>KGy</u>
1	3	0,680	0,688	0,686	2,969
2	5	0,883	0,873	0,888	4,999
3	7.5	1,053	1,060	1,056	7,573
4	10	1,189	1,179	1,195	10,157

Formel zur Dosisberechnung für Filmdosimeter GAFDM-1260:

Dosis=f +10 ((Abs-d)/e): d:0,110193445;e:1.2133339081;f:-1,568924758

Die optische Absorption der Filmstückchen (3 Stück/Probe), die auf die Proben geklebt worden waren, wurde bei 405 nm gemessen und mit Hilfe der o.g. Formel die Dosis in kGy berechnet. Die Dosen wurden mit einem GAF DM-1260 Film mit Filterphotometer 257-CIBA CORNING bei 405 nm, Eichkurve bis 35 kGy (McLaughlin et al. 1979) bestimmt.

### **2.3.3.3 Kapillarelektrophorese-Auftrennungen von Eiklar**

Eine relativ neue Technik wie CE wurde für die Auftrennung der Proteine des Eiklars angewendet. Die Auftrennung über CE beruht einerseits auf dem Zusammenspiel zwischen den physikalischen und chemischen Eigenschaften der zu trennenden Analyten; andererseits ist sie bedingt durch die verwendeten Kapillaren, deren innere Oberflächen und die Puffersysteme, die zu Ladung und Transport der Analyten je nach resultierender Kraft des Zusammenspiels von den EOF und der elektrischen und hydrodynamischen Mobilität benötigt werden. Vertiefung in der CE sowie seine Methoden und Theorien sind hinreichend bei Engelhard 1994, Kuhn 1993 beschrieben. Hierfür wurden zunächst lediglich CZE, CGE verwendet.

#### **2.3.3.3.1 Probenvorbereitung für die Kapillarzonenelektrophorese (CZE)**

- Die flüssigen Eiklarproben wurden 1:4 (v/v) mit dest. Wasser verdünnt und mit Papierfilter (Schwarzband 5891; Schleicher & Schuell GmbH, Dassel, Germany) filtriert
- oder durch einen 0,5 µm Membran-Spritzenfilter (Millipore Millex LCR, Merck; Heidelberg) filtriert.
- Vom Eiklar-Pulver wurden 10 mg in 10 ml dest. Wasser unter leichtem Rühren aufgelöst; ebenso wurde mit dem Kristall-Eiweiß verfahren. Danach wurde durch Papierfilter und Membranfilter filtriert. 2 ml Eiklar-Filtrat wurden zu 6 ml dest. Wasser zugegeben und leicht gemischt. Davon wurden 0,5 ml in ein CE-Gefäß pipettiert.

#### **2.3.3.3.2 Probenvorbereitung für die Kapillargelelektrophorese (CGE)**

##### **2.3.3.3.2.1 Probenvorbereitung für (SDS-CGE):**

Für die Probenvorbereitung zum SDS-CGE werden folgende Lösungen eingesetzt:

In (H<sub>2</sub>O)

10 ml 4% SDS	Lösung 1
10 ml 5% SDS	Lösung 2
10 ml 5% 2-Merkaptoethanol	Lösung 3

Ansatz:

- a- 1 ml flüssiges Eiweiß wird mit 1,25 ml Lösung 1 und 0,25 ml Wasser verdünnt und 35 Minuten auf 60 °C erwärmt.
- b- Nach den ersten 34 Minuten wird zusätzlich 1 ml Wasser und 1 ml eines Gemisches aus 0,5 ml Lösung 2 und 0,5 ml Lösung 3 zugegeben, für 10 Min auf 100 C° erwärmt und anschließend auf 0 °C abgekühlt, filtriert und bis zur Analyse bei - 19 °C aufbewahrt. (Mackie et al. 1992 )

#### **2.3.3.3.2 Probenvorbereitung für Nativ-CGE:**

Für die Analyse mit diesem Verfahren werden die Proben ohne SDS behandelt. Die Proben werden vierfach mit dest. Wasser verdünnt, filtriert und direkt analysiert.

#### **2.3.3.3.3 Auftrennung von Eiklar mit Hilfe vom CZE :**

Die Messungen wurden mit dem BioFocus 3000 TC Kapillar-Elektrophoresegerät (Bio-Rad Laboratories GmbH, München) durchgeführt.

Die unbeschichtete Kapillare (GROM-ANALYTIK, Herrenberg) "Fused Silica ID 50; AD 365 µm; Totallänge 24 cm, effektive Länge 19,4 cm " wurde mit einem Keramikschneider auf die gewünschte Länge geschnitten.

Das Detektionsfenster wurde mit Hilfe einer Alufolie durch Abbrennen der Polyamidbeschichtung hergestellt.

Die Kapillare wurde jeweils vor einer Analyse vorkonditioniert:

2 und 3 Minuten mit 0.1 M NaOH , 3-4 Minuten mit dest. Wasser und 2 Minuten mit Laufpuffer (0,1 M Phosphatpuffer pH 2,5, Bio-Rad, München) als Vorlauf durchgespült.

Für die CZE Auftrennung wurde die Kapillare immer nach etwa 60 Läufen ausgetauscht und eine neue eingebaut, da weitere Runs die Auftrennung beeinträchtigt hätten.

Die Trennungsspannung (Running Voltage) war im Bereich 10 -15 kV.

Die Kapillar- bzw. Karussell-Temperatur wurde auf 15°C bzw. 10°C jeweils optimiert.

Die Injektion erfolgte elektrophoretisch zwischen 5 -10 kV, 2-3 Sec.

Die Elektropherogramme wurden bei 200 nm aufgenommen.

#### **2.3.3.3.4 Auftrennung von Eiklar mit Hilfe von CGE:**

Es wurden dieselbe Apparatur und die gleichen Kapillaren verwendet wie bei der Trennung durch CZE.

Konditionierungszyklus :

Cycl. 1: 2 min mit bi dest. Wasser.

Cycl. 2: 2 min mit 0.1 M NaOH

Cycl. 3: 2 min mit 0.1 M HCL

Cycl. 4: 2 min mit bi dest. Wasser.

Die austauschbare Gelmatrix LPA wurde als lineares Polyacrylamid bei pH 8,5 eingesetzt.

Die Laufbedingungen sind für die beste Auftrennung optimiert worden.

Injektion 10 kV, 5sec; Runvolt 10-15 kV; Kapillar- / Karussell-Temperatur jeweils 20°C bzw. 15°C; Durchführung s. Tabelle 2.

Die Profile der Elektropherogramme wurden bei mehreren Wellenlängen von 195 nm bis 360 nm gemessen; die Messung war bei 214 -220 nm am besten in Bezug auf das Signal/ Rausch -Verhältnis.

Die Trennkonditionen sind sowohl für SDS-CGE- als auch die CGE-Auftrennungen wie folgt durchgeführt worden:



### Trennbedingungen für CGE.

CGE Method:

Single Run Group

Capillary: 24 cm x 50 µm ID: Unbeschichtet.

Capillary Setpoint Temp (°C): 20

Prep Cycle 1	Pre-Inject; Inlet, SRG; Outlet, Waste; 100 sec HI Pressure	Prep Cycle 2	Post-Inject
	Inlet, SRG; Outlet, Waste; 70 sec HI Pressure		
Prep Cycle 3	Pre-Inject; Inlet, SRG; Outlet, Waste; 100 sec HI Pressure	Prep Cycle 4	Post-Inject
	Inlet, SRG; Outlet, Waste; 0 sec HI Pressure		
Prep Cycle 5	Pre-Inject; Inlet, SRG; Outlet, Waste; 0 sec HI Pressure	Prep Cycle 6	Post-Inject
	Inlet, SRG; Outlet, Waste; 0 sec HI Pressure		

Injection: 10.00 kV, 5 sec.

Run: 15.00 kV, Polarity: + to - Wavelength(nm): Scan, 196 - 360, 5, Integ. 220 nm.

Carousel Setpoint Temp(C): 15

Die o. g. Laufbedingungen sind experimentell erzielt.

#### **2.3.3.4 Eiklar-Messungen mit Hilfe der Infrarot Spektroskopie**

Um eine mögliche qualitative Unterscheidung zwischen vorbehandelten (Pasteurisierung, Bestrahlung) und unbehandelten Eiklar-Proben zu erzielen, wurde die MIR-ATR Technik (MIR - Mittlere IR-Spektroskopie, ATR – attenuated total reflection) als schnelles Scanverfahren eingesetzt. Spektren wurden im Bereich (650-4000 cm<sup>-1</sup>) aufgenommen und mit den unbehandelten Kontroll-Proben verglichen.

Die eingesetzte Software für die Aufnahme die Spektren trägt die Bezeichnung

( Ph.Eur, method 2.2.24).

##### **2.3.3.4.1 Probenvorbereitung vor und nach der Bestrahlung**

Es wurden fünfzehn Eier (5 aus jedem Einkaufsmarkt) per Hand geöffnet und das Eiklar mit einem Ei-Trenner (Plastik-Material) separiert. Das flüssige Eiklar wurde vorsichtig mit Hilfe eines Glasstäbchens verquirlt und möglichst ohne Luftbläschen in Portionen zu etwa 50 ml in Plastiktütchen gefüllt und elektrisch eingeschweißt.

Die Eiklar-Proben (Tab. 1) wurden als pasteurisierte Ware aus dem Handel erhalten (Firma REX & Emsland Eiprodukte, Quakenbrück). Ein Teil der Proben wurde mit Hilfe des o.g. Elektronenbeschleunigers in der Bundesanstalt für Ernährung,

Karlsruhe (BFEL; LINAC: Linac, St. Aubin, France) bei 0 °C mit einer Dosisleistung von  $10^7$  Gy/sec bestrahlt (maximal bis 10 kGy).

Die Dosen wurden mit einem GAF DM-1260 Film mit Filterphotometer 257-CIBA CORNING bei 405 nm, Eichkurve bis 35 kGy (McLaughlin et al. 1979) bestimmt. Nach der Bestrahlung wurden flüssige Proben in 2 ml Eppendorf-Röhrchen verteilt und bei (-19°C) bis zur Analyse aufbewahrt.

**Tab 1:** Untersuchte Eiklar-Proben

Eiklar Proben, Chiffre	Zustand (flüssiges Eiklar)	Vorbehandlung	Anmerkung
D0	fl	Unbehandelt	
D10	fl	Mit 10kGy vorbehandelt	maximale Strahlendosis
P0	fl	Pasteurisiert, 50 °C, im Durchfluss-Verfahren	

Wobei **P0** steht für pasteurisiertes Eiklar

**f1** steht für flüssiges Eiklar

**D10** steht für frisches flüssiges und mit 10 kGy bestrahltes Eiklar

#### 2.3.3.4.2 Durchführung der Messungen und Auswertung der spektralen Daten

Die Proben wurden mittels MIR-ATR-Technik (mittleres Infrarot; abgeschwächte Totalreflexion) untersucht [PerkinElmer FTIR Spektrum one ATR (Abb. 2.14); Ph.EUR. 2.2.24]. Dazu wurden 15 mg Eiklar auf die Diamant-Oberfläche gegeben (Hubpipette) und von der abgedeckten Probe MIR- Spektren wiederholt (alle 2 Minuten) bei Raumtemperatur ( $22 \pm 1$  °C) aufgenommen.

**Geräteeinstellungen:** Auflösung:  $4 \text{ cm}^{-1}$ , 1 Scan, Messbereich:  $4000 - 650 \text{ cm}^{-1}$ , Perkin Elmer Spectrum one-Spektrometer.



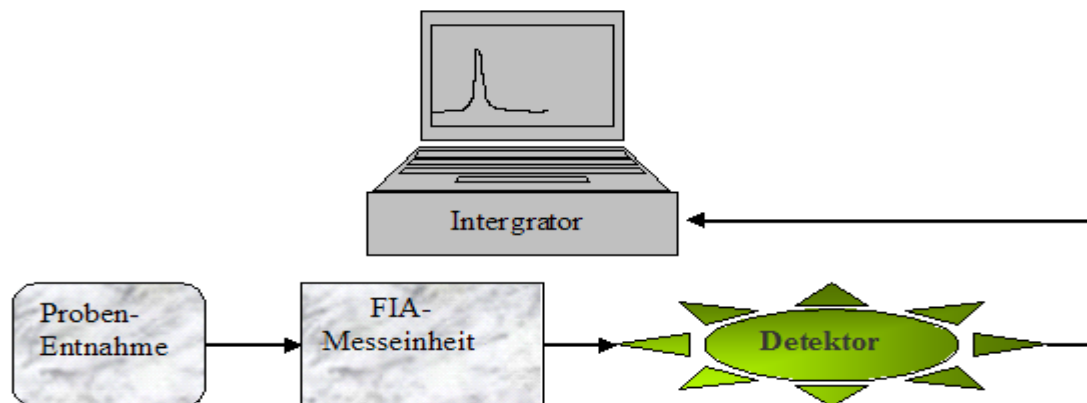
**Abb. 2.14** Aufnahme von Perkin Elmer FTIR Spektrum one ATR; **Messprinzip**

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Etablierung einer biosensorischen Methode mit Hilfe der FIA

Für eine Verdeutlichung der Entwicklungsmechanismen des Messsystems wird im Folgenden eine kurze Übersicht über das FIA- System gegeben. Wie im Abschnitt „Material und Methoden“ erläutert wurde, lässt sich der in dieser Arbeit eingesetzte Biosensor in vier Einheiten unterteilen (Abb. 3.1):

1. Probenentnahme
2. Messeinheit
3. Detektor
4. Integrator (Computer)



**Abb. 3.1** Schematische Darstellung eines Biosensors

Im Allgemeinen sind die Injektionsschleife, die Reagenzzufuhr sowie der Enzymreaktor (bei einer biosensorischen FIA) in die Messeinheit integriert.

Mittels eines Detektors wird der gemessene Wert in ein elektrisches Signal umgewandelt, vergrößert, verarbeitet und an den Integrator weiter gegeben, wo er aufgezeichnet wird und nach der Peakhöhe oder Fläche eine Auswertung erfolgen kann. Ein Detektor könnte natürlich ein Fluoro- oder Photometer sein. Elektrochemische Detektoren sind ebenfalls denkbar.

In der vorliegenden Arbeit ist ein Fluorometer im System integriert, da bei der Bestimmung von Cysteinsulfoxiden in einem Derivatisierungs-Zwischenschritt mit Hilfe des OPA-Reagenzes ein fluoreszierendes Derivat entsteht.

### 3.1.1 Anordnung der fluorimetrischen Durchfluss-Injektions-Analyseanlage

Für eine leistungsfähige fluorimetrische Bestimmung des enzymatisch freiwerdenden Ammoniaks (z. B. durch Alliinase umgesetzte Cysteinsulfoxide) wurde die FIA-Anlage wie in Abb. 3.2 angeordnet, wobei die Freisetzung von Ammoniak durch Alliinase in Abb. 3.1.1 dargestellt ist.

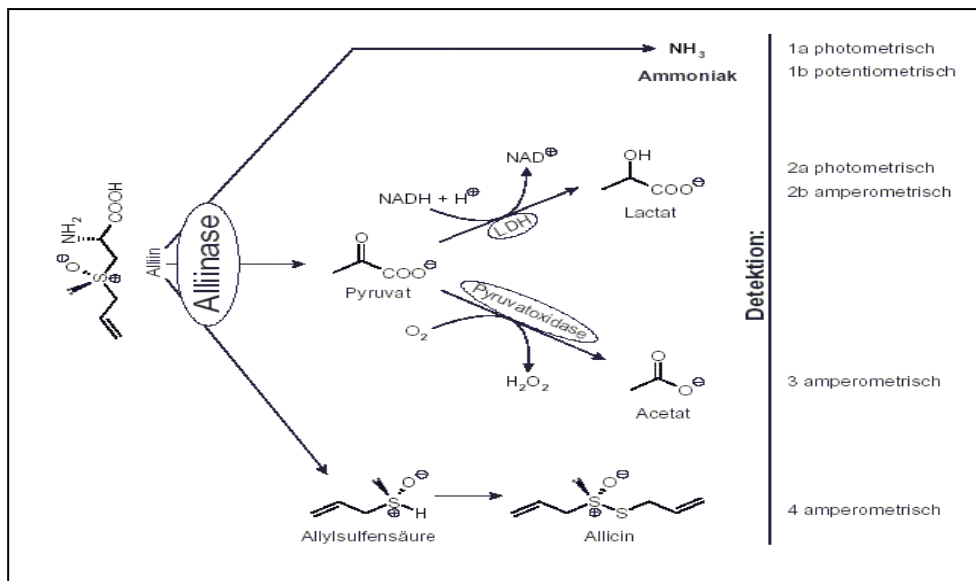


Abb. 3.1.1: Ammoniak-Freisetzung durch Alliinase (Krest 2000)

Der Aufbau der Anlage ist schematisch in Abb. 3.2 wiedergegeben.

Die Trägerlösung (Wasser oder Puffer) sowie die anderen Lösungen (15 mM OPA,

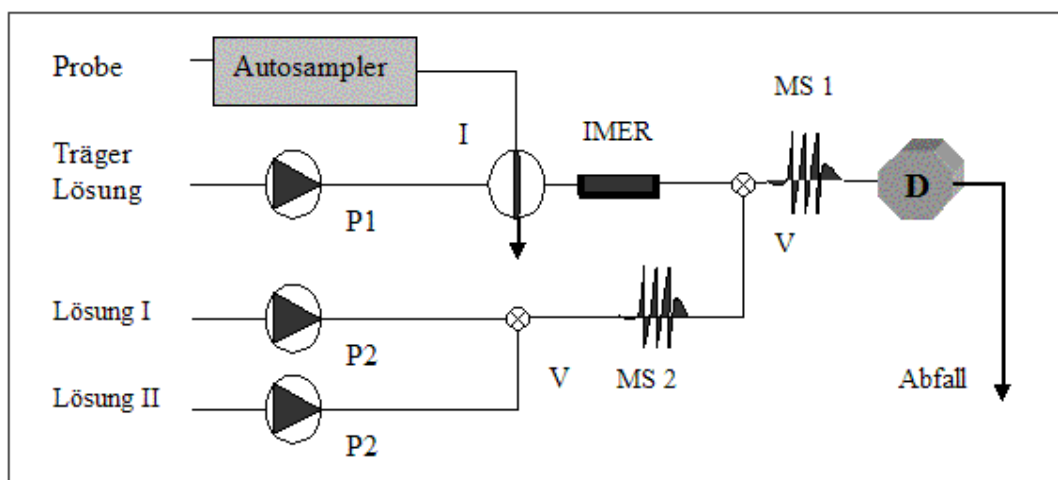


Abb. 3.2: Schematische Darstellung des Flow Injection Analysers (FIA). P 1,2: Pumpen, I: Injektionskammer, V: T-Stück, MS: Mischschleifen, IMER: Immobilisat-Enzymreaktor, D: Detektor

60 mM Thioglycolat; Lösung I und 0,8M Boratpuffer pH 12; Lösung II) werden mittels

Teflon PTFE ID 0,5 mm-Schläuche über peristaltische Pumpen (P1,P2) mit 0,1 ml/min transportiert und in der Mischschleife kontinuierlich vermischt.

Ein Autosampler entnimmt ein Probenvolumen aus 5 ml-Plastikröhrchen, die sich in einem 4x15 Aluminium-Rack befinden, und überführt die Probe in eine 40 µl Injektionsschleife. Der Rest wird zum Abfall weiter transportiert. Über die Trägerlösung werden die 40 µl Probenvolumen nach dem Zeitprogramm in dem Enzymreaktor IMER transportiert, wo die Umsetzung des Substrates (Cysteinsulfoxide) stattfindet.

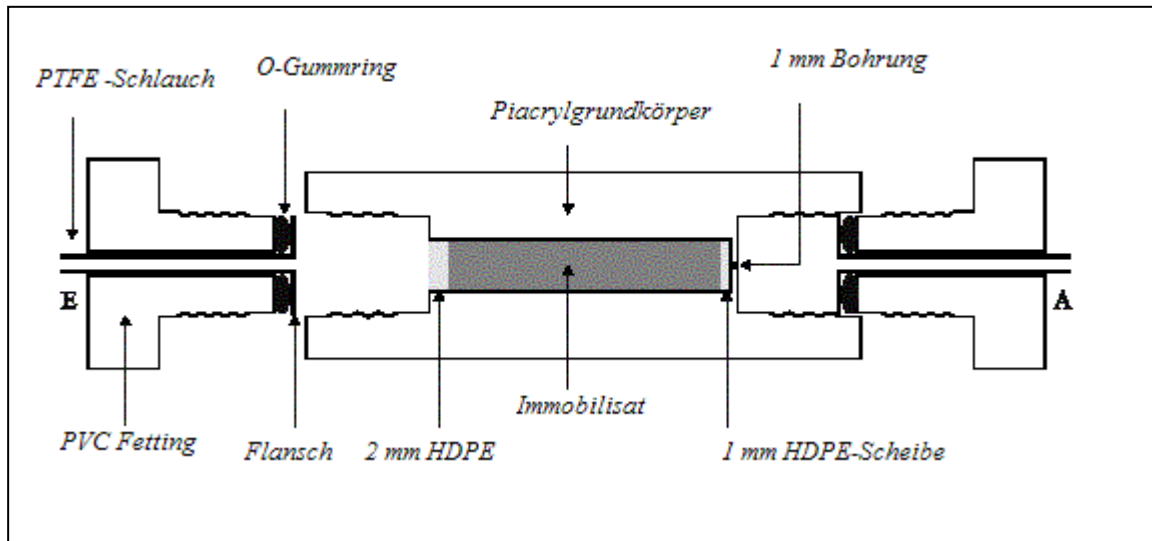
Der Enzymreaktor wurde zwischen dem Injektionsventil ( I ) und der ersten Mischschleife (MS1) eingeschaltet, wobei am Reaktorabfluss das entwickelte Ammoniak durch Zugabe der Hilfsreagenzien und durch Vermischen zu Isoindolderivaten (in MS1) umgewandelt wird. Das Isoindolderivat lässt sich bei 415 nm anregen und emittiert bei 485 nm (s. Abb.1.4 in der Einleitung). Die Ausbeute an Fluoreszenz wird dann durch den Fluoreszenzdetektor SFM-25 (Kontron, Milano, Italy) mit einer Durchflusszelle 20µl erfasst und in späteren Schritten über ein Computerprogramm aufgezeichnet und bewertet.

### **Enzymreaktor (IMER)**

Der immobilisat-Enzymreaktor IMER (Alliinase wurde an einen festen Träger immobilisiert) besteht aus drei Plexiglas-Hauptkomponenten.

Es handelt sich hierbei um einen Zylinder mit einem Innendurchmesser von 3 mm und einer Länge von 25 mm, an dessen beiden Enden sich 0,25 Zoll-Gewindeanschlüsse befinden, die für die darauf passenden PVC-Fittings der Ein- und Ausgangsschläuche vorgesehen sind.

Während Gummiringe zwischen das Fitting und die geflanschten Anschlussschläuche zur Abdichtung gelegt werden, wird das Immobilisat durch zwei poröse Polyethylenscheiben Porengröße (70 µm; Reichelt) zurückgehalten. (s. dazu Abb. 3.8.)



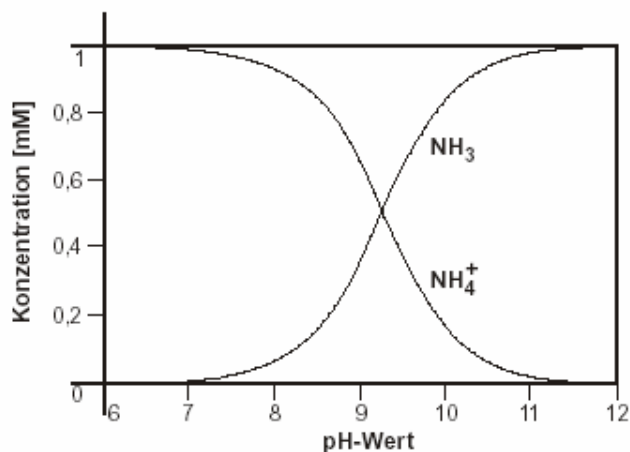
**Abb. 3.2.1:** Schematische Darstellung des Enzymreaktors (IMER), A: Ausgangsschlauch E: Eingangsschlauch, HDPE: poröses high density polyethylen, PTFE: Polytetrafluorethylen, PVC: Polyvinylchlorid

### 3.1.2 Immobilisierung

Die Konstruktion eines Biosensors basiert hauptsächlich auf dem Immobilisierungsverfahren, da eine Mehrfachverwendung des Enzymreaktors von Bedeutung ist. Da bei der Konstruktion eines Biosensors einige Anforderungen zu erfüllen sind, werden diesbezüglich ein paar wichtige Punkte in dieser Arbeit berücksichtigt und wie folgt erwähnt:

- Es muss ein ständiger Pufferstrom gewährleistet sein, damit sich keine Luftbläschen in den Bestandteilen der Durchflussapparatur festsetzen können.
- Eine Möglichkeit für Messungen ohne Enzymreaktor muss vorhanden sein, da einige Bestimmungen ohne Enzymreaktor durchgeführt werden können.
- Eine akzeptable Reproduzierbarkeit und Robustheit der Messungen ist notwendig, so dass eine mögliche starke Abhängigkeit von der Raumtemperatur und deren Auswirkung ausgeschlossen werden kann (Isolierung der Gerätekomponenten gegen äußere Einflüsse).

- Damit eine gute Empfindlichkeit erzielt werden kann, muss die vorgesehene Reaktion in die gewünschte Richtung katalysiert werden. „Verbrauch des gebildeten Adduktes Ammonium  $\xrightarrow{\text{Alkalisierung}}$  Ammoniak; also Ammoniak-Bildung katalysieren“



**Abb. 3.2.2:** pH-abhängiges Ammonium-Ammoniak Gleichgewicht. Das Verhältnis von Ammonium und Ammoniak ist exemplarisch für eine 1 mM Ammonium-Lösung abgebildet, mit steigendem pH-Wert (Krest 2000)

### 3.1.2.1 Alliinase Immobilisierung

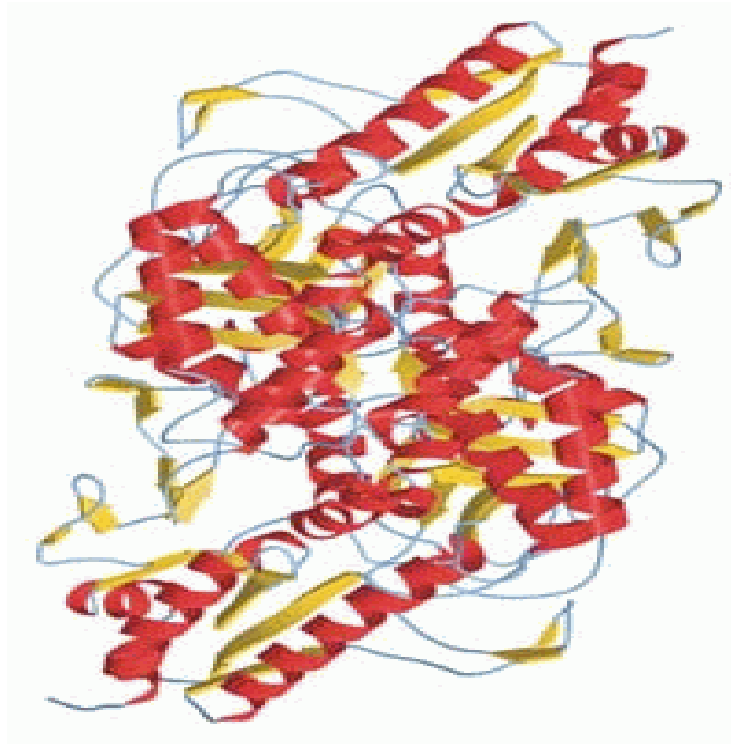
#### 3.1.2.1.1 Immobilisierung von Alliinase auf dem Träger lectin Concanavalin Agarose

Da die Knoblauch-Alliinase als Immobilisat eingesetzt werden musste, erhält ihre Charakterisierung für die Aufschlüsse ihrer molekularen Konfiguration eine größere Bedeutung; hierüber wurden bereits zahlreiche Arbeiten geschrieben. Nicht weniger wichtig ist die Verdeutlichung der Alliinasestruktur aus Knoblauch sowie der Träger Lectin, die zum besseren Verständnis der Immobilisierung dienen soll. Sie wird daher in den folgenden Absätzen kurz erläutert (Abb.3.3.).

Im Jahre 2002 zeigten Küttner und Weiss bei der Charakterisierung der Alliinase zwei identische Untereinheiten, die jeweils die Masse 53,5 k Dalton haben; diese gestalten P-5'-P abhängige Enzyme in ihrer aktiven Form, wobei jede Einheit der Knoblauch –Alliinase fest gebundene P-5'-P-Teile trägt.

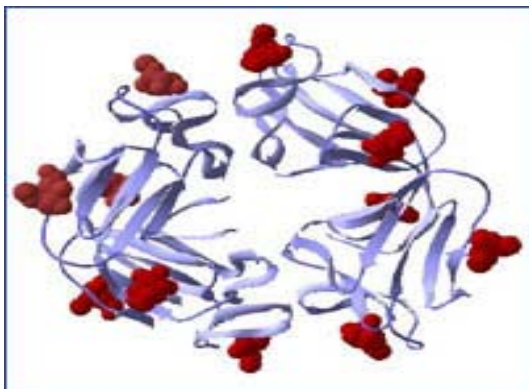


Während das pH-Optimum der Alliinase bei etwa 7 und außerhalb des pH-Bereiches von 4-9 inaktiv liegt, wird das Temperaturoptimum nach Jannis 1989 bei 35 °C und nach Nock et al. 1986 bei 23 °C erreicht.



**Abb. 3.3:** 3 D-Struktur des Alliinase-Dimers Knoblauch

Die Alliinase in der Glykoseitenkette verfügt über einen hohen Mannoseanteil (Nock et al. 1986). Deshalb lässt sich über diese Ketten eine stabile Komplexe mit dem Lektin Concanavalin A (ConA) bilden (Vektorlabs 1998). Das lässt sich mit der Glyco-Affinität erklären, über die Lektineinheiten in ConA verfügen (Abb. 3.4 aus den Samen der Jackbohne *Canavalia ensiformis*).



**Abb. 3.4:** Lektine-Komplex mit 12 Molekülen von Methylmannose

Aufgrund seiner Eigenschaft als Träger für die Immobilisierung von Allinase wird das Lektin auch für die Reinigung der Glykokonjugate aus biologischen Ressourcen als einfache Auftrennungstechnik verwendet, nämlich bei der Gewinnung von reinem Glykoprotein, Glykopeptiden oder Oligosachariden.

Nun wird der möglichst intakte Erhalt der Alliinase für den Einsatz in den nächsten Schritten der Enzym-Immobilisierung angegangen. Dafür wurde der einfache Weg für die Enzymextraktion nach Krest und Keusgen 1999, basierend auf Koch und Lawson, vorgenommen und umgesetzt. Denn die Gewinnung der Alliinase mit einem schnellen Verfahren ist ausgesprochen relevant. Das wurde in dieser Arbeit

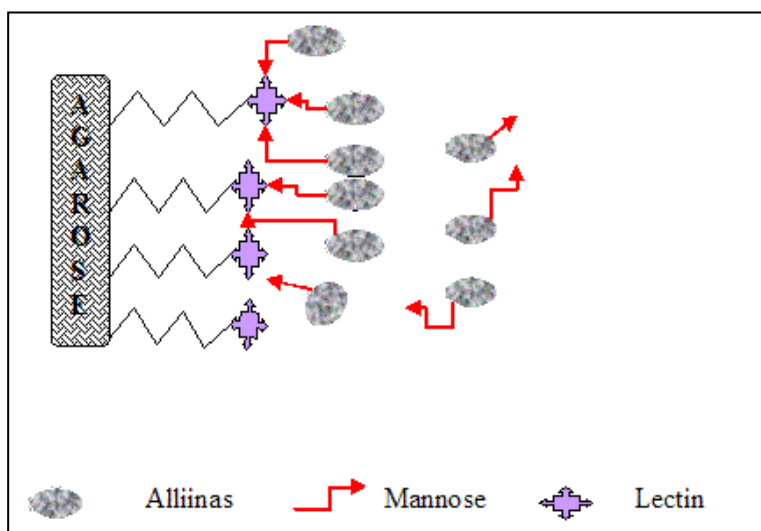
berücksichtigt und stellenweise modifiziert, wie in Kapitel 2.2 ausführlich beschrieben ist. Nach der Gewinnung des Alliinase-Rohextrakts, wie bereits im Kapitel „Material und Methoden“ beschrieben, wurde dieser **1:10** mit 60 mM Phosphatpuffer verdünnt und mit Hilfe einer peristaltischen Pumpe über die Träger (Lektin ConcanavalinA) gebracht.

Die Fließgeschwindigkeit der zu immobilisierenden Alliinase-Lösung von 0,1 ml/min sowie die Dauer von **40** min nach der Auftragung der Alliinase zur vollständigen Komplexbildung im Raumtemperatur erwiesen sich als geeignet. Als letzter Schritt wurde alle ungebundene Alliinase mit ConA-Puffer unter gleicher Geschwindigkeit wieder ausgespült. Somit wurde der Enzymreaktor einsatzbereit oder mit Lagerpuffer bis zum nächsten Einsatz im **4 °C** aufbewahrt.

Die spezifische Alliinase-Aktivität lag bei **200** nKat/mg aus den eingesetzten Knoblauchvarietäten, nämlich beim frischen Knoblauch (siehe Tab. 3.13).

Der pH7 des Con-A-Puffers begünstigt nach Vectorlabs 2004 bis zu vier mögliche freie Bindungsstellen und soll über keine gravierenden Änderungen in der Tertiärstruktur der Alliinase verfügen.

Eine schematische Darstellung der Immobilisierung ist in Abbildung 3.5 gezeigt.



**Abb. 3.5:** Schematische Darstellung der Alliinase-Bindung an ConA

Die als Träger herangezogene ConA-Agarose der Firma Sigma wurde bereits vom Hersteller auf gute Bindungseigenschaften hin optimiert, da sie bereits bei der Affinitätschromatographie erfolgreich verwendet wurde. Laut der Firma Vektorlabs 1998 kann bis 18 mg Protein/ml ConA gebunden werden, was bei einem

Molekulargewicht von 26 k Dalton pro Untereinheit Con-A einer Bindungskapazität von 0,7  $\mu\text{mol}$  entspricht.

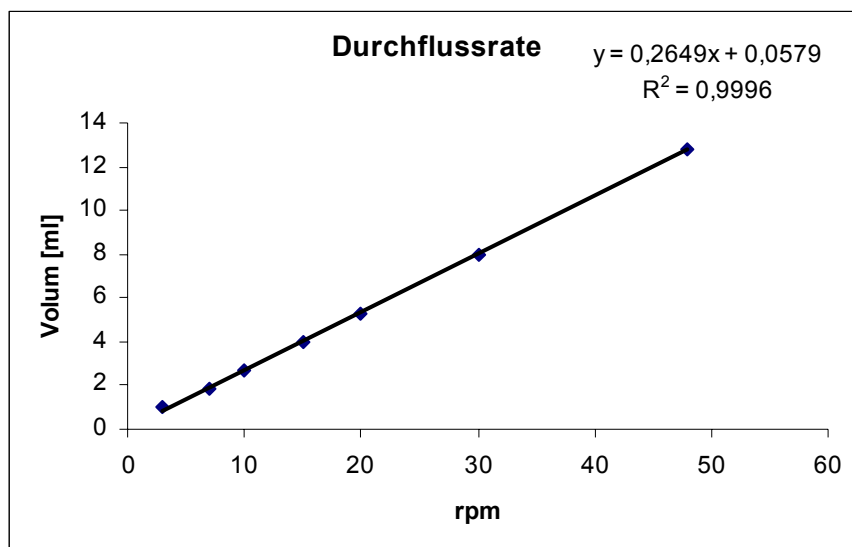
Die bereits erläuterten Fakten sowohl über das Immobilisat als auch über die Träger konnten zur erfolgreichen Immobilisierung führen. Eine Regenerierung der inaktiven Alliinase konnte sich durch eine neue unmittelbare Zugabe der Rohextraktlösung der Alliinase erneut in Überschuss bewähren und ermöglichte einen weiteren erfolgreichen Einsatz für nahezu 200 Messungen.

### 3.1.3 Optimierung der Betriebsparameter der FIA für die Ammoniakbestimmung.

Nach der Anordnung der Durchflussanalyseanlage, wie sie in Abb.3.2 dargestellt ist, wird auf verschiedene Parameter näher eingegangen, die für den Routinebetrieb optimiert werden müssen.

#### 3.1.3.1 Pumpdurchflussrate

Zunächst wurde die Durchflussrate bei den peristaltischen Pumpen je nach verwendetem Schlauchtyp so eingestellt, dass man die Durchflussrate in Abhängigkeit von der Umdrehungsanzahl pro Zeiteinheit bestimmen kann. Hierfür wurde ein Schlauch „0,51 mm Innendurchmesser Color Codes (Orange-gelb) Tygon® 3607/12 cm“ eingesetzt. Es ergab sich ein sehr guter linearer Verlauf mit hohem Bestimmtheitsmaß von „0,9996“ zwischen der Umdrehungszahl der Pumpe und dem geförderten Volumen (Abb.3.5).



Im nebenstehenden Diagramm ist eine proportionale Abhängigkeit zwischen der Umdrehungszahl der Pumpe (x-Achse) und dem Fördervolumen zu erkennen (y-Achse). Dieses war insbesondere für die Ermittlung des

**Abb. 3.6:** Die Abhängigkeit der Flussmenge an Flüssigkeit von der Anzahl der Umdrehungen der peristaltischen Pumpe

Totvolumens der Anlage von Bedeutung, welches zur Optimierung der Aufzeichnungsparameter der Anlage bekannt sein muss.

Eine Schwierigkeit ergab sich aber durch die Konstruktion der peristaltischen Pumpen. Der Riegel, der die Schläuche zwischen dem Pumpenkopf und den Riegelarmen (s. Abb.2.7 Material und Methoden) einschließt, musste durch Justierungsschrauben, die u. a. den Druck auf die Schläuche anpassen (was den Durchfluss des Liquides beeinflusst), immer neu eingestellt werden. Denn um die Lebensdauer der Schläuche zu verlängern, wurden die Verriegelungsarme nach jeder Analyse wieder entlastet und die Schläuche entspannt.

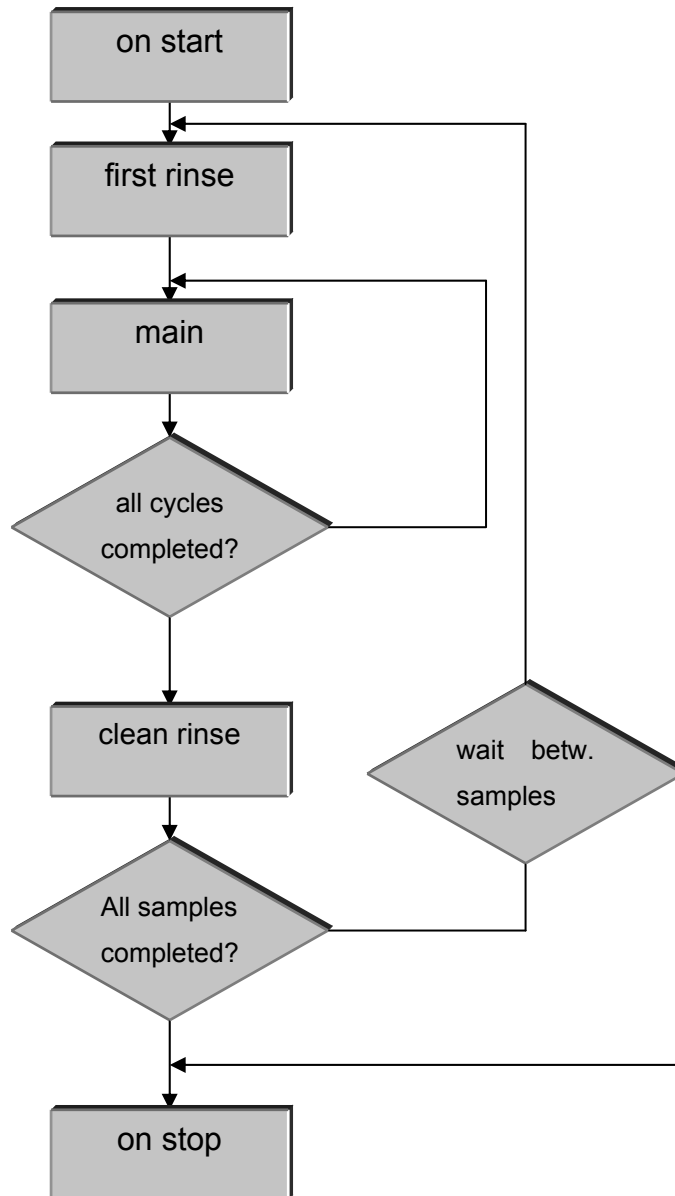
Das oben besprochene Problem führte natürlich zu unterschiedlichen Durchflussraten bei gleicher Einstellung der Umdrehungsanzahl pro Minute. Deshalb wurde bei der Erstellung des Steuerprogramms des FIA so vorgegangen, dass das Signal des Sensorgramms in der Betrachtung der X/Y-Werte (Abb.3.6) möglichst eine Symmetrie und eine akzeptable Totzeit erreichte und gleichzeitig die Empfindlichkeit aufrecht erhalten blieb.

Ein Steuerprogramm für die Bestimmung des Ammoniaks wurde mit der Betrachtung der wichtigen Parameter Totzeit, Empfindlichkeit und Durchflussrate empirisch wie in Tab.3.1 eingerichtet. Dieses Programm konnte die schematische Darstellung der Ablaufschemata des FIA in der Abbildung 3.7 übersetzen.

EXPORT DATE: XX.XX.03 11:10:02 [GENERAL] USER= FADI UNI [DESCRIPTION]  AMMONIAK	[AC]  1 Pumpe_2 rate 21 40 # 11 R 21 40 5 Sampler goto_position 10 1900 620 1000 # 11 P 10 1900 620 1000 12 Pumpe_2 start 21 # 11 S 21 1 Pumpe_2 hold 21 # 11 H 21
[AS] 1 Fluoreszenzdetektor current/mA 1 # 5 C 1 1 Fluoreszenzdetektor LED on # 5 I on 1 Sampler sampler_init 10 # 11 A 10 1 Sampler code 10 1 32 400 # 11 K 10 1 32 400 1 Injektionsventil_1 position 0 1 # 14 P 0 1 1 Pumpe_1 rate 20 10 # 11 R 20 10 1 Pumpe_1 start 20 # 11 S 20 1 Pumpe_2 rate 21 40 # 11 R 21 40 3 Sampler goto_position 10 1900 620 900 # 11 P 10 1900 620 900 50 Pumpe_2 start 21 # 11 S 21 1 Pumpe_2 hold 21 # 11 H 21 1 Pumpe_1 rate 20 2 # 11 R 20 2	[AO] 1 Injektionsventil_1 position 0 1 # 14 P 0 1 1 Pumpe_1 hold 20 # 11 H 20 1 Pumpe_2 hold 21 # 11 H 21 1 Sampler goto_position 10 0 0 0 # 11 P 10 0 0 0
[AF]  5 Sampler sample 10 @run_time_162 @run_time_163 # 11 G 10 @run_time_162 @run_time_163	
[AM] 5 Sampler goto_position 10 0 0 0 # 11 P 10 0 0 0 1 Pumpe_2 forward 21 # 11 F 21 2 Pumpe_2 hold 21 # 11 H 21 5 Sampler last_sample 10 # 11 O 10 50 Pumpe_2 forward 21 # 11 F 21 1 Pumpe_2 hold 21 # 11 H 21 5 Sampler goto_position 10 3875 120 500 # 11 P 10 3875 120 500 2 Pumpe_2 rate 21 40 # 11 R 21 40 50 Pumpe_2 backward 21 # 11 B 21 1 Pumpe_2 hold 21 # 11 H 21 1 Injektionsventil_1 position 0 2 # 14 P 0 2 90 Fluoreszenzdetektor \$sample 180 200 # 5 S 180 200 1 Pumpe_1 rate 20 3 # 11 R 20 3 90 Injektionsventil_1 position 0 1 # 14 P 0 1 1 Pumpe_1 rate 20 2 # 11 R 20 2	
<b>Tab. 3.1: Programm 1</b> für die fluorimetrische Bestimmung von <i>Ammoniak mit FIA</i>	

Während die Programmzeilen auf der linken Seite die Dauer der Ausführung des jeweiligen Befehls in Sekunden bestimmen, sind rechts der Code der jeweiligen Hardware und die Steuerungswerte je nach Komponente (Detektor, Pumpe, Autosampler...) aufgeführt.

Dieses Programm gilt für die Trägerlösung (Wasser) und weitere Fließmittelsysteme „15 mM OPA; 60 mM Thioglicolat als Lösung I“ und „0,8M Boratpuffer pH 12 als Lösung II“ mit Teflon PTFE ID 0,5 mm-Schläuchen über peristaltische Pumpen (P1, P2) mit 0,1 ml/min.

**Methodenablauf:**

**Abb. 3.7:** Schematische Darstellung des FIA-Ablaufmechanismus

### 3.1.3.2 Linearität, Nachweisgrenze und andere Messparameter

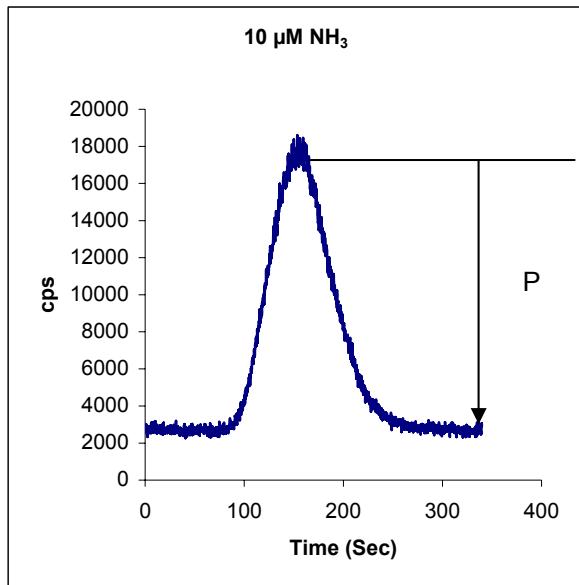
Die oben genannten Einstellungen führten zu einer guten **Verweil-** (180 sec.) und **Totzeit** (45 sec.) sowie einer geeigneten Empfindlichkeit.

Nach der Zusammenstellung der FIA-Komponenten, wie in Abschnitt 3.1.1 ohne den Einsatz des Enzymreaktors beschrieben, wurde die Nachweisgrenze des Ammoniaks ermittelt, indem man verschiedene Konzentrationen von Ammoniumsulfat (50 bis 0,1  $\mu\text{M}$ ) injizierte und mit Hilfe des o.g. Puffer-Systems (Fließmittel) fluorimetrisch detektierte.

Um einen Anhaltspunkt zu bekommen, welche Ammoniak-Konzentration mindestens nötig ist, um noch ein ausreichend hohes Signal zu erhalten, wurde die **Nachweisgrenze** mit einer Standard-Lösung bestimmt. Bei einer Injektionsmenge von 10  $\mu\text{M}$   $\text{NH}_3$  als Indikator in das Messsystem **OHNE** den Einsatz des Enzymreaktors lag das Signal/Rausch-Verhältnis bei 31, wobei das Rauschsignal etwa 200 CPS betrug. Die Nachweisgrenze (Signal/Rausch-Verhältnis 3) müsste demnach bei **0,87  $\mu\text{M}$   $\text{NH}_3$**  liegen. Unter den Versuchsbedingungen wurde quantitativ jedoch die kleinste Menge des zu vermessenden Ammoniaks bestimmt; sie lag bei **1  $\mu\text{M}$   $\text{NH}_3$**  und wurde als **Bestimmungsgrenze** definiert.

Die Reproduzierbarkeit für einen **Messbereich** von 1 bis 150  $\mu\text{M}$   $\text{NH}_3$  (schrittweise von 5 und 10) als höchste messbare Konzentration bewegte sich nach Ausschluss von Ausreißern im Bereich (2,92 – 6,60), sprich (0,02 - 0,07)  $\mu\text{M}$   $\text{NH}_3$  nach der Umsetzung in der unten stehenden Regression, wobei das **Bestimmtheitsmaß** ( $R^2$ ) für die lineare Abhängigkeit bei 0.998 lag (Tab. 3.1, Abb. 3.9.). Einen Überblick kann man sich auch in den Kalibrationstabellen der Ammoniakbestimmung verschaffen (Tab.2.3).

Das Signal der fluorimetrischen Messung bzw. des Sensorgramms ist z.B. 10  $\mu\text{M}$   $\text{NH}_3$ , wie in Abb. 3.8 dargestellt.



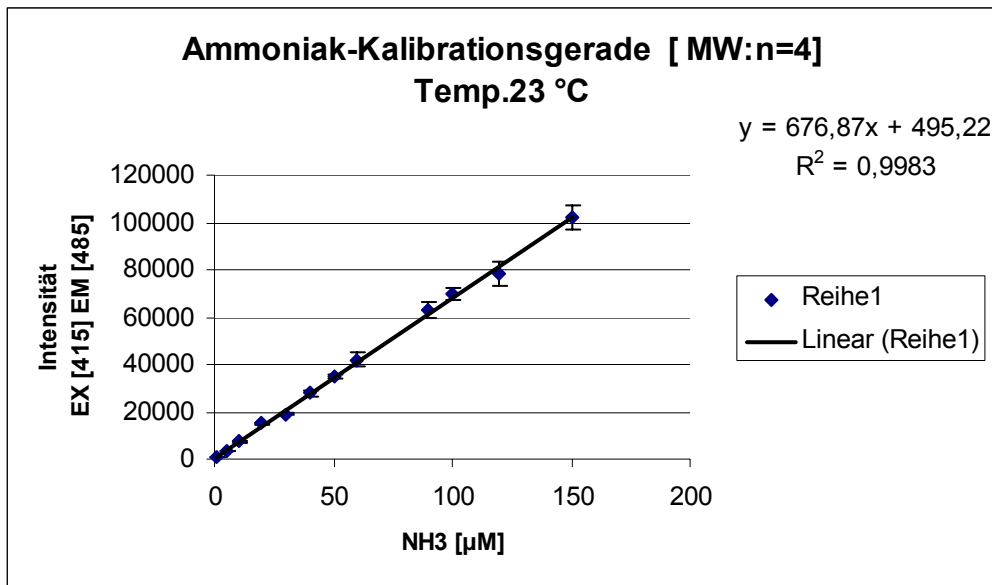
**Abb. 3.8:** Sensorgramm Darstellung für  $10\mu\text{M NH}_3$  bei FIA-Anlage (fluorimetrische Detektion). Cps: Capture per Second (sec)

Die Peakhöhe (**Ph**) anhand einer Kalibrationsgeraden, da sich die **Genauigkeit** ( $\pm 0.02\%$ ) bei der Berechnung nach der Peakhöhe als vorteilhaft erwies.

Die Peakhöhen waren proportional zur zunehmenden Ammoniakkonzentration und ergaben somit eine sehr gute **Linearität** mit einem **Korrelationskoeffizienten** (nach Pearson) **von 0,999**, was den sehr guten linearen Zusammenhang der X- und Y-Werte ausdrückt (Abb. 3.9).

Das Sensorgramm wird über einen bestimmten Zeitraum erfasst. In diesem Beispiel hat man innerhalb etwa 4 Minuten die Analyse zu Ende gebracht und eine Zeiteinsparung im Vergleich zu anderen Messmethoden erzielt, welche bei Biosensoren üblich sind. Die Auswertung erfolgt nach der





**Abb. 3.9:** Eichgerade des Ammoniak; cps: Einheitsaufnahme pro

NH <sub>3</sub> Konz.(µM)	<b>Tab.3.2</b> <i>Integration der Peakhöhen/cps, wobei MW: Mittelwert; M: Messung; STABW: Standardabweichung, Die u.g. Werte sind Messsignale cps (count per second) der equivalenten Konzentrationen</i>						
	M1	M2	M3	M4	MW	STABW	% STABW
1	780,03	804,52	796,17	862,68	810,85	36,02	4,44
5	3164,07	3118,54	3336,13	3203,23	3205,49	93,72	2,92
10	7778,56	7332,60	8117,06	7157,89	7596,53	434,42	5,72
20	15116,83	14299,30	15562,86	15344,08	15080,77	551,89	3,66
30	18453,36	19288,56	19540,61	18334,96	18904,37	600,01	3,17
40	27761,16	26303,10	28753,29	28045,56	27715,78	1030,03	3,72
50	34049,71	33829,52	35684,33	35647,49	34802,76	1000,84	2,88
60	45409,37	40309,54	42632,40	38518,65	41717,49	2982,28	7,15
90	61410,71	62016,54	68148,46	60611,14	63046,71	3449,53	5,47
100	69391,20	71090,23	71792,24	66404,51	69669,55	2398,76	3,44
120	75575,79	78225,10	86029,78	74579,53	78602,55	5184,98	6,60
150	98904,17	102825,63	98500,42	109171,97	102350,55	4948,35	4,83

Die Tabelle 3.2 zeigt eine vierfach fluorimetrische Bestimmung der Ammoniak-Konzentration in 1;5 ;10.....150 µM Ammoniumsulfatlösung sowie die Mittelwerte und die Standardabweichungen.



in Tab.3.1 erreicht worden waren. Empirisch erwiesen sich die folgenden Reaktionsbedingungen als geeignet:

- [0,1ml/min] als Durchflussgeschwindigkeit für
  - 1- Trägerlösung: Ammoniak-freies Wasser;
  - 2- Lösung I 15 mM OPA; 0,8 M Boratpuffer pH 12
  - 3- Lösung II 60 mM Thioglicolat, das über 0.5 mm- ID Teflon PTFE-Schläuche durch die peristaltischen Pumpen (P1, P2) gefördert wird
- pH-Wert von 10,5 für die OPA-Thiol- und primäre Amin- bzw. Ammoniak-Reaktion eingestellt werden sollte.

Der Mechanismus des Ablaufs der Reaktionen in der Anlage wurde bereits im vorhergehenden Abschnitt ausführlich erläutert.

### **3.1.4 Fluorimetrische Bestimmung der Cysteinsulfoxiden in Lauchgewächsen**

In der vorliegenden Arbeit wurde der Gehalt an Ammoniak in Lauchgewächsen bestimmt, denn der Gesamtgehalt an Cysteinsulfoxiden [CS oder CSO] stand im Fokus der Analyse. Darüber hinaus ist Ammoniak ein wichtiges Produkt vieler Enzymreaktionen, wobei dessen Detektion eine Bedeutung hat bei der Bestimmung von Aminosäuren und anderen N-haltigen Metaboliten sowie bei einer Vielzahl von unterschiedlichen Proben.

Eine quantitative Bestimmung der CS basiert auf einer fluorimetrisch-enzymatischen Ammoniak-Detektion (Reaktion 3.1).

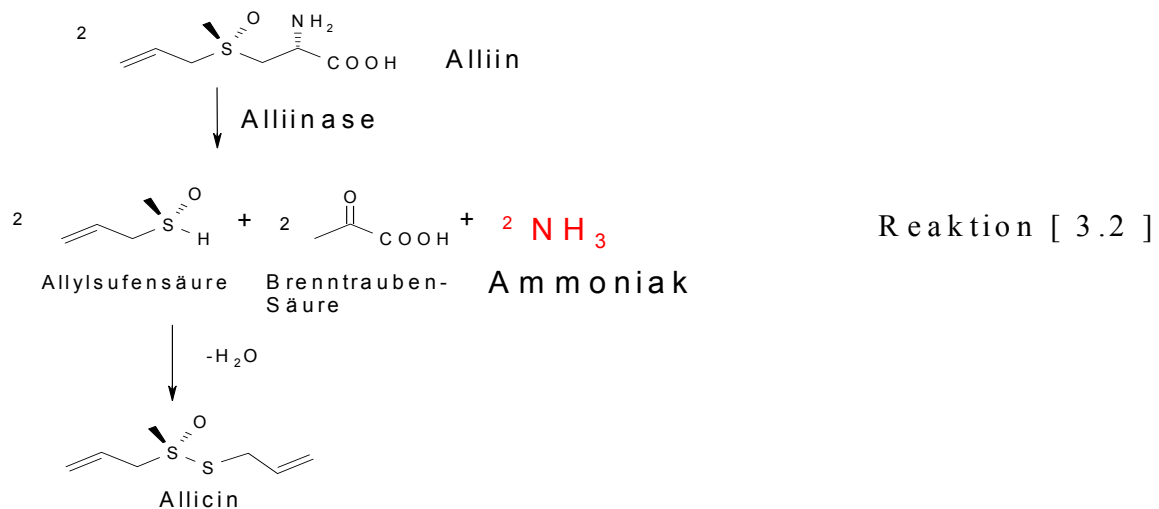
Da sich eine gewisse Ammonium-Konzentration im Gewebe der Lauchgewächse befindet (genuines Ammonium), erschien es als sinnvoll, - insbesondere um reproduzierbare Ergebnisse zu erzielen - enzymatisch von nicht enzymatisch gebildetem Ammoniak separat zu bestimmen.

Dafür wurde zunächst die FIA- Anordnung wie in Abbildung 3.2 eingerichtet. Ausgenommen war lediglich der Enzymreaktor, der nach dem Steuerprogramm in Tab. 3.1 in Betrieb genommen wurde. Eine Eichgerade wurde sowohl für Ammoniak als auch für Alliin angelegt und anhand derer die Cysteinsulfoxide errechnet.

### 3.1.4.1 Fluorimetrische Bestimmung von Alliin

Unter der Cysteinsulfoxiden, wie in der Einleitung ausführlicher geschildert, dominiert u.a. das Alliin als sulfoxidhaltige Aminosäure, das sich durch C-S-Lyase-Enzyme abbauen lässt.

Das C-S-Lyase-Enzym wurde mit Hilfe des sehr flexiblen Durchflussanalyzesystems im Reaktor immobilisiert (siehe Immobilisierung-Abschnitt). Ein Überblick über die enzymatische Umsetzung des Alliin ist der Reaktion 3.2 zu entnehmen.



Stoll u. Seebeck 1947, 1948, konnten feststellen, dass die zweimal Alliin eine stabile Vorstufe von Allicin ist, welches in der Pharmazie und in der Ernährung eine wichtige Rolle spielt.

Um das Alliin zu bestimmen, wurde zunächst der Enzym-Reaktor bei 23°C temperiert, mit Biosensorpuffer konditioniert und in die FIA-Anlage genau hierfür angeordnet, wie in Abb.3.2 eingebaut.

Eine wesentliche Modifizierung des Ammoniaksteuerprogramms konnte bezüglich der Verweilzeit der Messung und des angemessenen Sensorgramms erreicht werden (Tab.3.3.). Dabei ergibt sich eine Totzeitverschiebung von etwa 60 Sekunden; diese lässt sich natürlich durch das größere Totvolumen erklären, das durch die **Enzymkartusche** verursacht worden ist.

EXPORT DATE: XX.XX.03 11:10:02 [GENERAL] USER= FADI UNI [DESCRIPTION]  <b>CYSTEINSULFOXIDEN</b>  [AS] 1 Fluoreszenzdetektor current/mA 1 # 5 C 1 1 Fluoreszenzdetektor LED on # 5 I on 1 Sampler sampler_init 10 # 11 A 10 1 Sampler code 10 1 32 400 # 11 K 10 1 32 400 1 Injektionsventil_1 position 0 1 # 14 P 0 1 1 Pumpe_1 rate 20 10 # 11 R 20 10 1 Pumpe_1 start 20 # 11 S 20 1 Pumpe_2 rate 21 40 # 11 R 21 40 3 Sampler goto_position 10 1900 620 900 # 11 P 10 1900 620 900 50 Pumpe_2 start 21 # 11 S 21 1 Pumpe_2 hold 21 # 11 H 21 1 Pumpe_1 rate 20 2 # 11 R 20 2  [AF]  5 Sampler sample 10 @run_time_162 @run_time_163 # 11 G 10 @run_time_162 @run_time_163	[AC]  1 Pumpe_2 rate 21 40 # 11 R 21 40 5 Sampler goto_position 10 1900 620 1000 # 11 P 10 1900 620 1000 12 Pumpe_2 start 21 # 11 S 21 1 Pumpe_2 hold 21 # 11 H 21
[AM]  5 Sampler goto_position 10 0 0 0 # 11 P 10 0 0 0 1 Pumpe_2 forward 21 # 11 F 21 2 Pumpe_2 hold 21 # 11 H 21 5 Sampler last_sample 10 # 11 O 10 50 Pumpe_2 forward 21 # 11 F 21 1 Pumpe_2 hold 21 # 11 H 21 5 Sampler goto_position 10 3875 120 500 # 11 P 10 3875 120 500 2 Pumpe_2 rate 21 40 # 11 R 21 40 50 Pumpe_2 backward 21 # 11 B 21 1 Pumpe_2 hold 21 # 11 H 21 1 Injektionsventil_1 position 0 2 # 14 P 0 2 350 Fluoreszenzdetektor sample 550 200 # 5 S 180 550 1 Pumpe_1 rate 20 1 # 11 R 20 1 200 Injektionsventil_1 position 0 1 # 14 P 0 1 1 Pumpe_1 rate 20 3 # 11 R 20 3	[AO]  1 Injektionsventil_1 position 0 1 # 14 P 0 1 1 Pumpe_1 hold 20 # 11 H 20 1 Pumpe_2 hold 21 # 11 H 21 1 Sampler goto_position 10 0 0 0 # 11 P 10 0 0 0

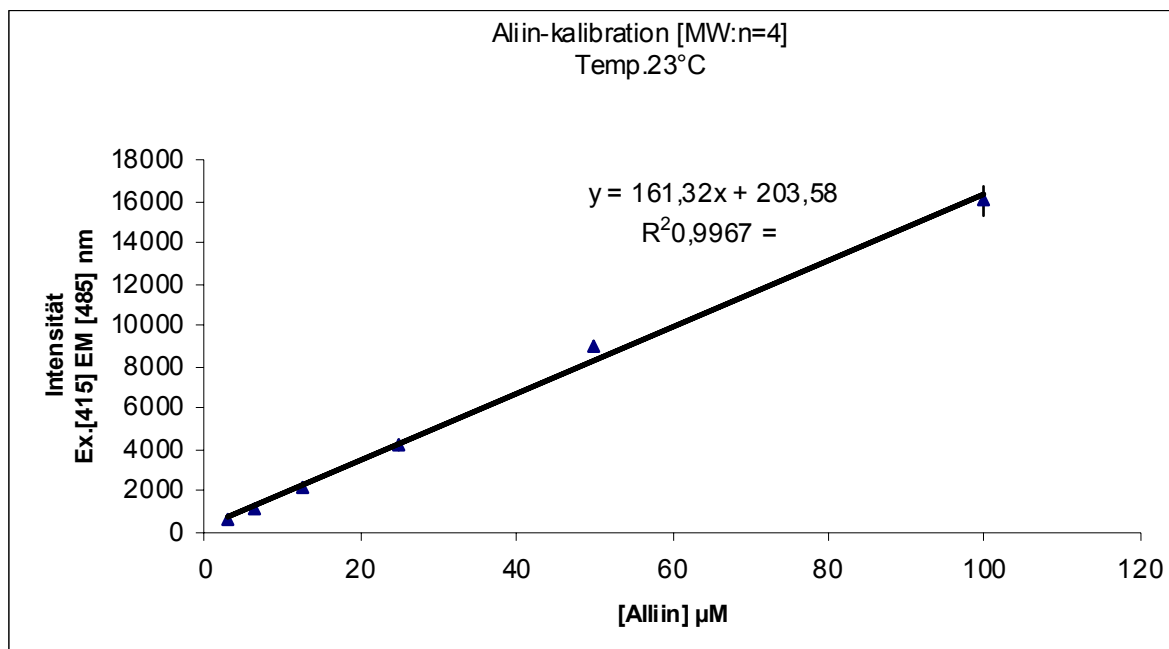
**Tab. 3.3: Programm 2** für die fluorimetrische Bestimmung der *Cysteinsulfoxiden mit FIA*

Mit dem Programm (Tab. 3.3) konnten Alliin (in Standardlösung & Proben) und andere Cysteinsulfoxide, die im Knoblauch vorkommen können, vermessen werden. Zunächst wurde L+(-) Alliin (S-2-Propenyl-S-oxy-L-Cystein) in unterschiedlichen Konzentrationen (3, 6,....100) angesetzt und hinsichtlich Temperierung und Konditionierung analysiert. Die Messungen wurden vierfach durchgeführt; eine angemessene **Linearität** konnte mit einem **Bestimmtheitsmaß** von **0.996** erreicht werden (Abb. 3.10).

Für eine signifikante Nachweisgrenze sollte das Signal/Rausch-Verhältnis analog zur Ammoniakbestimmung bei 3 liegen. Hierzu wurde für das Alliin ebenso das

Verhältnis ermittelt. Das Verhältnis für eine Injektion von 10  $\mu\text{M}$  Alliin lag bei 11. Demnach müsste die **Nachweisgrenze** bei etwa **2,7 $\mu\text{M}$**  liegen. Während der **Bestimmungsgrenze** für das Alliin mit **3  $\mu\text{M}$**  definiert. Die Übereinstimmung von Resultaten bei mehrfacher Bestimmung eines Tests aus einer gleichen homogenen Probe offenbarte die Sicherheit für eine sehr gute **reproduzierbare** Messmethode. So wurden zahlreiche Knoblauchproben, wie in den nächsten Abschnitten beschrieben wird, in sehr kurzer Zeit auf ihren Inhalt von Cysteinsulfoxiden bestimmt.

L+(-) Alliin ( $\mu\text{M}$ )	<b>Tab.3.4:</b> <i>Integration der Peakhöhen/cps, wobei MW: Mittelwert; M: Messung; STABW: Standardabweichung</i>						
	<i>Die u.s. Werte sind Messsignale cps (count per second) der äquivalenten Konzentrationen</i>						
	M1	M2	M3	M4	MW	STABW	% STAW
3	491,8	566,29	509,36	556,66	531,03	36,1	6,80
6	1149,63	1222,43	1090,33	1101,52	1140,98	60,09	5,27
13	2162,35	2168,4	2190,56	2025,48	2136,7	75,13	3,52
25	4561,72	4001,28	4002,25	4246,98	4203,06	265,58	6,32
50	8749,42	9239,72	8660,97	9105,25	8938,84	277,68	3,11
100	16824,73	15558,31	16448,17	15285	16029,05	726,63	4,53

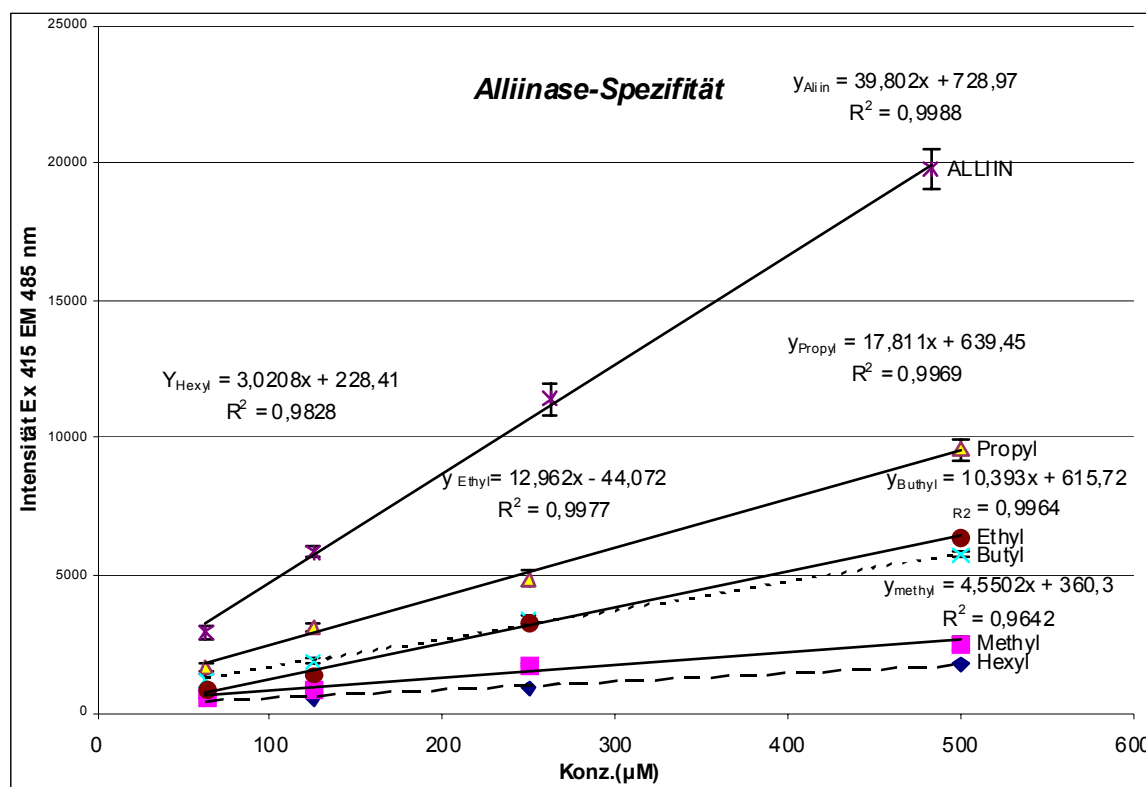


**Abb. 3.10** Kalibrationsgerade von L+(-) Alliin bei 485 nm Aufgekommen

### 3.1.5 Alliinase-selektivität bei der biosensorischen Bestimmung der Cysteinsulfoxide

Um eine Aussage über die Affinität der Knoblauchalliinase unter biosensorischen Betriebsbedingungen zu den unterschiedlichen vorkommenden Cysteinsulfoxiden treffen zu können, wurden zunächst definierte Konzentrationen der folgenden Cysteinsulfoxide [S-Alk(en)yl-L-cystein-S-oxid] unter einheitlichen Versuchsbedingungen analysiert und in Abb. dargestellt. Die Cysteinsulfoxide wurden in der Arbeitsgruppe von Keusgen 1999 synthetisiert und für die Bestimmung der Alliinase-Selektivität eingesetzt.

(±) S-Methyl-L-Cystein-S-oxid	[ 61 % (-), 38,9(+), MW152,0 C <sub>4</sub> H <sub>10</sub> O <sub>3</sub> NS]
(±) S-Ethyl-L-Cystein-S-oxid	[ 47,5 % (-), 52,5(+), MW166,0 C <sub>5</sub> H <sub>12</sub> O <sub>3</sub> NS]
(±) S-Propyl-L-Cystein-S-oxid	[ 38,5 % (-), 64,5(+), MW 180,0: C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> O <sub>3</sub> NS]
(±) S-Propenyl-L-Cystein-S-oxid	[ 38,5 % (-), 64,5(+), MW 186,0: C <sub>6</sub> H <sub>11</sub> O <sub>3</sub> NS*1/2H <sub>2</sub> O]
(±) S-Butyl-L-Cystein-S-oxid	[ 50,9 % (-), 49,9(+), MW 196,0: C <sub>7</sub> H <sub>16</sub> O <sub>3</sub> NS]
(±) S-Hexyl-L-Cystein-S-oxid	[ 47,5% (-), 52,5(+), MW 222,0 : C <sub>9</sub> H <sub>20</sub> O <sub>3</sub> NS]



**Abb. 3.11:** Alliinase –Selektivität bei den unterschiedlichen CS. Von oben nach unten (Alliin) S-Propenyl-, S-Propyl-, -Ethyl-, -Butyl-, -Methyl-, -Hexyl-L-Cystein-S-S-Oxid; Tab.3.5

Es wurden von jedem der oben aufgelisteten Cysteinsulfoxide vier Konzentrationen (62,5; 125; 250; 500  $\mu\text{M}$ ) angesetzt und analysiert.

Aus Abb.3.11 konnte man leicht das Alliin als bestgeeignetes bzw. am schnellsten umzusetzendes Substrat verzeichnen. Das lässt sich unter Berücksichtigung der Konfiguration des Aktiven Zentrums der Alliinase erklären. Denn als Ausgangsvoraussetzung der Analyse unterlagen alle angesetzten Derivate der Cysteinsulfoxide denselben Bedingungen, die auf einen Katalysator Einfluss nehmen können, wie z.B. umgebendes Medium, Puffersystem, pH-Wert, Ionenstärke etc. Folglich bleibt, die Wechselwirkung Enzym-Substrat als dominierenden Einflussfaktor herauszustellen. Denn je passender ein Substrat sich im aktiven Zentrum des Enzyms andockt, umso schneller wird es umgesetzt.

Das übersetzt sich im Falle des Alliin „1“ am schnellsten, gefolgt von Propyl-L Cystein S-S-Oxid „2“. Unmittelbar darunter, in fast gleicher Geschwindigkeit umgesetzt, liegt das Butyl-/Ethyl L Cystein S-S-Oxid „3“. Vorletztes in der absinkende Umsetzungsgeschwindigkeit ist das Methyl-Derivat „4“, und abschließend als das langsamste erweist sich Hexyl-L Cystein S-S-Oxid „5“. Die Linearität blieb für alle umgesetzten Derivate relativ unverändert bestehen.

Die Messwerte bzw. deren Standardabweichung sind in Tab. 3.5 zusammengestellt.



<b>Tab.3.5 Alliinase-Selektivität beim Ansatz von unterschiedlichen Cysteinsulfoxiden.</b>					
<i>Integration der Peakhöhen/cps., wobei MW: Mittelwert; M: Messung; STABW: Standardabweichung bedeuten. Die Werte sind Messsignale cps (count per second) der äquivalenten Konzentrationen</i>					
Hexyl.CS					
Konz.(µM)	M1	M2	M3	MW	% STABW
500	1608	1708	2009	1775	11,76
250	1014	864	885	921	8,82
125	521	600	501	540,67	9,68
62,5	454	422	651	509	24,36
Methyl.CS					
Konz.(µM)					
500	2360	2761	2492	2537,67	8,05
250	1736	1740	1780	1752	1,39
125	671	1048	833	850,67	22,23
62,5	632	515	553	566,67	10,53
Propyl.CS					
Konz.(µM)					
500	9973	9608	9215	9598,67	3,95
250	5065	5012	4582	4886,33	5,42
125	3031	3247	3045	3107,67	3,89
62,5	1764	1498	1727	1663	8,66
Butyl.CS					
Konz.(µM)					
500	5853	5664	5703	5740	1,74
250	3561	3272	3340	3391	4,46
125	1876	1796	1996	1889,33	5,33
62,5	942	1336	1280	1186	17,97
Etyl.CS					
Konz.(µM)					
500	6374	6278	6623	6425	2,77
250	3175	3572	3092	3279,67	7,82
125	1426	1305	1500	1410,33	6,98
62,5	643	979	960	860,67	21,93
Propenyl.CS					
Konz.(µM)					
500	19444	19356	20611	19803,67	3,54
250	10828	11926	11512	11422	4,85
125	5827	5700	6071	5866	3,21
62,5	2867	3231	2721	2939,67	8,93

### 3.1.6 Bestimmung der Cysteinsulfoxide in *Allium sativum* (Knoblauch)

Um eine Bestimmung des gesamten Gehalts an CS zu ermöglichen, wurde zunächst 1-3 g frischer Knoblauchzehen entnommen und aufgearbeitet (in Material und Methoden ausführlich erklärt).

In gelöster Form (Biosensorpuffer) werden die Proben aus im 4x15-Rack stehenden 5 ml-Plastikröhrchen vom FIA- Injektor entnommen und analysiert.

Zwecks möglichst einheitlicher Laufparameter bei der Bestimmung der CS für die unterschiedlichen Knoblauchproben wurden die Proben permanent in Gruppen mit jeweils einem Kalibrationssatz analysiert.

Diese Bestimmung umfasste den absoluten Gesamtgehalt der in den Proben vorhandenen Cysteinsulfoxide. Zunächst musste hierzu jedoch das genuine Ammoniak bestimmt werden, welches sich in der Probe befindet. Anschließend wurde durch den Einsatz des Alliinase-Enzymreaktors enzymatisch gebildetes Ammoniak bestimmt, welches infolge der Umsetzung der vorhandenen Cysteinsulfoxide entstand (Kaskade 3.2).

Die Differenz zwischen den beiden Werten ergibt dann den absoluten Gehalt an CS.

Die bearbeiteten Proben stammten zum großen Teil aus der Untergattung *Allium*. (Etwa 50 Proben *Allium sativum* und 12 Proben von gezüchteten und unterschiedlichen Wildarten, die zu unterschiedlichen Sektionen gehören, wurden untersucht. Die Proben lagen, soweit nicht anderes erwähnt, in Zwiebelform als Speicherorgan der untersuchten Pflanze vor).

### 3.1.7 Quantitative Bestimmung der Cysteinsulfoxide in *Allium*-Hybriden mittels FIA

Es wird nachfolgend über die CS-Ergebnisse der gezüchteten Arten berichtet, welche auch mittels HPLC als Kontrollversuch analysiert worden sind.

In den folgenden Tabellen wurden die gesamten Cysteinsulfoxide in Relation (Prozent) zu der Einwaage des Pflanzenmaterials angegeben. Auch so standen die Werte von mindestens einer dreimaligen Vermessung der einzelnen Proben zur Verfügung, welche eine statistische Auswertung ermöglichten.

Die Proben sind analog zu den Angaben der Gaterslebener Ak.-Nummern (Akzession) angeliefert, bezeichnet und datiert worden. Dementsprechend sind, in Klammern angefügt, Erntemonate und Jahre unverändert übernommen worden.

*Allium cepa* wurde mit *Allium A. kermesinum* gekreuzt und die Probenbezeichnung wie folgt gegeben „*Allium cepa* x *A. kermesinum* All 1096“ und „am 07- 02 geerntet“.

Dementsprechend sind auch alle anderen Proben bezeichnet.

1- <i>Allium cepa</i> x <i>oschanini</i>	k 9522 (07-02)
2- <i>Allium "proliferum"</i> (Etagezwiebel Basalteil)	All 227/6 (07-02)
3- <i>Allium "proliferum"</i> (Etagezwiebel Etageenteil)	All 227/6 (07-02)
4- <i>Allium cepa</i> x <i>A. kermesinum</i>	All 1096 (07-02)
5- <i>Allium cepa</i> x <i>A. kermesinum</i>	All 1098 (07-02)
6- <i>Allium cepa</i> x <i>A. kermesinum</i>	All 1099 (07-02)
7- <i>Allium cepa</i> x <i>A. kermesinum</i>	All 1101 (07-02)
8- <i>Allium cepa</i> x <i>A. kermesinum</i>	All 1456 (07-02)
9- <i>Allium cepa</i> x <i>A. kermesinum</i>	All 1519 (07-02)

**Tab.3.5 Die relativen gesamten Cysteinsulfoxiden [CS] % in neu gezüchteten *Allium* Arten (bezogen auf die Einwaage des Pflanzenmaterials).**

*Integration der Peakhöhen/cps, wobei MW: Mittelwert; M: Messung; STABW: Standardabweichung. Die Werte sind Messsignale cps (count per second) der äquivalenten Konzentrationen*

<i>Allium</i> _Akk.	M1	M2	M3	M4	STABW	MW	Einwaage (mg)	[CS] %	Genuine [NH <sub>3</sub> ] %	[CS] STABW %
1	4990,4	5473,75	4820,47	5020	279,26	5076,15	285,5	0,18	0,003	0,0088
2	5233,21	5838,96	5124,23	5210,28	328,22	5351,67	364,5	0,15	0,002	0,0067
3	7110,64	7167,01	7470,00	6864,34	248,99	7152,91	366	0,20	0,003	0,0070
4	8843,01	8528,33	6019,01	8001,44	1267,70	7847,86	360,5	0,23	0,003	0,0025
5	8635	8805,58	7694,03	8229,97	494,35	8341,14	381,5	0,20	0,006	0,0057
6	13744,72	13392,4	14280,73	12698,99	663,12	13529,21	391	0,37	0,003	0,0049
7	7432,65	7638,46	7671,44	7348,52	157,02	7522,76	358,5	0,22	0,002	0,0076
8	15278,27	14947,21	16780,74	14813,88	905,11	15455,02	351,5	0,49	0,003	0,0043
9	8736,79	8762,24	8219,02	8397,91	265,10	8528,99	367	0,25	0,002	0,0069

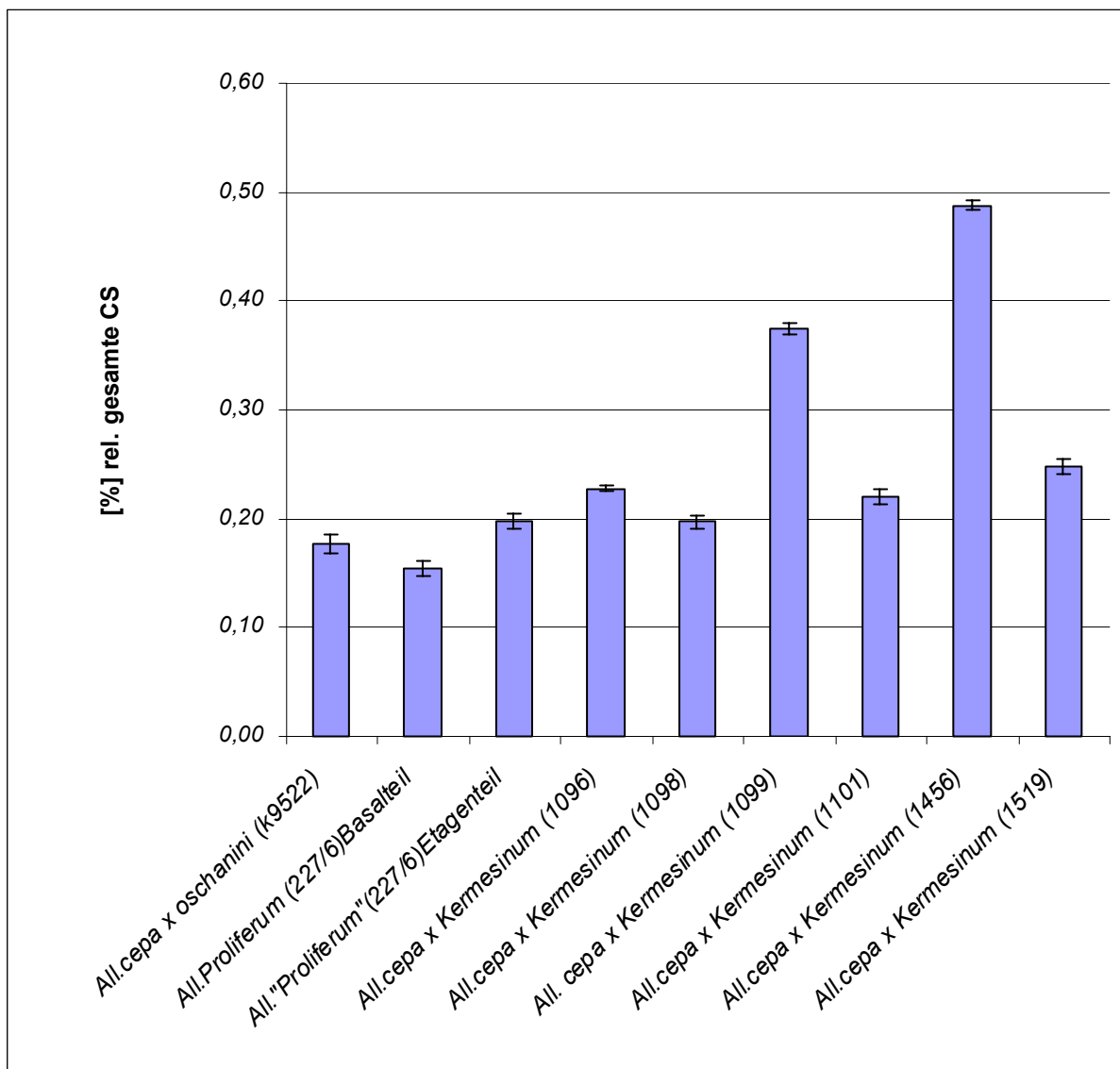
1-*Allium cepa* x *oschanini* (k9522), 2- *Allium proliferum* (All 227/6 Basakteil), 3- *Allium proliferum* (All 227/6 Etageenteil), 4- *Allium cepa* x *A. kermesinum* (All 1096), 5-*Allium cepa* x *A. kermesinum* (All 1098), 6- *Allium cepa* x *A. kermesinum* (All 1099), 7- *Allium cepa* x *Allium kermesinum* (All 1101), 8- *Allium cepa* x *A. kermesinum* (All 1456), 9- *Allium cepa* x *A. kermesinum* (All 1519).

Aus der Tabelle 3.5 ist ersichtlich, dass die untersuchten Hybriden einen CS-Gehalt im Bereich von 0,15 % ( $\pm 2\%$ rel.) bis 0,49 % ( $\pm 3\%$ rel.) aufweisen. Während alle Hybriden über 0,1 % CS liegen, nähern sich Hybriden wie (k9522) bzw. (1096), (1098) und (1519) dem Gehalt 0,2 % CS, wobei die höchsten Werte in diesem Ansatz bei dem Hybrid: *Allium cepa* x *A. kermesinum* All (1465) von 0,49 % ( $\pm 0,43\%$  rel.) auftraten, gefolgt von dem Hybrid (1099): *All. cepa* x *All. kermesinum* von 0,37 % ( $\pm 0,49\%$ rel.). Das *All. proliferum* „Etagezwiebel“ stammt ebenfalls aus dem Hybrid *All. fistulosum* L. x *cepa* und lag auch wie die anderen Hybriden in der gleichen Größenordnung; jedoch offenbarten sich, wie erwartet, minimale Unterschiede zugunsten der Etageanteile, etwa 0,05 % des CS-Gehaltes in seinen untersuchten Teilen.

Die Schwankung um den Gehalt 0,2 % CS ist typisch für die Art *Allium cepa*; jedoch kann die mögliche Absenkung oder der Anstieg des CS-Gehaltes wie bei Hybriden (2), (6) oder (8) auf der möglichen Variabilität der Einflüsse der jeweiligen Vegetation und der Pflanzensippen beruhen. Denn eine Steigerung des Gehalts an

Cysteinsulfoxiden und der damit verbundenen Heilwirkung wird unter anderem durch Kreuzungen erzielt und begünstigt.

Die aufgelisteten Werte in der Tabelle 3.5, nämlich der relative Gehalt an Cysteinsulfoxiden in den Proben 1 bis 9, werden in Abb. 3.12 prozentual (bezogen auf die Einwaage des Pflanzenmaterials) dargestellt.



**Abb. 3.12** Grafische Darstellung der relativen gesamten Cysteinsulfoxide (CS) in Hybriden (*A. cepa* x *lineare*) und bestimmten Arten von *Allium porliferum* (bezogen auf die Einwaage des Pflanzenmaterials).

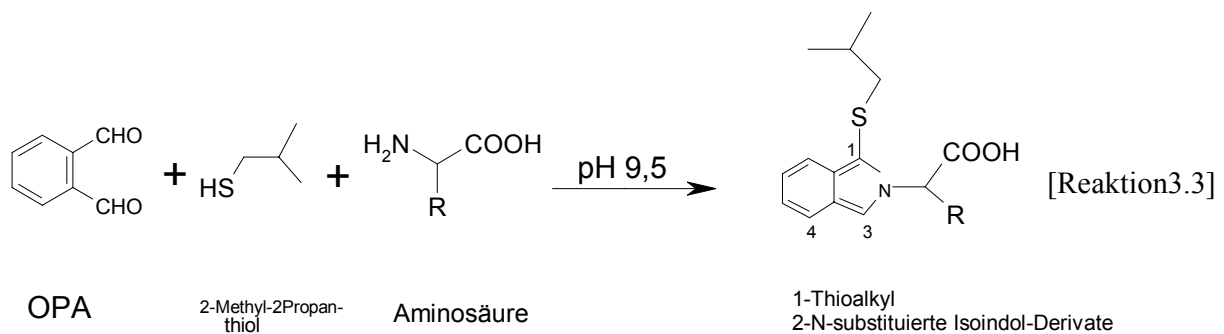
### 3.1.8 Qualitative Bestimmung der Cysteinsulfoxide mittels HPLC

Um eine Identifizierung der einzelnen vorkommenden CS zu ermöglichen, wurden die Knoblauchproben nach Keusgen 1999, basierend auf der Methode von Zieger und Sticher (1989), analysiert.

0,5-0,8 g Probenmaterial wurden in 20 ml Methanol gebracht, unter Rückfluss erhitzt und 10 min sieden lassen. Anschließend wurde der Ansatz quantitativ nach gründlicher Zermörserung des Probenmaterials unter Rückfluss wieder erhitzt und mit 20 ml dest. Wasser

versetzt sowie weitere 10 Min sieden lassen. Als letztes wurde der Ansatz durch einen Faltenfilter filtriert und bis zu einer viskosen Masse bei 40 °C mit einem Rotationsverdampfer eingengt.

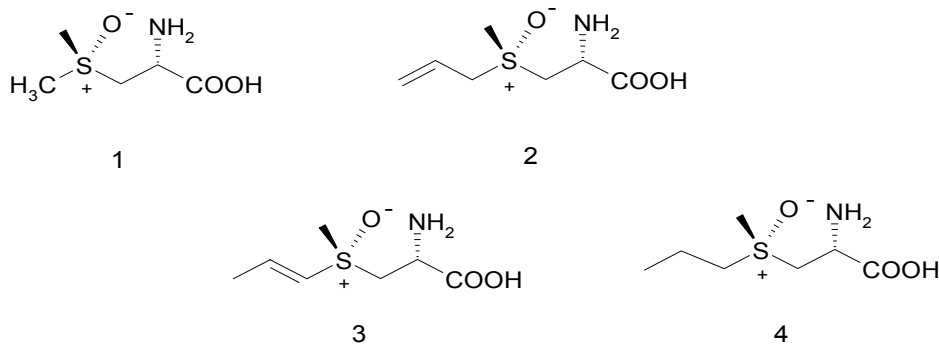
Um eine Detektion ermöglichen zu können, wurde die Probe anschließend mit 5 ml von einer bereits 12 Stunden vorher vorbereiteten Derivatisierungsreagenz (OPA+Thiol) unter alkalischem Medium pH 9,5 versetzt und 35 min im Dunkeln belassen.



Das entstandene Isoindol-Derivat (Reaktion 3.3) ließ sich bei 385 nm detektieren.

Nach vollständiger Derivatisierung wurde die Probe durch einen 0,45 µm Spritzenfilter filtriert und 100 µl davon in die HPLC-Anlage injiziert (vollständiges Abfüllen der Probenschleife von 15 µl Volumen).

Mit Hilfe einer Kalibrationsgeraden vom Mithiin wurde die Kontraktion der jeweiligen vier Cysteinsulfoxide, „(+)-S-Methyl- (Mithiin) **1**, (+)-S-2-Propenyl- (Alliin) **2**, (+)-S-1-Propenyl- (Isoalliin) **3**, und (+)-S-Propyl-L-cystein-S-oxid (Propiin) **4** Abb.3.14“ nach der Peakfläche errechnet, da das Mithiin den gleichen molaren Absorptionskoeffizienten aufwies wie bei den o.g. Cysteinsulfoxiden (CS).



Weitere Homologe der oben aufgeführten Verbindungen wurden bei *Allium* bisher nicht in nennenswerten Mengen gefunden (Koch u. Lawson 1996).

Die Umrechnung auf den tatsächlichen Gehalt in der Probe erfolgte anschließend über das Molekulargewicht und prozentual bezogen auf die in der Tabelle angegebene Einwaage.

Um eine einfache statistische Auswertung zu ermöglichen, wurden die Zwiebelproben mindestens dreimal in die HPLC-Anlage injiziert, wobei sich die Peakflächen höchstens um 10% unterscheiden durften.

Zur Identifizierung der Peaks wurden Co-Chromatogramme mit den o.g. Cysteinsulfoxid-Referenzsubstanzen als interner Standard (1 bis 4) angefertigt (siehe 2.3.4). In allen untersuchten

Proben wurden nur das Mithiin, Alliin, Isoalliin und Propiin bestimmt.

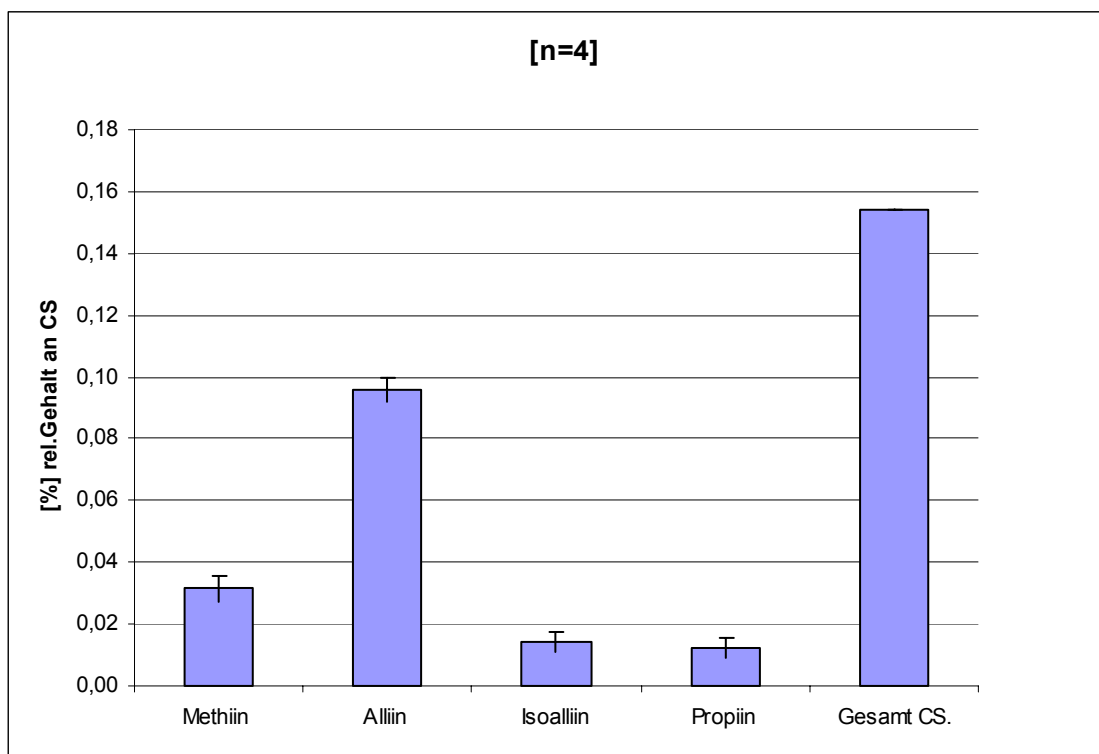
Die Ergebnisse von Untersuchungen der einzelnen Proben sind für den Hybrid *A. cepa x oschanini* in den Tabellen 3.6 aufgelistet, in denen Peakflächen (Areas), Konzentration in  $\mu\text{mol/ml}$  und in  $\mu\text{g/ml}$ , Probenvolumen, Einwaage, Verdünnung, rel. Gehalt [%] an CS (bezogen auf die Einwaage), Mittelwert für die einzelnen CS und Standardabweichung (STABW.) für die einzelnen CS angegeben werden.

<b>Tab. 3.6:</b> Der Gehalt der einzelnen CS in dem Hybrid <i>cepa x oschanini</i> > K9522 . [n=4]								
<b>Allium cepa x oschanini &gt; K 9522 (07-02)</b>								
Lieferungsdatum		05.08.2002						
Probeaufarbeitung: 12.08. 2002								
HPLC Analyse: 5.04.2003								
CS.	Area	Konz.	Konz.	Probenvol.	Einwaage	Verd.	Gehalt	
		[ $\mu\text{mol/ml}$ ]	[ $\mu\text{g/ml}$ ]	[ml]	[ $\mu\text{g}$ ]		[%]	
Methiin 1	2423	0,021	3,209	5,05	363700	6	0,027	
	3282	0,029	4,347	5,05	363700	6	0,036	
	2852	0,025	3,777	5,05	363700	6	0,031	
	2853	0,025	3,779	5,05	363700	6	0,031	
							<b>0,031</b>	Mittelwert
							0,004	Stabw.
Alliin 2	7061	0,062	10,962	5,05	363700	6	0,091	
	7783	0,068	12,083	5,05	363700	6	0,101	
	7422	0,065	11,522	5,05	363700	6	0,096	
	7422	0,065	11,522	5,05	363700	6	0,096	
							<b>0,096</b>	Mittelwert
							0,004	Stabw.
Isoalliin 3	860	0,008	1,335	5,05	363700	6	0,011	
	1353	0,012	2,100	5,05	363700	6	0,017	
	1106	0,010	1,717	5,05	363700	6	0,014	
	1105	0,010	1,715	5,05	363700	6	0,014	
							<b>0,014</b>	Mittelwert
							0,003	Stabw.
Propiin 4	661	0,006	1,038	5,05	363700	6	0,009	
	1223	0,011	1,920	5,05	363700	6	0,016	
	942	0,008	1,479	5,05	363700	6	0,012	
	942	0,008	1,479	5,05	363700	6	0,012	
							<b>0,012</b>	Mittelwert
							0,003	Stabw.
							<b>0,154</b>	Gesamt CS.



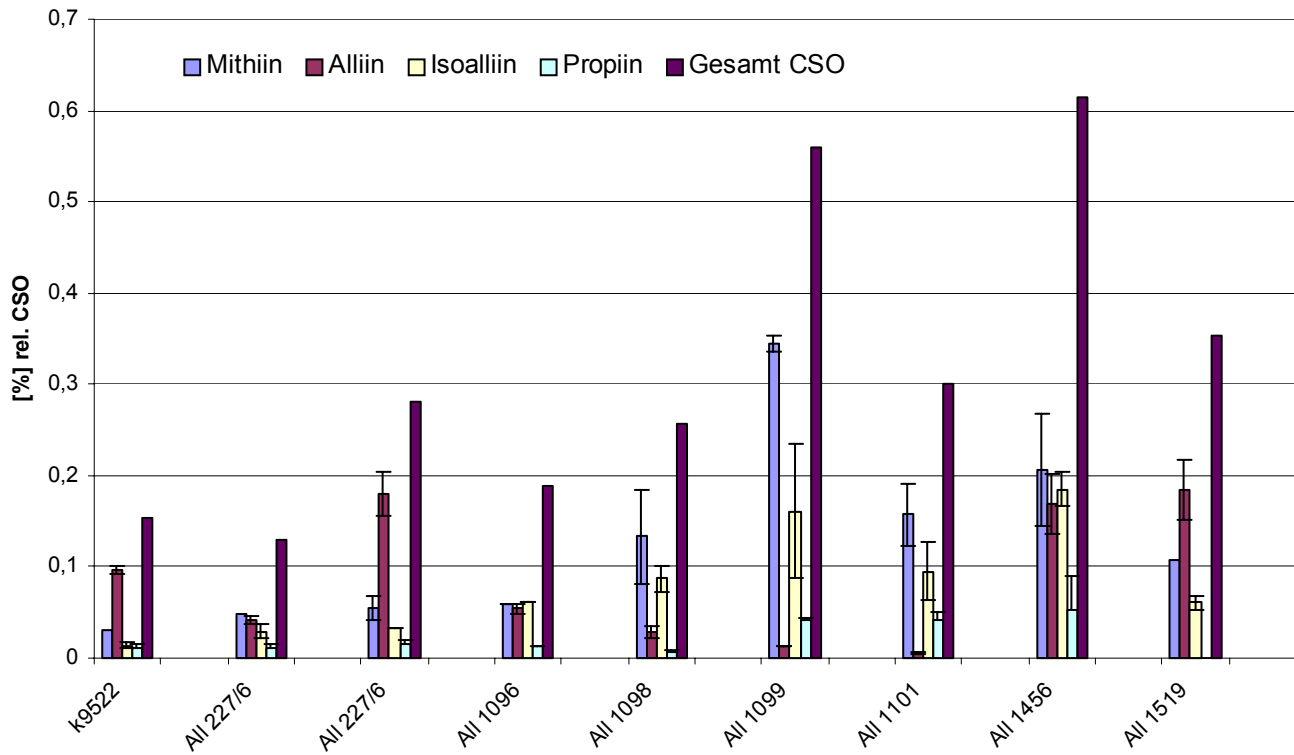
Aus der Tabelle wird ersichtlich, dass das Alliin sich in dem Hybrid (*All. cepa x oschanini* > K9522) als dominantes Cysteinsulfoxid mit 0.096 % ( $\pm 0,004\%$ rel.) erwiesen hat, welches für die *Allium*-Familie typisch ist. Während das Methiin mit 0,031 % ( $\pm 0,003\%$ rel.) an die nächste Stelle tritt, sind das Isoalliin mit 0,014% ( $\pm 0,003\%$ rel.) und anschließend das Propiin mit 0.012% ( $\pm 0,003\%$ rel.) an der dritten und vierten Stelle verifiziert worden.

Ein Überblick über den relativen Gehalt der einzelnen CS, verglichen mit der gesamten Menge an CS, wird in der Abb. 3.13 anschaulich dargestellt.



**Abb. 3.13:** Vergleich des jeweiligen % rel. Gehalt an CS in dem Hybrid *A. cepa x oschaninii* mit dem Gesamtgehalt der CS

Die anderen Hybriden wurden analog dem o.g. Beispiel weiter untersucht und in Tabellen aufgelistet (siehe *Anhang HPLC*). Die vier Haupt-Cysteinsulfoxide, in der Positivrichtung der X-Achse aufgereiht (Mithiin 1, Alliin 2, Isoalliin 3, Propiin 4) sind wie beim vorhergegangenen Hybrid in allen weiteren Hybriden bestimmt und in Abb. 3.14 miteinander dargestellt und verglichen worden.



**Abb. 3.14:** Bestimmung von unterschiedliche Cysteinsulfoxiden (der positiven X-Achse nach; Methiin, Alliin, Isoalliin., Propiin). in einigen Arten von Zwiebeln (2;3) und Hybriden (1;4;...9. siehe Tab.3.7) mittels HPLC.

Die folgenden Hybriden und anderen Arten aus der Tabelle (3.7) wurden in der Grafik in neun Gruppen auf der X-Achse dargestellt, wobei jede Gruppe von links nach rechts, also in positiver Richtung der X-Achse, zuerst das Methiin, als nächstes das Alliin, dann Isoalliin, Propiin und anschließend die gesamten Cysteinsulfoxide, in einem Hybrid darstellt.

Hybriden (Hyb.)	Abkürzung	Proben Bezeichnung Date of Ernte (07.02)	Mithiin(%)		Alliin(%)		IsoAll.(%)		Propiin(%)		CS (%)	
			± SD	± SD	± SD	± SD	± SD	± SD	± SD	± SD		
1	<i>Allium cepa x oschanini</i>	K 9522	0,031 ± 0,004	0,096 ± 0,004	0,014 ± 0,0026	0,012 ± 0,003	0,154 ± 0,003					
2	<i>Allium "proliferum"</i> (Etagezwiebel <b>Basalteil</b> )	All 227/6	0,048 ± 0,005	0,042 ± 0,005	0,029 ± 0,008	0,011 ± 0,004	0,130 ± 0,005					
3	<i>Allium "proliferum"</i> (Etagezwiebel <b>Etageenteil</b> )	All 227/6	0,055 ± 0,014	0,180 ± 0,025	0,032 ± 0,000	0,016 ± 0,003	0,28 ± 0,011					
4	<i>Allium cepa x A. kermesinum</i>	All 1096	0,060 ± 0,0002	0,054 ± 0,005	0,061 ± 0,000	0,013 ± 0,000	0,188 ± 0,004					
5	<i>Allium cepa x A. kermesinum</i>	All 1098	0,133 ± 0,0522	0,029 ± 0,007	0,087 ± 0,015	0,007 ± 0,002	0,256 ± 0,019					
6	<i>Allium cepa x A. kermesinum</i>	All 1099	0,345 ± 0,009	0,013 ± 0,000	0,161 ± 0,073	0,042 ± 0,001	0,560 ± 0,021					
7	<i>Allium cepa x A. kermesinum</i>	All 1101	0,157 ± 0,035	0,006 ± 0,001	0,095 ± 0,0313	0,042 ± 0,008	0,300 ± 0,019					
8	<i>Allium cepa x A. kermesinum</i>	All 1456	0,206 ± 0,061	0,169 ± 0,033	0,185 ± 0,019	0,053 ± 0,038	0,614 ± 0,038					
9	<i>Allium cepa x A. kermesinum</i>	All 1519	0,107 ± 0,01	0,184 ± 0,033	0,061 ± 0,008	0,000 ± 0,00	0,353 ± 0,018					

Aus der Darstellung der CS-Werte in Tab. 3.7 sowie aus dem Grafikvergleich geht hervor, dass es sich hierbei um Hybriden unterschiedlicher Arten handelt, die man in drei Gruppen unterteilen kann:

- Da sind einmal die Hybriden *Allium cepa* x *A. kermesinum* (Hyb. 1 bis 9, Gendatenbank, bezeichnet mit *All* 1096, *All* 1098, *All* 1099, *All* 1101, *All* 1456, *All* 1519),
- dann der Hybrid *Allium cepa* x *oschanini* > K9522
- und anschließend der sogenannte Top Onion *Allium proliferum*, unterschiedliche analysierte Teile, nämlich Basalteil und Etagenteil, mit der Bezeichnung *All* 227/6 jeweils.

Es ist ersichtlich, dass alle untersuchten Proben über die Haupt-Cysteinsulfoxide Methiin, Alliin, Isoalliin, Propiin verfügen bis auf den Hybrid *All* 1519, in dem mit HPLC kein messbares Propiin erfasst werden konnte.

In den Hybriden *Allium cepa* x *A. kermesinum* und mit Rücksicht auf die dargestellte Standardabweichung konnte man wohl verzeichnen, dass die **gesamte CS** in *All* 1456 mit der relativen CS-Höhe von **0,614 %** ( $\pm 0,038\%$ rel.) (bezogen auf die Einwaage der untersuchten Pflanzenmaterialien) am höchsten ist, gefolgt von dem Hyb. *All* 1099; **0,65** ( $\pm 0,021\%$ rel.) und *All* 1519 mit **0,353 %** ( $\pm 0,018\%$ rel.). Hingegen lagen die Hyb. *All* 1101, *All* 1098 und *All* 1066 unterhalb von 0,2 % CS. Auf der anderen Seite lagen der Hybrid *Allium cepa* x *oschanini* und das *Allium proliferum* bei relativ geringen Werten an CS von jeweils 0,154 ( $\pm 0,003\%$ rel.) und 0,130 % ( $\pm 0,005\%$ rel.). Dahingegen lag im Etagenteil von *proliferum* der Gehalt höher bei 0,28 % ( $\pm 0,011\%$ rel.).

Die nachgewiesenen Muster als Vorstufen der bekannten flüchtigen Komponenten in der Gattung *Allium* sind im Vergleich folgendermaßen erfasst:

**Methiin** bzw. (+) S-Methyl-L-Cystein-S-Oxid ist in allen Proben vorhanden. Am höchsten ist der Gehalt bei *All* 1099: 0,345 % ( $\pm 0,009\%$ rel.), gefolgt von *All* 1456: 0,206 ( $\pm 0,061\%$ rel.), *All* 1101: 0,157% ( $\pm 0,035\%$ rel.) und *All* 1098: 0,133 % ( $\pm 0,0522\%$ rel.). Darunter lagen die *All* 1096, *All* 227, k 9522 im Durchschnitt bei 0,054% ( $\pm 0,007\%$ rel.). Am wenigsten wurde Methiin bei dem *A. cepa* x *oschanini* 0,031 ( $\pm 0,004\%$ rel.) gefunden.

**Alliin** bzw. (+) S-Propenyl-L-Cystein-S-Oxid ist wie Isoalliin als wichtiges CS auch überall vorhanden. Beginnend mit den höchsten Werten und abwärts gehend, sind bei dem Hybriden *All* 1519: 0,184 % ( $\pm 0,033\%$ rel.) und der Art *All* 227/2 Etagenteile

0,180 % ( $\pm 0,025\%$ rel.), beim *All* 1456: 0,169 % ( $\pm 0,033\%$ rel.) bzw. den Hyb. *All cepa x oschanini* 0,096 % ( $\pm 0,004\%$ rel.) sowie relativ in gleichen Mengen bei *All* 1096: 0,054 % ( $\pm 0,005\%$ rel.) und *All* 227 Basalanteil 0,042% ( $\pm 0,005\%$ rel.) anschließend *All* 1098: 0,029 % ( $\pm 0,007\%$ rel.) und in Spuren bei *All*1099: 0,013% ( $\pm 0,00 %$ rel.), und *All* 1101: 0,006% ( $\pm 0,001 %$ rel.) enthalten.

**Isoalliin** (+) S-Propenyl-L-Cystein-S-oxid konnte in allen Arten und Hybriden gemessen werden.

Obwohl eine Einstufung der gemessenen Isoalliinwerte sehr leicht möglich war, ist hinsichtlich der relativ großen nachgewiesenen Standardabweichung davon auszugehen, dass der Gehaltsunterschied bei den meisten Hybriden und den anderen Arten sehr gering ist, insbesondere bei den *All* 1098, *All* 1099, *All* 1101, sowie *All* 1519. Der Gehalt lag im Bereich 0,0161 % ( $\pm 0,073\%$ rel.) bis 0,061 % ( $\pm 0,003 %$ rel.). Darunter ließ sich der Gehalt fast auf die Hälfte der eben erwähnten Hybride beim *Proliferum All* 227, Basal- und Etagenteile im Durchschnitt bei ( $0,030 \pm 0,004 %$ ) feststellen. Der niedrigste Isoalliinwert von 0,014 % ( $\pm 0,003 %$ rel.) wurde bei *All. cepa x oschanini*, der höchste bei *All* 1456: 0,0185 % ( $\pm 0,019 %$ rel.) gemessen.

**Propiin** (+) S-Propyl-L-Cystein-S-Oxid ist bis auf den Hybrid *All* 1519 in sämtlichen Proben vermessen worden. Die gemessenen Werte sind zwei Stufen zu unterteilen: Die Höchstwerte lagen im Bereich ( $0,053 % (\pm 0,038\%$ rel.) -  $0,042 % (\pm 0,001\%$ rel.) bei *All* 1456, *All*1101, *All* 1099, gefolgt vom mittleren Bereich ( $0,016 % - 0,012 %$ ). Der unterste Wert wurde bei *All* 1098:  $0,007 % (\pm 0,002\%$ rel.) erfasst.

Daraus folgernd, kann man den Schluss ziehen, dass die Hybriden mit den höchsten Gesamtwerten an Cysteinsulfoxiden, wie bei *All* 456 und *All* 1099 bei etwa 0,6 %, sich sehr wohl für weitere Pflanzung und Vermehrung eignen. Denn ein Wert über den durchschnittlichen **0,5 %** CS als üblichem Maß des Gehaltes bei dem Subgenus *Allium cepa* bezeichnet einen Fortschritt bzw. eine Verbesserung des Gehalts an Cysteinsulfoxiden.

Nicht weniger wichtig ist die Relativität der gemessenen Homologen zueinander, die in sehr variablem Bereich lag. Dies geht in einem Hybriden auf die vegetativen Faktoren und / oder den Genotype zurück (siehe Kapitel Diskussion).

### 3.1.9 Bestimmung der gesamten Cysteinsulfoxide in weiteren Knoblauchproben mittels FIA

Da Interesse bestand, bei den zu analysierenden Proben den Gesamtgehalt an Cysteinsulfoxiden in Knoblauch zu bestimmen, wurde das attraktive Scan-System FIA weiter eingesetzt, wodurch viele Knoblauchproben in einer relativ kurzen Zeitspanne analysiert werden konnten.

In den folgenden Abschnitten wurden sämtliche analysierten Proben in drei Tabellen aufgelistet, aufgeteilt und in entsprechende Grafiken visuell übersetzt.

**Gruppe 1** ist in der Tabelle 3.8 aufgelistet und graphisch in Abb.3.15 abgebildet.

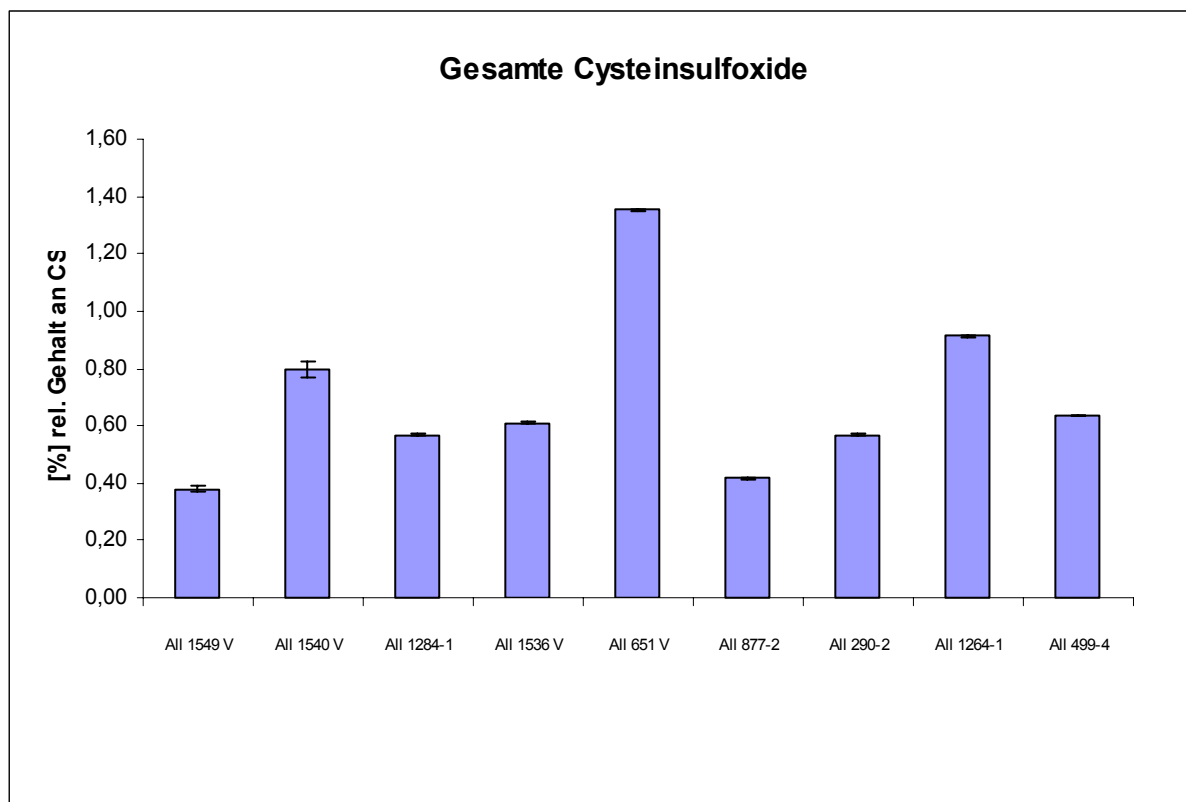
<b>Tab.3.8 Der relative Gesamtgehalt an Cysteinsulfoxiden [CS] % <i>Allium sativum</i> „Akzessionen“</b>										
<i>Integration der Peakhöhen/cps, wobei MW: Mittelwert; M: Messung; STABW: Standardabweichung bedeuten. Die Werte sind Messsignale cps (count per second) der äquivalenten Konzentrationen.</i>										
	M1	M2	M3	M4	STABW	MW	Einwaage(mg)	Genuine [NH <sub>3</sub> ]%	[CS]%	[CS] STABW %
1	27347,42	26449,1	26500	26.338,00	464,15	26658,63	305	0,0036	0,38	± 0,0071
2	10682,55	91391,35	83777,14	80.650,00	37566,95	66625,26	371	0,0068	0,80	± 0,0267
3	63416,4	34033,88	33568	33.283,00	14897,27	41075,32	324,5	0,0039	0,57	± 0,0037
4	61016	62761,8	61949,6	61.900,00	713,31	61906,85	442,5	0,0062	0,61	± 0,0025
5	107853,8	109955	99180	98.241,00	5959,98	103807,45	355,5	0,0061	1,35	± 0,0052
6	33806	35061	35394	35.563,00	794,53	34956	372	0,0032	0,42	± 0,0040
7	46568,7	46739,12	46661,68	45.521,31	571,85	46372,7025	364	0,0046	0,57	± 0,0037
8	70320,7	72771	72155,4	71.613,00	1043,00	71715,025	352,5	0,0068	0,91	± 0,0015
9	57033,5	58340,32	57845,79	56.860,47	695,40	57520,02	410	0,0041	0,64	± 0,0026
1- <i>All</i> 1549V, 2- <i>All</i> 1540V, 3- 1284-1, 4- <i>All</i> 1536V, 5- <i>All</i> 651V, 6- <i>All</i> 877-2, 7- <i>All</i> 290-2, 8- <i>All</i> 1264-1, 9- <i>All</i> 499-4										

Wie aus der Graphik in Abb. 3.15 ersichtlich ist, konnte man in dieser Gruppe der untersuchten Proben feststellen, dass alle Akzessionen bis auf die Akzession *All* 1549V: 0,38 % (± 0,0071%rel.) über dem durchschnittlichen Gehalt an Cysteinsulfoxiden der Art *sativum* liegen. Während die dominierte Konzentration des CS in *All* 651 v: 1,35 % (± 0,005%rel.) gemessen wurde, lagen die Akzessionen

All/1264-1 und All/ 1540 v. in den nächsten Stufen bei (0,91 % ( $\pm 0,0015$  % rel.), 0,80 ( $\pm 0,26$  %rel)) jeweils. Die übrigen fielen hingegen in den Bereich 0,42 bis 0,64 %.

Für diese Gruppe sowie für die folgenden wurden hinsichtlich der Verbesserung der Vergleichbarkeit unter den analysierten Akzessionen eigene Abbildungen dargestellt.

**Gruppe 2** ist in der Tabelle 3.9 aufgelistet und graphisch in Abb.3.16 abgebildet.



**Abb. 3.15:** Grafische Darstellung der relativen gesamten Cysteinsulfoxide (CS) in bestimmten Gruppen von *Allium sativum* (bezogen auf die Einwaage des Pflanzenmaterials)

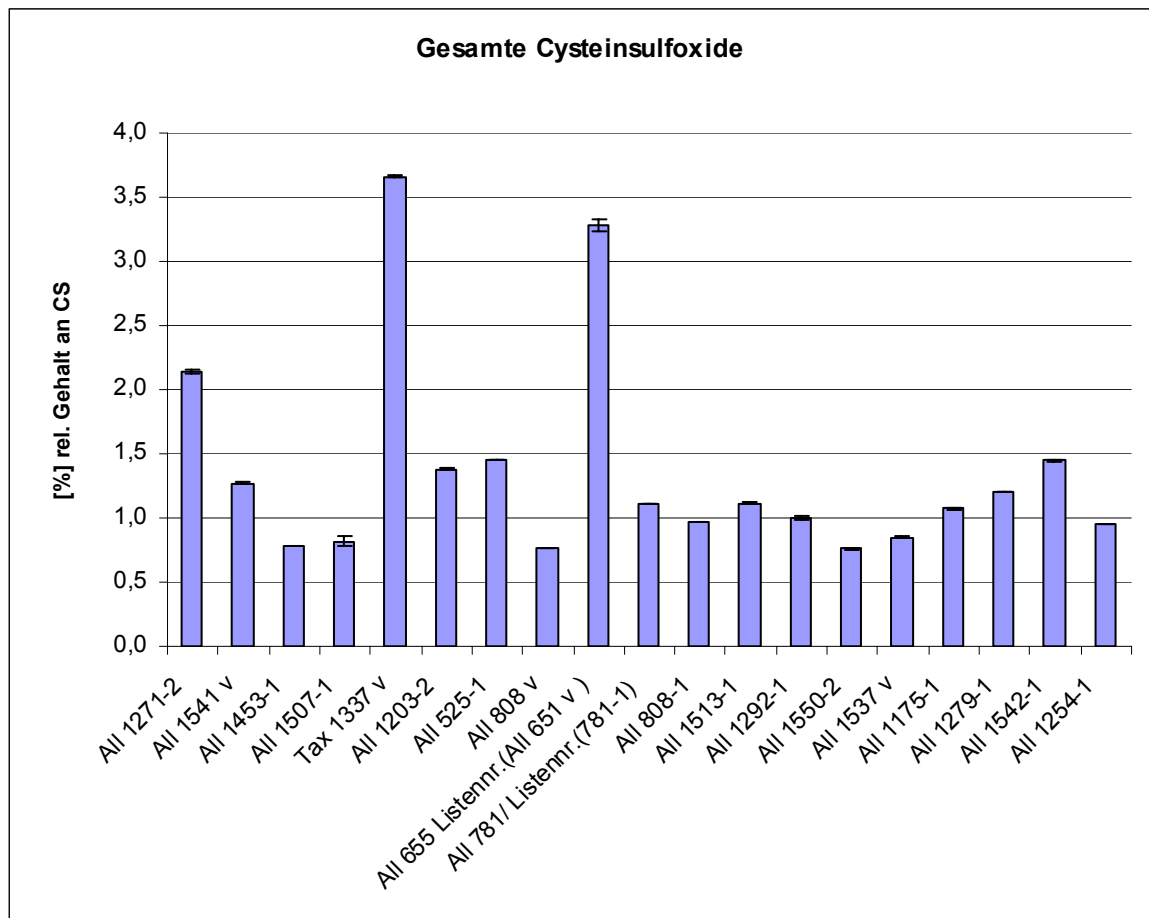
**Tab. 3.9: Der relative Gesamtgehalt der Cysteinsulfoxide [CS] % *Allium sativum* „Akzessionen“** Integration der Peakhöhen/cps, wobei MW: Mittelwert; M: Messung; STABW: Standardabweichung. Die Werte sind Messsignale cps (count per second) der äquivalenten Konzentrationen

	M1	M2	M3	STABW	MW	Einwaage (mg)	Genuine [NH <sub>3</sub> ] %	[CS]%	[CS] STABW %
1	21321,82	20733,47	21287,74	330,28	21114,34	365	0,0066	2,14	± 0,0180
2	13738,38	13933,89	13895,23	103,54	13855,83	400	0,0050	1,27	± 0,0051
3	8091,16	8039,07	8047,37	27,99	8059,20	370	0,0046	0,78	± 0,0015
4	9086,92	9309,39	7937,35	736,38	8777,89	395	0,0029	0,82	± 0,0370
5	46380,65	46208,96	45988,21	196,73	46192,61	400	0,0694	3,66	± 0,0098
6	13118,24	13125,60	12868,82	146,17	13037,55	350	0,0045	1,38	± 0,0083
7	13878,59	13810,84	14038,85	117,09	13909,43	350	0,0062	1,45	± 0,0066
8	7602,60	7733,81	7709,42	69,79	7681,94	351	0,0065	0,77	±0,0039
9	40750,26	41369,55	39655,06	868,18	40591,63	399	0,0563	3,28	±0,0432
10	12058,95	12055,79	12125,85	39,57	12080,20	400	0,0047	1,10	±0,0020
11	9480,83	9552,76	9478,69	42,16	9504,09	360	0,0042	0,96	±0,0023
12	12094,86	11892,85	11718,02	188,58	11901,91	390	0,0051	1,11	± 0,0096
13	11257,34	10766,55	10649,75	322,41	10891,21	395	0,0050	1,00	± 0,0162
14	7535,14	7381,19	7634,60	127,68	7516,98	360	0,0036	0,76	± 0,0070
15	9050,03	9008,65	8869,31	94,68	8976,00	390	0,0028	0,85	± 0,0048
16	10689,82	10529,25	10602,74	80,38	10607,27	360	0,0051	1,07	± 0,0044
17	12984,89	13123,33	12947,47	92,64	13018,56	400	0,0041	1,20	± 0,0046
18	14740,22	14459,79	14466,79	159,93	14555,60	370	0,0052	1,45	± 0,0086
19	9477,51	9534,96	9664,62	95,85	9559,03	360	0,0056	0,95	± 0,0053

wobei:

1:A// 1271-2, 2:A// 1541 v, 3:A// 1453-1, 4:A// 1507-1, 5:Tax1337v, 6: 1203-2, 7:A// 525-1, 8:A// 808 v, 9:A// 655,Listennr.(A// 651 v ), 10:A// 781/ Listennr.(781-1), 11:A// 808-1, 12:A// 1513-1, 13:A// 1292-1, 14:A// 1550-2, 15:A// 1537 v,16:A// 1175-1,17:A// 1279-1,18:A// 1542-1,19:A// 1254-1





**Abb. 3.16:** Grafische Darstellung der relativen gesamten Cysteinsulfoxide (CS) in verschiedenen Arten von *Allium sativum* (Tab.3.7)

In der Gruppe 2 ließen sich die Akzessionen nach ihrem CSO-Gehalt in zwei Bereiche einteilen:

den oberen Bereich, der relativ hoch (3,66 - 1,45) liegt mit Standardabweichung zwischen  $\pm 0,0098$  und  $\pm 0,0015$ . Hier hinein fallen die folgenden Akzessionen von oben nach unten jeweils **5:Tax1337v: 3,66** ( $\pm 0,0098$  %rel.), **9:All 655, Listennr. (All 651 v: 3,28** % ( $\pm 0,043$ %rel.), **1:All 1271-2: 2,14** % ( $\pm 0,018$ %rel).

den unteren Bereich (0,78 – 1,45%) mit der Standardabweichung von  $\pm 0,03$  bis 0,0066.

Hierunter fallen die weiteren Akzessionen {**2: All 1541 v: 1,27** % ( $\pm 0,0051$ %rel.), **3: All 1453-1: 0,78** % ( $\pm 0,0015$ %rel.), **4: All 1507-1: 0,82** ( $\pm 0,037$  %rel.), **6: 1203-2:1,38** %

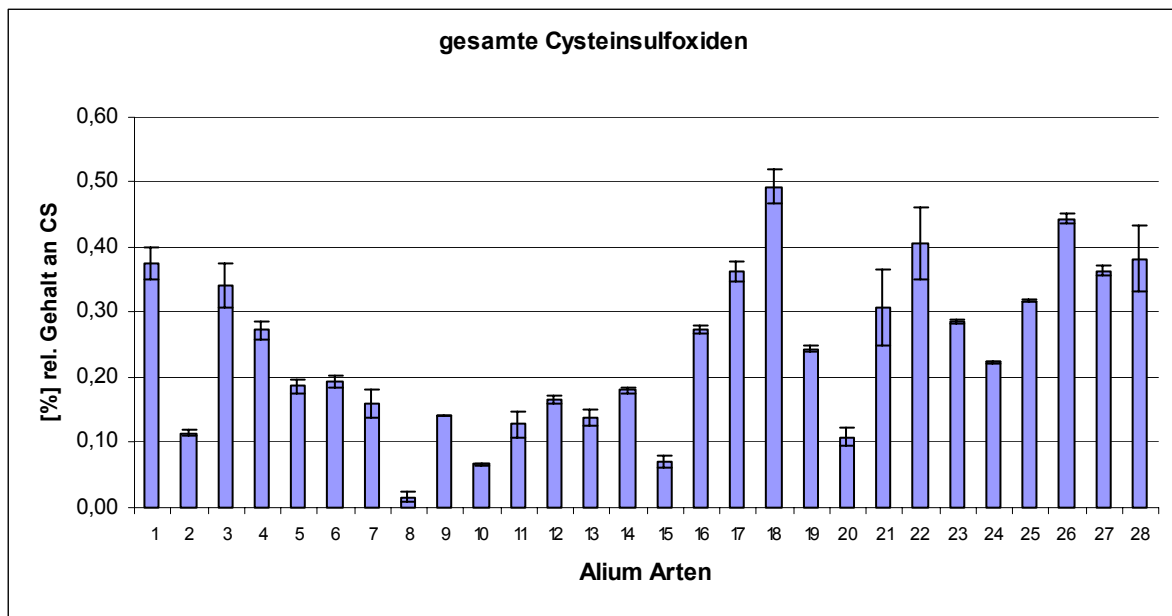
( $\pm 0,0083\%$ rel.), **7**: *All 525-1*: 1,45 % ( $\pm 0,0066$  %rel.), **8**: *All 808 v*: 0,77% ( $\pm 0,0039\%$ rel.), **10**: *All 781/ Listennr.(781-1)*: 1,10 % ( $\pm 0,002\%$ rel.), **11**: *All 808-1*: 0,96% ( $\pm 0,0023$  %rel.), **12**: *All 1513-1*: 1,11% ( $\pm 0,0096$  %rel.), **13**: *All 1292-1*: 1,00 % ( $\pm 0,016$  %rel.), **14**: *All 1550-2*: 0,77 % ( $\pm 0,007\%$ rel.), **15**: *All 1537 v*: 0,85 % ( $\pm 0,0048$  %rel.), **16**: *All 1175-1*: 1,07 % ( $\pm 0,0044\%$ rel.), **17**: *All 1279-1*: 1,20% ( $\pm 0,0046$  %rel.), **18**: *All 1542-1*: 1,45 % ( $\pm 0,0086$  %rel.), **19**: *All 1254-1*: 0,95% ( $\pm 0,0053$  %rel.)}.

**Gruppe 3** ist in der Tabelle 3.10 aufgelistet und graphisch in Abb. 3.17 abgebildet:

**Tab. 3.10: Der relative Gesamtgehalt der Cysteinsulfoxide [CS] % *Allium sativum/ampeloprasum***  
**„Akzessionen“** Integration der Peakhöhen/cps, wobei MW: Mittelwert; M: Messung; STABW: Standardabweichung.  
 Die Werte sind Messsignale cps (count per second) der äquivalenten Konzentrationen

Allium_Akk.	M1	M2	M3	STABW	MW	Einwaage(mg)	Genuine [NH <sub>3</sub> ]%	[CS]%	[CS] STABW%
1	7669,00	7351,90	6852,74	411,50	7291,21	338,5	0,0049	0,37	± 0,0242
2	1527,20	1480,21	1582,82	51,36	1530,08	210,5	0,0027	0,11	± 0,0048
3	7893,49	7087,15	6697,43	610,01	7226,02	362	0,0050	0,34	± 0,0335
4	3726,41	3931,68	3605,08	165,09	3754,39	243,5	0,0031	0,27	± 0,0135
5	4285,45	4270,34	3926,26	203,16	4160,68	357,5	0,0040	0,19	± 0,0113
6	3348,40	3150,51	3134,12	119,26	3211,01	251	0,0054	0,19	± 0,0094
7	2691,60	2402,63	2185,95	253,69	2426,73	242,5	0,0035	0,16	± 0,0208
8	1631,86	1767,26	1474,86	146,33	1624,66	363,5	0,0066	0,02	± 0,0080
9	2082,56	2083,11	2085,72	1,68	2083,80	235,5	0,0032	0,14	± 0,0001
10	1316,18	1372,22	1334,97	28,53	1341,12	272	0,0029	0,07	± 0,0021
11	2421,83	2103,57	2602,19	252,47	2375,86	261,5	0,0048	0,13	± 0,0192
12	3358,85	3318,63	3194,34	85,76	3290,61	282,5	0,0058	0,17	± 0,0060
13	2370,79	2515,72	2204,94	155,51	2363,82	255	0,0041	0,14	± 0,0121
14	4075,80	4183,77	4008,69	88,33	4089,42	360,5	0,0041	0,18	± 0,0049
15	884,59	1073,38	1027,73	98,50	995,23	200	0,0026	0,07	± 0,0098
16	3843,48	3854,72	4010,70	93,47	3902,97	250	0,0033	0,27	± 0,0074
17	5737,46	5968,13	5522,49	222,87	5742,69	290	0,0027	0,36	± 0,0153
18	8396,62	7635,66	7833,88	394,77	7955,39	305	0,0023	0,49	± 0,0257
19	5220,32	5196,02	5100,25	63,48	5172,20	326,5	0,0064	0,24	± 0,0039
20	3103,93	2569,92	2626,97	293,24	2766,94	422,5	0,0019	0,11	± 0,0138
21	9371,92	7087,72	7523,97	1212,63	7994,54	413	0,0069	0,31	± 0,0583
22	6277,03	5103,67	6340,89	696,61	5907,20	253	0,0052	0,41	± 0,0547
23	3879,15	3941,26	3895,83	32,14	3905,41	236,5	0,0038	0,29	± 0,0027
24	5072,26	5027,94	5039,67	22,96	5046,62	358,5	0,0051	0,22	± 0,0013
25	5895,80	5927,38	5902,97	16,56	5908,72	292,5	0,0076	0,32	± 0,0011
26	8950,97	8687,84	8822,13	131,57	8820,31	330	0,0080	0,44	± 0,0079
27	6234,50	6040,50	6122,00	97,41	6132,33	282	0,0062	0,36	± 0,0069
28	7775,40	8500,70	6716,90	897,07	7664,33	347,5	0,0050	0,38	± 0,0513

1: *A. sativum* All 1663-2, 2: *A. ampeloprasum* (GHG) Tax 1027, 3: *A. sativum* Tax 1125-3, 4: *A. sativum* All 1461-1, 5: *A. sativum* 264-2, 6: *A. sativum* 1539 v, 7: *A. sativum* All 818-1, 8: *A. sativum* All 1537, 9: *A. sativum* 685-1, 10: *A. ampeloprasum* (GHG) Tax 1025, 11: *A. sativum* 1250 v, 12: *A. sativum* All 1271-1, 13: *A. sativum* All 862-1, 14: *A. sativum* All 1542-2, 15: *A. ampeloprasum* (GHG) Tax 1023, 16: *A. sativum* 232-4, 17: *A. sativum* All 1156-2, 18: *A. sativum* Tax 1125-6, 19: *A. sativum* All 937-3, 20: *A. sativum* All 1549, 21: *A. sativum* All 844-2, 22: *A. sativum* All 1176-2, 23: *A. sativum* All 116-1, 24: *A. sativum* All 1285-1, 25: *A. sativum* All 508-1, 26: *A. sativum* All 1541-1, 27: *A. sativum* All 839 v, 28: *A. sativum* All 1288 v



**Abb. 3.17:** Grafische Darstellung der relativen gesamten Cysteinsulfoxiden (CS) in weitem verschiedenen Arten von *Allium sativum* (Tab.3.8)

- |  |  |
|--|--|
| 1 <i>A. sativum</i> All 1663-2           | 15 <i>A. ampeloprasum</i> (GHG) Tax 1023 |
| 2 <i>A. ampeloprasum</i> (GHG) Tax 1027  | 16 <i>A. saivum</i> 232-4                |
| 3 <i>A. sativum</i> Tax 1125-3           | 17 <i>A. sativum</i> All1156-2           |
| 4 <i>A. sativum</i> All 1461-1           | 18 <i>A. sativum</i> Tax1125-6           |
| 5 <i>A. sativum</i> 264-2                | 19 <i>A. sativum</i> All 937-3           |
| 6 <i>A. sativum</i> 1539 v               | 20 <i>A. sativum</i> All 1549            |
| 7 <i>A. sativum</i> All 818-1            | 21 <i>A. sativum</i> All 844-2           |
| 8 <i>A. sativum</i> All 1537             | 22 <i>A. sativum</i> All 1176-2          |
| 9 <i>A. sativum</i> 685-1                | 23 <i>A. sativum</i> All 116-1           |
| 10 <i>A. ampeloprasum</i> (GHG) Tax 1025 | 24 <i>A. sativum</i> All 1285-1          |
| 11 <i>A. sativum</i> 1250 v              | 25 <i>A. sativum</i> All 508-1           |
| 12 <i>A. sativum</i> All 1271-1          | 26 <i>A. sativum</i> All 1541-1          |
| 13 <i>A. sativum</i> All 862-1           | 27 <i>A. sativum</i> All 839 v           |
| 14 <i>A. sativum</i> All1542-2           | 28 <i>A. sativum</i> All 1288 v          |

Die Gruppe 3 bezeichnet sich als Zwischengruppe, da die Werte der erfassten Cysteinsulfoxide hier ziemlich nahe am typischen in der Literatur beschriebenen Konzentrationsbereich von Cysteinsulfoxiden bei der Art *Allium sativum* liegen, nämlich etwa um 0,5% (wie bei den anderen Proben, bezogen auf das Gewicht des abgewogenen untersuchten Pflanzenmaterials).

Wie aus der Abbildung 3.17 sowie aus der Tabelle 3.10 zu entnehmen ist, handelte es sich dabei neben dem *Allium sativum* um andere Arten der Gattung *Allium*, nämlich um das *Allium ampeloprasum*. *Allium ampeloprasum* zeigte einen nicht ungewöhnlichen Gehalt an Cysteinsulfoxiden von 0,11 % ( $\pm 0,005$  %rel.) bei Probe Nr.2: *A. ampeloprasum* (GHG) Tax 1027 und von 0,07 % ( $\pm 0,002$  %rel.) bei Probe Nr.10: *A. ampeloprasum* (GHG) Tax 1025 und von 0,07 % ( $\pm 0,0098$  %rel.) bei Probe Nr. 15: *A. ampeloprasum* (GHG) 1023. Die Bezeichnung GHG kommt vom englischen Namen dieser Art und ist eine Abkürzung für *Great Headed Garlic*.

*Allium ampeloprasum* wird in Deutschland Pferdekopfknolauch genannt, da es dem bekannten Knoblauch (*sativum*) morphologisch ähnlich sieht. Sein gesamter Gehalt an Cysteinsulfoxiden, wie die Tabelle 3.10 verrät, ist hingegen nicht dem in der Literatur bekannten o.g. Durchschnitt von *sativum* ähnlich, sondern eher dem Subgenus *cepa* (Zwiebel). Im Allgemeinen hat die Zwiebel relativ einen viel geringeren Anteil an Cysteinsulfoxiden (geschätzt etwa 30% des CS-Gehalts von Knoblauch) (Keusgen 1999). Deshalb wurden u.a. zur Verbesserung der an CS-hängenden Heileffekte höhere Anteile in der Gattung *Allium* erzielt durch Hybridisierung zwischen Zwiebel und Knoblauch.

Die untersuchten Akzessionen in Gruppe 3 wiesen die typische Variabilität des Genus *Allium* auf; zudem ließen sich der höchste und der niedrigste Gehalt an Cysteinsulfoxiden verzeichnen: Der obere Wert bewegte sich um die 0,5% in Probe Nr. **18**: *A. sativum* Tax 1125-6: 0,49 % ( $\pm 0,025$ %rel.), während der untere bei 0,02 % ( $\pm 0.008$  %rel.) in **8**: *A. sativum* All 1537 lag.

Für die Einordnung der erfassten CS-Werte wurden die Akzessionen in die folgenden Bereiche eingeteilt:

**I – den unteren Bereich** (0,02 - 0,11 %), vertreten in folgenden Proben: **8**: *A. sativum* All 1537: 0,02 % ( $\pm 0,008$  %rel.) bzw. **20**: *A. sativum* All 1549: 0,11 % ( $\pm 0,013$  %rel.), **2**: *A. ampeloprasum* (GHG) Tax 1027: 0,11 % ( $\pm 0,0048$  %rel.), **10**: *A. ampeloprasum* (GHG) Tax 1025.

**II – den mittleren Bereich** (0,11 - 0,29%), vertreten in den Proben (abwärts): **23**: *A. sativum* All 116-1: 0,29 ( $\pm 0,0027$  %rel.), **4**: *A. sativum* All 1461-1: 0,27 %  $\pm 0,013$ %rel.), **16**: *A. sativum* 232-4: 0,27 % ( $\pm 0,0074$  %rel.), **19**: *A. sativum* All 937-3: 0,24% ( $\pm 0,0039$  %rel), **24**: *A. sativum* All 1285-1: 0,22% ( $\pm 0,0013$  %rel.), **6**: *A. sativum* 1539 v: 0,19 % ( $\pm 0,009$ %rel.), **5**: *A. sativum* 264-2: 0,19 % ( $\pm 0,011$ %rel.), **7**: *A. sativum* All 818-1: 0,16 % ( $\pm 0,02$  %rel.), **14**: *A. sativum* All1542-2: 0,18 % ( $\pm 0,004$ %), **12**: *A. sativum* All 1271-1: 0,17 % ( $\pm 0,006$  %rel.), **13**: *A. sativum* All 862-1: 0,14 % ( $\pm 0,021$  %rel.), **11**: *A. sativum* 1250 v: 0,13 % ( $\pm 0,019$  %rel.), **9**: *A. sativum* 685-1: 0,14 % ( $\pm 0,00$  %rel.), **15** : *A. ampeloprasum* (GHG) Tax 1023: 0,07% ( $\pm 0,0098$  %rel.).

**III – den oberen Bereich** (0,30 – 0,50%), vertreten in den Proben (abwärts): **18**: *A. sativum* Tax1125-6: 0,49 ( $\pm 0,025$  %rel.), **26**: *A. sativum* All 1541-1: 0,44 % ( $\pm 0,0079$  %rel.), **22**: *A. sativum* All 1176-2: 0,41 % ( $\pm 0,051$  %rel.), **28**: *A. sativum* All 1288 v: 0,38 ( $\pm 0,05$  %rel.), **1**: *A. sativum* All 1663-2: 0,37 % ( $\pm 0,02$  %rel.), **27**: *A. sativum* All 839 v: 0,36 % ( $\pm 0,007$  %rel.), **17**: *A. sativum* All1156-2: 0,36 % ( $\pm 0,015$  %rel.), **3**: *A. sativum* Tax 1125-3: 0,34 % ( $\pm 0,03$ %rel.), **25**: *A. sativum* All 508-1: 0,32 % ( $\pm 0,001$ %rel.), **21**: *A. sativum* All 844-2: 0,31 % ( $\pm 0,058$ %rel.).

Durch die oben besprochenen Gruppen 1, 2, 3 konnten die untersuchten Akzessionen für die breit gefächerte Variabilität der *Allium sativum* recht gut repräsentiert werden, ausgehend von 3,66% Cysteinsulfoxiden als sehr hohem Wert bis hin zum abschließend relativ sehr niedrigen Wert von 0,02% in *Allium sativum* 1537.

## 3.2 Bestrahlung

### 3.2.1 Bestrahlung von Knoblauch

Um eine Einschätzung der möglichen Beeinträchtigungen von Cysteinsulfoxiden als Vorstufe von Allicin im Zusammenhang mit Konservierungsmöglichkeiten von Knoblauch zu ermöglichen, wurde der Einfluss der elektronenbeschleunigten Strahlung auf die gesamten Cysteinsulfoxide in verschiedenen Varietäten (Verarbeitungsformen) von Knoblauch untersucht.

In Tütchen eingeschlossener Knoblauch (Zwiebel, Pulver, Chips, Granulat) wurde durch die LINAC- Anlage (Strahlungsenergie 5-10 MeV) der elektronenbeschleunigten Strahlung ausgesetzt und Energie von 0 bis 6 kGy in 0,5 kGy schrittweise eingebracht. Anschließend wurden die Knoblauchproben mit Hilfe von unterschiedlichen Analysetechniken, nämlich der Durchflussanalyseanlage (FIA), der Comet Assay Analyse und der NMR-Spektren, untersucht.

#### 3.2.1.1 Beobachtungen nach der Bestrahlung

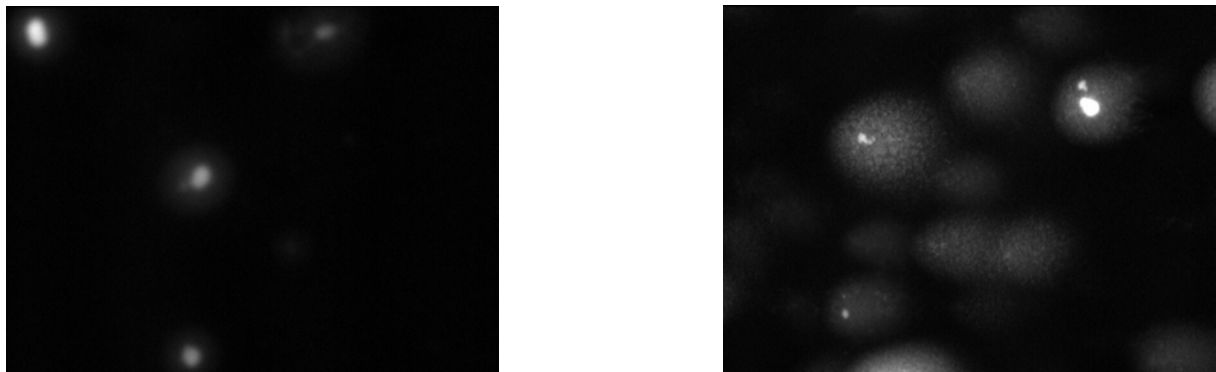


Die in Plastiktüten eingeschweißten Knoblauchzehen und getrockneten Knoblauchvarietäten (Chips, Granulate, Pulver....) ließen keine bemerkbaren optischen Änderungen oder Unterschiede im Vergleich zu den unbestrahlten erkennen (Abb.3.17-1).

**3.17-1:** Knoblauchvarietäten, eingeschweißte in Zweierreihen: Oben unbestrahlt, unten bestrahlt mit jeweils 5; 1,5; 5; 0,5 kGy, von links nach rechts: Chips, Granulat, frisch, Pulver

### 3.2.1.2 Detektion von DNA-Strangbrüchen in bestrahltem Knoblauch

Wie im entsprechenden Abschnitt Material und Methoden bereits erwähnt, wurde die Untersuchung *Comet Assay* nach (Cerda et al.1993) für den Nachweis von bestrahltem Knoblauch als semiquantitative Nachweismethode eingesetzt. Dabei sind folgende Ergebnisse erzielt worden.



**Abb. 3.18:** Typische Kometen von Knoblauch<sub>(frisch)</sub> bei Anfärbung mit Propidiumiodid, Mikroskope Objektiv 400x. Unbestrahlt <sup>[Links]</sup>, mit 1 kGy Bestrahlt<sup>[Rechts]</sup>.

In Abbildung 3.18 wird eine mikroskopische Aufnahme der fluoreszierenden frischen Knoblauch-Kerne vor und nach der Bestrahlung bei EM 590 nm nach einer Anfärbung mit 25  $\mu\text{M}$  Propidiumiodid dargestellt. Eine Anregung der Fluoreszenz erfolgte im Bereich des durch Filter durchgelassenen Grünlichts bei 515-560 nm. Eine Übersicht über die Auswertung der Kometen, die durch Bestrahlung entstanden sind, ist unter Material und Methoden ausführlich besprochen worden.

In der folgenden Aufführung der ausgewerteten Kometen werden die unterschiedlichsten Parameter besprochen.

Das Programm Comet Assay II bietet eine Reihe von Parametern an, mit denen die Verteilung der DNA in Kopf und Schweif der Kometen beschrieben wird. In Abb. 2.13 sind diese anhand einer Beispielmessung dargestellt.



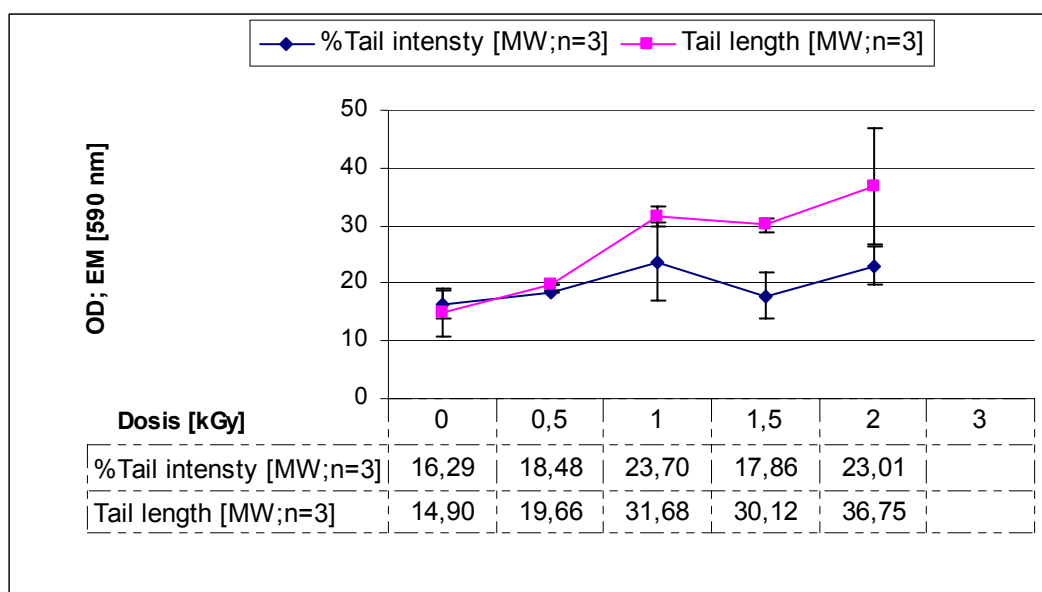
### 3.2.1.2.1 Auswertung der Kometen:

#### - **Nach der Länge sowie nach der Intensität des Schweifs**

Während die **Tail Intensity** in Prozent angegeben wurde, wobei die Fluoreszenzintensität im Schweif / Fluoreszenzintensität des gesamten Kometen in % vermessen wurde, wird bei der **Tail Length** der kalibrierte Abstand der sogenannten Peak-Position bis zum Ende des Schweifs ausgewertet (s.Abb. 2.13).

Die nach den o.g. Auswertungsparametern durchgeführten Untersuchungen wiesen darauf hin, dass eine Unterscheidung zwischen den bestrahlten und den unbestrahlten Knoblauchkernen erfassbar war (Abb. 3.18).

Eine Darstellung für die Abhängigkeit der Kometenlänge oder Kometenintensität der Knoblauch-Zellkerne von den Strahlendosen wurde grafisch in Abb. 3.19 vorgenommen.



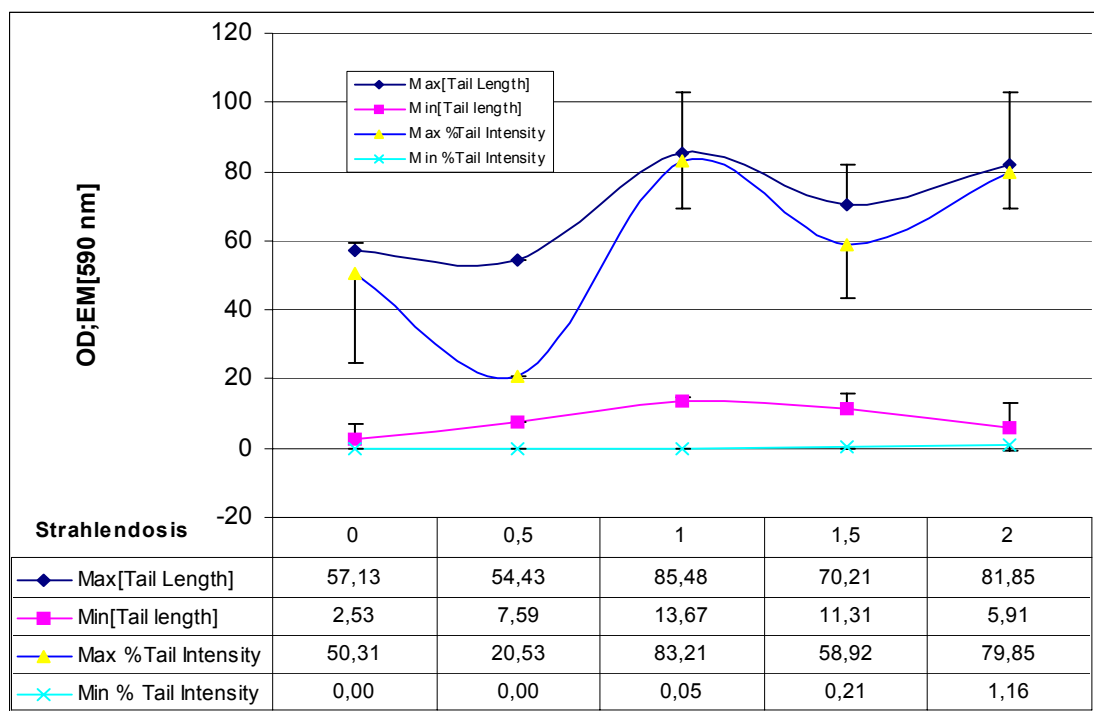
**Abb. 3.19:** Die Abhängigkeit der Schweiflänge<sup>[Tail length]</sup>, Schweifintensität<sup>[Tail intensity]</sup> der Kometen von Knoblauch-Zellkernen von den Strahlendosen

Es wurde nach einer Korrelation zwischen den zunehmenden Strahlendosen und der Kometenlänge sowie der Kometenintensität ein leichter Anstieg festgestellt.

Während die vermessenen Kometen bei 1, 1,5 und 2 kGy keine großen Differenzen voneinander aufwiesen, ließen sich die bestrahlten Proben von den Kometen bei den unbestrahlten Proben sehr eindeutig unterscheiden ( $P > 0,05$ ).

Auf der anderen Seite waren die mit 3 kGy bestrahlten Proben nicht mehr verwertbar, denn die Schweife bei einer so großen Strahlendosis waren mit anderen Schweifen durchsetzt worden. In einigen Fällen hatte sich ein sehr großer Abstand von den dazugehörigen Kometen-Köpfen ergeben, welche eine Zuordnung der Kometen zu deren Schweifen unmöglich machte. Daraus lässt sich folgern, dass bei der Größenordnung von 3 kGy großer Schaden in der DNA angerichtet worden war und somit eine Auswertung mit den oben beschriebenen Parametern entfällt.

### - Verteilung der Kometen



**Abb. 3.20:** Die Abhängigkeit der maximalen sowie minimalen Tail Length, % Tail Intensity mit den jeweiligen Strahlendosen [0...2kGy]; im Diagramm sind die Linien von oben nach unten aufgeführt wie im Legendeneintrag.

In der **Abb. 3.20** wurden die maximalen sowie die minimalen Werte der Schweifintensität  $[\text{Tail Intensity}]$  bzw. Schweiflänge  $[\text{Tail Length}]$  in Abhängigkeit von den Strahlendosen dargestellt, wobei sich herausstellte, dass bei zunehmender Strahlendosis fast keine bemerkbare Zunahme sowohl der minimalen als auch der maximalen genannten Parameter im Vergleich zur Standardabweichung erkennbar ist. Dagegen ist eine Abhängigkeit zwischen den minimalen Werten der Schweiflänge bzw. Schweifintensität und den maximalen Werten der gleichen Schweifparameter der Kometen festgestellt worden „Ähnliche Verläufe“ (Abb.3.20).

Dies zeigt, dass ein durch die Bestrahlung entstandener Komet wie am Beispiel der Strahlendosis 1 kGy ein Schweifminimum hat, das sich bei dem Kriterium [Tail-Intensity %] nicht von den unbestrahlten Probenzellen unterscheiden lässt. Andererseits besitzen bestrahlte Proben ein Schweifmaximum, in dem der Einfluss der Strahlendosis deutlich repräsentiert wird.

Ein Schweifminimum bei bestrahlten und unbestrahlten Proben ist auf endogene Schäden in den Zellkernen zurückzuführen. Entscheidend für die Differenzierung zwischen bestrahlten und unbestrahlten Proben war, dass bei den bestrahlten Proben keinerlei intakte Zellen zu vermessen blieben und dass sie einen eindeutigen Schweif aufwiesen.

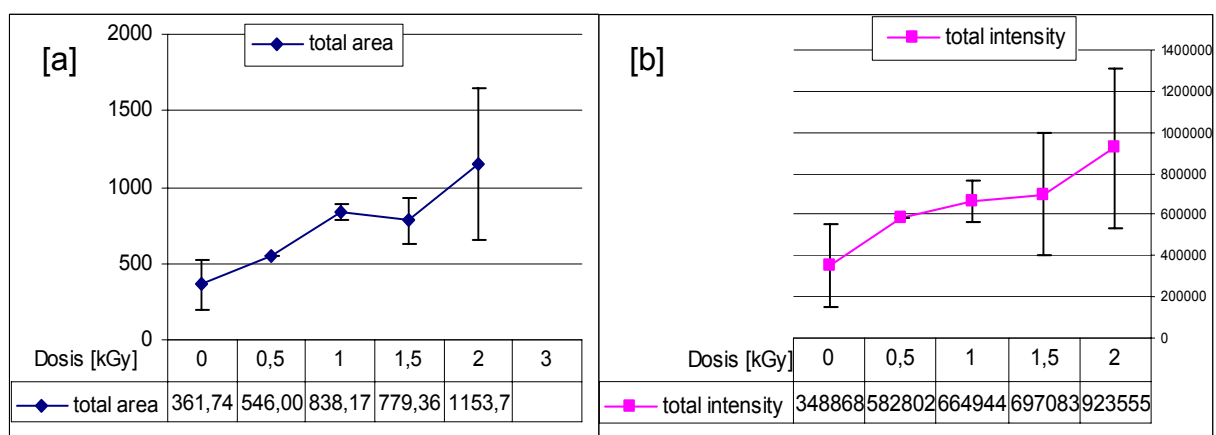
#### - **Nach der gesamten Fläche/ Intensität der Kometen**

Zur Bestätigung der Ergebnisse bezüglich der Unterschiede zwischen bestrahlten und unbestrahlten Proben zum einen und deren Abhängigkeit bei zunehmender Strahlendosis zum anderen wurde noch eine weitere Möglichkeit für die Kometenauswertung verwendet.

Die gesamte Kometenfläche / **Total Area** ist definiert als "The total calibrated area of the comet/cell in square microns".

**Total Intensity** ist definiert als "The sum of head and tail intensities, i.e. the same as Sum Comet Intensity".

Offensichtlich wies die gesamte Intensität bzw. Fläche eine proportionale Abhängigkeit von der Strahlendosis auf (s. Abb. 3.21 a, b).



**Abb.3.21** Die Abhängigkeit der gesamten Kometenfläche<sup>[a]</sup> / -intensität<sup>[b]</sup> von der Strahlendosis, wobei die y-Achse die gemessene Emission bei 590 nm vertritt.

Eine Auswertung der Kometen war ab der Strahlendosis 3 kGy aus o.g. Gründen nicht mehr möglich.

Offensichtlich haben die eingesetzten Parameter für die Auswertung der Kometen die erfassten Unterschiede zwischen bestrahlten und unbestrahlten Knoblauchzellen bestätigt.

### 3.2.2 Strahlungseinflüsse auf den Gesamtgehalt von Ammoniak und Cysteinsulfoxiden mit Hilfe des FIA –Messverfahrens.

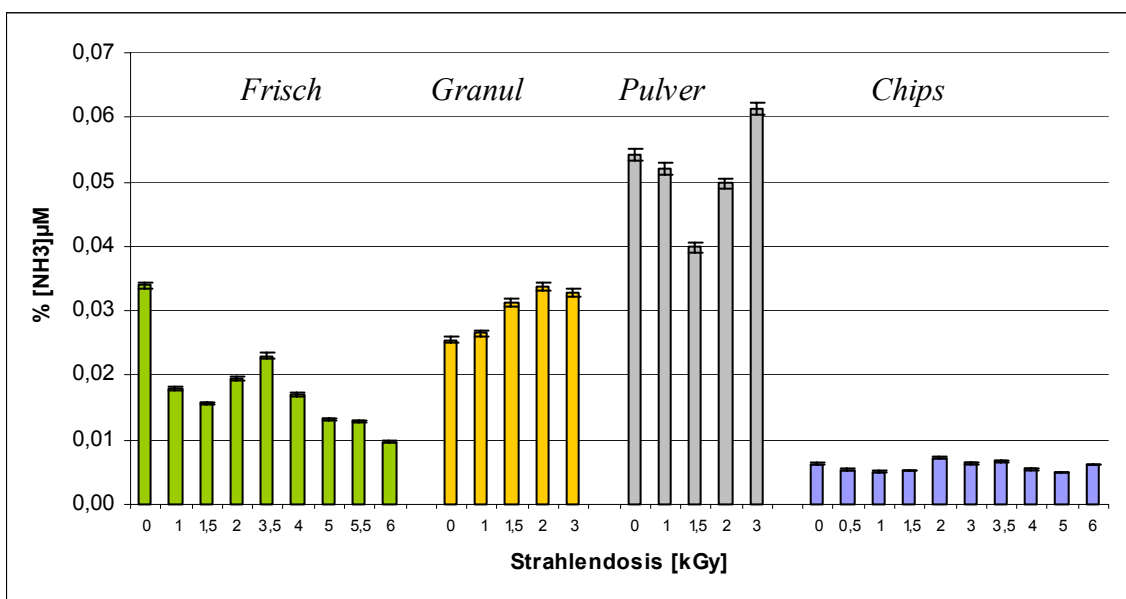
Um den Einfluss der Elektronenstrahlungen sowohl auf das gesamte Ammonium als auch auf den CS-Gehalt im Knoblauch zu bestimmen, wurde die FIA als schnelles Messverfahren verwendet.

Es wurden verschiedene Varietäten des Knoblauchs mit ionisierender Elektronenstrahlung folgendermaßen behandelt:

<b>Frischer</b> Knoblauch mit den Dosen	( 0; 1; 1,5; 2; 3,5; 4; 5; 5,5; 6	kGy)
Knoblauch <b>granulat</b> mit den Dosen	( 0; 1; 1,5; 2; 3	kGy)
Knoblauch <b>pulver</b> mit den Dosen	( 0; 1; 1,5; 2; 3	kGy)
Knoblauch <b>chip</b> mit den Dosen	( 0; 0,5; 1; 1,5; 2; 3,5; 4; 5; 5,5; 6	kGy)

#### 3.2.2.1 Bestimmung des Ammoniaks in bestrahltem Knoblauch

Mittels FIA wurden die diversen Varietäten an Knoblauch auf den Gesamtgehalt an Ammoniak geprüft und in der Tab. 3.11 aufgeführt sowie grafisch in Abb. 3.22



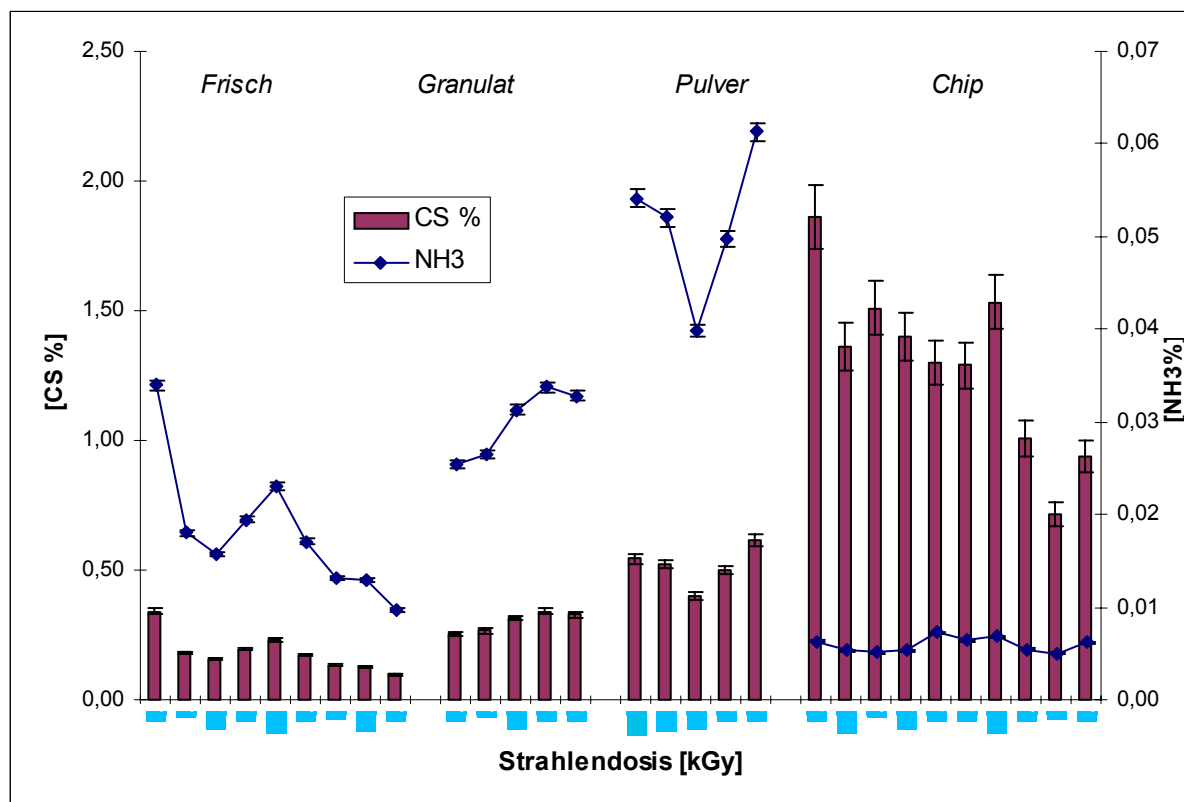
**Abb. 3.22:** Bestimmung des Ammoniaks in bestrahlten Knoblauchvarietäten und ihre Abhängigkeit von den zunehmenden Strahlendosen dargestellt.

<b>Tab.3.11 Der relative Gesamtgehalt des Ammoniaks [NH<sub>3</sub>] % in bestrahlten Knoblauchvarietäten</b>								
<i>“Integration der Peakhöhen/cps, wobei MW: Mittelwert; M: Messung; STABW: Standardabweichung bedeutet. Die Werte sind Messsignale cps (count per second) der äquivalenten Konzentrationen.</i>								
<b>Strahlendosis kGy</b>	<b>M1</b>	<b>M2</b>	<b>M3</b>	<b>STABW</b>	<b>MW</b>	<b>Einwaage(mg)</b>	<b>% [NH<sub>3</sub>]</b>	<b>% [STAW]</b>
<b>Frischer Knoblauch</b>								
0,0	10474,45	11153,14	11345,21	457,48	10990,93	373,5	0,848	0,0145
1,0	5589,95	5537,36	5442,98	74,46	5523,43	352,45	0,452	0,0077
1,5	4938,70	4784,64	4832,65	78,83	4851,99	357	0,392	0,0067
2,0	5583,21	6201,81	6372,69	415,36	6052,57	358,5	0,487	0,0083
3,5	7328,76	7471,60	7624,52	147,91	7474,96	374	0,576	0,0098
4,0	5751,41	5242,28	5137,09	328,55	5376,93	363,5	0,427	0,0073
5,0	4046,08	4105,40	4264,81	113,12	4138,76	362,5	0,329	0,0056
5,5	4016,19	3980,14	4027,55	24,75	4007,96	359	0,322	0,0055
6,0	3191,92	3141,86	2943,42	131,43	3092,40	370	0,241	0,0041
<b>Knoblauchgranulat</b>								
0,0	5402,17	5346,81	5835,92	267,84	5528,30	250,5	0,636	0,0108
1,0	5835,99	5841,41	5699,73	80,28	5792,37	252,25	0,662	0,0113
1,5	6338,16	6480,93	7555,11	665,23	6791,40	250,5	0,782	0,0133
2,0	7406,59	7550,60	7084,90	238,43	7347,36	251,2	0,843	0,0144
3,0	7301,28	7020,27	7062,92	151,44	7128,16	250,5	0,820	0,0140
<b>Knoblauchpulver</b>								
0,0	12001,56	11762,90	11924,71	121,83	11896,39	253,5	1,353	0,0231
1,0	11511,66	10976,06	11406,56	283,80	11298,09	250,5	1,300	0,0222
1,5	8635,32	8582,09	8777,59	101,07	8665,00	251	0,995	0,0170
2,0	11762,76	10606,57	10185,82	816,55	10851,72	251,5	1,244	0,0212
3,0	12174,37	12979,90	14792,43	1340,92	13315,56	250,5	1,533	0,0261
<b>Knoblauchchips</b>								
0	992,56	875,57	848,03	76,74	905,39	165	0,1582	0,00011
0,5	968,70	883,21	895,93	46,13	915,95	197	0,1341	0,00009
1,0	847,69	731,92	718,98	70,87	766,20	173	0,1277	0,00009
1,5	858,26	779,02	841,05	41,68	826,11	179	0,1331	0,00009
2,0	1042,01	1030,95	988,80	28,08	1020,59	163	0,1805	0,00012
3,0	848,56	879,11	951,93	53,11	893,20	161	0,1600	0,00011
3,5	1062,32	1174,96	1115,28	56,36	1117,52	193	0,1670	0,00011
4,0	747,11	818,45	809,92	38,96	791,83	168	0,1359	0,00009
5,0	651,81	785,81	672,41	72,16	703,34	162	0,1252	0,00009
6,0	838,78	911,84	855,87	38,21	868,83	161	0,1556	0,00011

In der Abb. 3.22 ist erkennbar, dass eine Änderung im Ammoniakgehalt in allen Knoblauchvarietäten auftrat.

Während sich bei den bestrahlten frischen Proben eine deutliche Abnahme von maximal 70 % bei 6 kGy mit zunehmenden Strahlendosen sowie ein Zwischenanstieg von 43% bei 1,5 und 3,5 kGy im Abnahmebereich ergaben, wurde bei den Knoblauchgranulat- und Pulverproben eine steigende Zunahme des Ammoniakgehaltes von 13 % bei 3 kGy festgestellt, wobei bei den Chipsproben eine Schwankung des Ammoniaks um den Ausgangspunkt in die Zunahmerichtung von maximal 13% bei 2 kGy und 20 % in die Abnahmerichtung bei 5 kGy sichtbar wurde. Eine unmittelbare Schädigung durch den Strahleneffekt auf die stickstoffhaltigen Verbindungen in Knoblauchzellen, insbesondere bei ausreichender Wasseraktivität (Diehl 1995), ist nicht auszuschließen. Dementsprechend könnte die eindeutige Abnahme des Ammoniaks mit zunehmenden Strahlendosen bei den frischen bestrahlten Proben erklärt werden. Der Wassergehalt ist bei den anderen Varietäten viel geringer und zieht dementsprechend die erfasste Änderung nach sich.

### 3.2.2.2 Bestimmung der Cysteinsulfoxide in bestrahltem Knoblauch



**Abb.3.23** Bestimmung der Cysteinsulfoxide in bestrahlten Knoblauchvarietäten und ihre Abhängigkeit von den zunehmenden Strahlendosen; die Linien stellen die % NH<sub>3</sub> dar.

Die Grafik 3.23 verdeutlicht recht anschaulich die Verläufe bzw. die Parallelität der entsprechenden Werte der CS und NH<sub>3</sub> % mit zunehmender Strahlendosis; außer bei den Chips war keine Resonanz der Veränderung zu erkennen.

In allen Knoblauchvarietäten konnten Strahleneffekte festgestellt werden.

In den Proben aus frischem Knoblauch wurde insgesamt eine Abnahme mit steigender Strahlendosis von 70% bei maximaler Strahlendosis von 6 kGy festgestellt. Zunächst sank der CS-Gehalt bei erster Dosis 1 kGy um 47%, bei der zweiten um 52%, also auf die Hälfte. Dann korrigierte er sich wieder bei weiteren Strahlendosen um 43% bei einem Zwischenanstieg von 3,5 kGy, gefolgt von weiterer kontinuierlicher Absenkung, bis zu dem erwähnten Maximum bei der Höchstdosis 7 kGy.

Während bei den Pulverproben die Änderung der Cysteinsulfoxide erst bei 1,5 kGy ihren tiefsten Punkt von etwa 25% Abnahme erreicht hatte, verzeichneten die weiteren steigenden Strahlendosen eine lineare Steigerung und 15% Zunahme, verglichen mit der Kontrollprobe.

Dagegen wurde bei Knoblauchchips sowie bei frischen Proben eine eindeutig degradierte Neigung des CS-Gehalts mit dem ersten 0,5 kGy um 26 % beobachtet; der Tiefstpunkt wurde bei 5 kGy mit einer Abnahme um 62% erreicht.

Die erfasste eindeutige Änderung der Cysteinsulfoxide bei frischen und Chips-Knoblauchproben entspricht relativ in etwa der proportionalen Abhängigkeit.. Die Ursache dafür liegt bei der Wasseraktivitätsabhängigkeit. Denn Strahleneinflüsse, insbesondere ionisierende, sind in wässrigen bzw. wasserreichen Materien viel stärker reaktiv und machen sich eindeutiger als sonst bemerkbar.

Deshalb dürfen z.B. Milch, Säfte bzw. saftige Lebensmittel oder andere flüssige Nahrungsgüter nie bestrahlt werden, schon gar nicht mit höheren Strahlendosen (siehe Einleitung Kettenreaktion).

In der Abbildung 3.23 und unabhängig von der Zunahme der Strahlendosis stellt sich heraus, dass der Gehalt an Cysteinsulfoxiden bei den Knoblauch-Chips viel höher ausfällt als bei Knoblauchpulver, dessen Gehalt wiederum über dem des Granulats und des frischen Knoblauchs liegt. Das hängt teilweise mit dem Wassergehalt und den Herstellungsprozessen der entsprechenden Ausführungen zusammen. Denn der

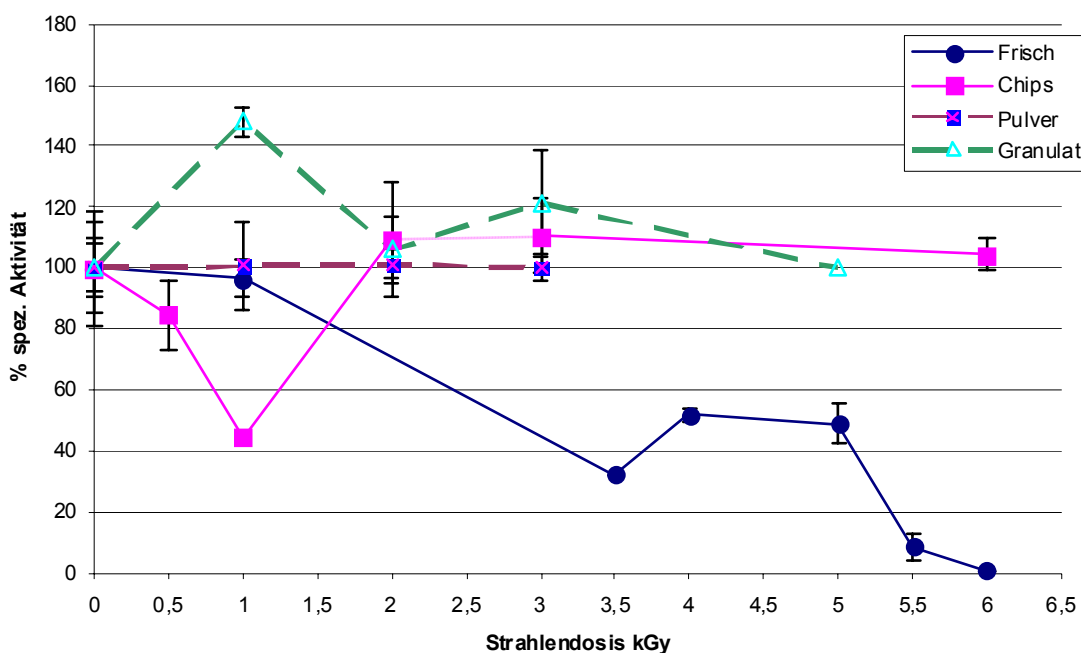
Wasserverlust bei der Herstellung von Knoblauchpulver ist zwar größer als bei Knoblauchchips und Granulat, jedoch ist vermutlich durch die Pulverisierung weniger CS-Gehalt erhalten geblieben. Dagegen wiesen Knoblauch-Chips weniger Verlust bzw. CS- Abbau auf.



<b>Tab.3.12 Der relative Gesamtgehalt der Cysteinsulfoxide [CS] % in bestrahlten Knoblauchvarietäten</b>									
<i>“Integration der Peakhöhen/cps, wobei MW: Mittelwert; M: Messung; STABW: Standardabweichung bedeutet. Die Werte sind Messsignale cps (count per second) der äquivalenten Konzentrationen.</i>									
Strahlendosis	M1	M2	M3	STABW	MW	Einwaage (mg)	[NH <sub>3</sub> ] %	[CS] %	STABW [%]
<b>Frische Knoblauch</b>									
0	10474,45	11153,14	11345,21	457,48	10990,93	373,50	0,034	0,34	0,011
1	5589,95	5537,36	5442,98	74,46	5523,43	352,45	0,018	0,18	0,006
1,5	4938,70	4784,64	4832,65	78,83	4851,99	357,00	0,016	0,16	0,005
2	5583,21	6201,81	6372,69	415,36	6052,57	358,50	0,019	0,20	0,006
3,5	7328,76	7471,60	7624,52	147,91	7474,96	374,00	0,023	0,23	0,008
4	5751,41	5242,28	5137,09	328,55	5376,93	363,50	0,017	0,17	0,006
5	4046,08	4105,40	4264,81	113,12	4138,76	362,50	0,013	0,13	0,004
5,5	4016,19	3980,14	4027,55	24,75	4007,96	359,00	0,013	0,13	0,004
6	3191,92	3141,86	2943,42	131,43	3092,40	370,00	0,010	0,10	0,003
<b>Knoblauchgranulat</b>									
0	5402,17	5346,81	5835,92	267,84	5528,30	250,50	0,025	0,26	0,008
1	5835,99	5841,41	5699,73	80,28	5792,37	252,25	0,026	0,27	0,009
1,5	6338,16	6480,93	7555,11	665,23	6791,40	250,50	0,031	0,31	0,010
2	7406,59	7550,60	7084,90	238,43	7347,36	251,20	0,034	0,34	0,011
3	<b>7301,28</b>	<b>7020,27</b>	7062,92	151,44	7128,16	250,50	0,033	0,33	0,011
<b>Knoblauchpulver</b>									
0	12001,56	11762,90	11924,71	121,83	11896,39	253,50	0,054	0,54	0,018
1	11511,66	10976,06	11406,56	283,80	11298,09	250,50	0,052	0,52	0,017
1,5	8635,32	8582,09	8777,59	101,07	8665,00	251,00	0,040	0,40	0,013
2	11762,76	10606,57	10185,82	816,55	10851,72	251,50	0,050	0,50	0,016
3	12174,37	12979,90	14792,43	1340,92	13315,56	250,50	0,061	0,62	0,020
<b>Knoblauchchips</b>									
0	6356,80	6077,17	6570,80	247,54	6334,92	165,00	0,006	1,86	0,126
0,5	5749,60	5547,90	5424,18	164,26	5573,89	197,00	0,005	1,36	0,092
1	5228,98	5318,32	5624,30	207,32	5390,53	173,00	0,005	1,51	0,102
1,5	5401,31	5261,52	4899,92	258,75	5187,58	179,00	0,005	1,40	0,095
2	4242,32	4547,02	4629,40	203,90	4472,91	163,00	0,007	1,30	0,088
3	4289,08	4579,41	4200,98	198,01	4356,49	161,00	0,006	1,29	0,087
3,5	6596,33	6002,03	5915,94	370,48	6171,43	193,00	0,007	1,53	0,104
4	3797,26	3685,00	3243,09	292,97	3575,12	168,00	0,005	1,01	0,068
5	2265,48	2732,17	2438,95	235,89	2478,87	162,00	0,005	0,71	0,048
6	3232,54	3384,67	3050,01	167,56	3222,41	161,00	0,006	0,94	0,063

### 3.2.3 Strahlungseinflüsse auf die Alliinaseaktivität

Um einen besseren Einblick in die Strahlungseinwirkung auf die Alliinase und die mögliche Korrelation mit dem Strahleneinfluss auf die Cysteinsulfoxide gewinnen zu können, wurde das Enzym Alliinase aus den vier oben erwähnten behandelt. Unbehandelte Knoblauchvarietäten wurden isoliert, und mit der etablierten Messmethode (s. Material und Methoden) wurde die Aktivität bestimmt und mit der Kontrolle verglichen. Hierzu wurden die gemessenen Enzymaktivitäten mit der steigenden Strahlendosis neben den Proteinkonzentrationen sowie die berechnete Proteinausbeute und der CS-Gehalt in der Tabelle 3.13 zusammengefasst. Für die grafische Darstellung der spezifischen Aktivität der Alliinase wurden die Aktivitäten bei den unbestrahlten Kontrollproben gleich 100 gesetzt, die Aktivitäten bei den bestrahlten Proben jeweils entsprechend normiert und in Abb.3.24 abgebildet.



**Abb. 3.24** Der Einfluss der Strahlendosis auf die spez. Alliinaseaktivität in Knoblauchvarietäten [Frisch, Granulat, Pulver, Chips]; 100 % entspricht die Alliinaseaktivität in unbestrahlten Proben.

Während die spezifische Alliinaseaktivität im frischen Knoblauch mit steigender Strahlendosis einen deutlichen Abfall aufweist, zeigt sich bei den anderen untersuchten Varietäten tendenziell keine relevante Änderung. Einerseits schwankt die Aktivität bei Chips und Granulat bei 1 kGy um den Ausgangswert von etwa 50%

mehr für Granulat und weniger für Chips; bei Pulver hingegen ergibt sich nahezu keine Änderung.

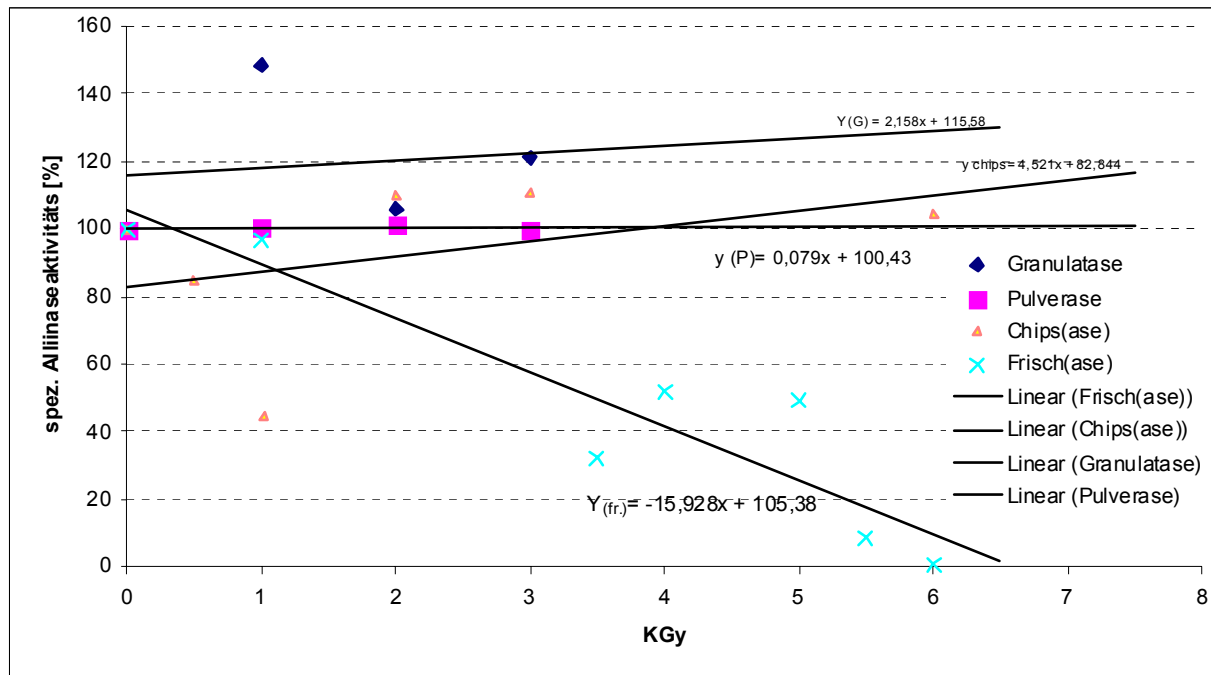
Eine interessante Beobachtung war, dass eine Dosis von 1 kGy einerseits bei frischen Proben leichte Inaktivierung zeigt und bei Chips etwa 50% der Aktivität verloren geht. Dahingegen zeigt Granulat eine Zunahme der Aktivität von etwa 50% über dem Ausgangswert, was vielleicht für bestimmte technologische Zwecke genutzt werden kann. Diese Veränderung der Aktivität erklärt sich dadurch, dass die Bestrahlung bei einer bestimmten Dosis (1 kGy) auf die Entfaltung des Enzyms einwirkt, so dass es zu einer Begünstigung beim Andocken des Substrats am aktiven Zentrum der Alliinase wie bei Granulat kommt, oder doch umgekehrt, wie es bei den anderen Varietäten der Fall war.

Was sich in den untersuchten Varietäten unterscheidet, ist der Wassergehalt, der bei den frischen Proben natürlich am höchsten ist (70%), während sich in Pulver (4,2%) nach Chips (7,2%) und Granulat (6,3%) am wenigsten befindet. Insofern wurde beim frischen Knoblauch bei 3,5 kGy Aktivität verloren und die totale Inaktivierung der Alliinase bei 6 kGy erreicht. Dahingegen ist bei Pulverproben, in denen sich am wenigsten Wasser befindet, wie zu erwarten ist, kaum eine Änderung zu verzeichnen. Wie in der Bestrahlung bekannt ist, dass die Strahlungseinwirkung und die daraus resultierenden Kettenreaktionen tendenziell mit Wasseraktivität in proportionalem Verhältnis stehen (Diehl 1995), so lässt sich die aggressive Änderung der Aktivität relativ in frischem Knoblauch als höchst betroffener Probe erklären.

Oben wurde bereits darauf hingewiesen, dass hier die dazu gehörigen Auswertungen der spezifischen Alliinase-Aktivität in Prozent ausgedrückt sind. Die Ausbeute für die unterschiedlichen Knoblauchvarietäten und der Gehalt der Cysteinsulfoxide sind in Tab. 3.13 zusammen aufgeführt.

Tab. 3.13 Die Änderung der spezifischen Alliinase-Aktivität der untersuchten Knoblauchvarietäten und deren gesamten Gehalt an Cysteinsulfoxide mit zunehmender Strahlendosis									
Knoblauch Probe	Strahlendosen [kGy]	Einwaage [g]	Proteinkonzentration [mg/ml]	Protein Ausbeute %	MW spez. Alliinase-Aktivität [ $\mu\text{mol}/(\text{mg}\cdot\text{min})$ ]	spez. Alliinase-Aktivität [nkat/mg]	% spez. Aktivität [ $\mu\text{mol}/(\text{mg}\cdot\text{min})$ , Lowry]	STAB W %	CS-Gehalt %
Granulat	0	1	3,11	0,31	4,41	73,58	<b>100,00</b>	18,98	0,26
	1	1	3,50	0,35	6,54	108,97	148,10	4,68	0,27
	2	1	3,50	0,35	4,68	77,94	105,93	11,09	0,34
	3	1	3,50	0,35	5,35	89,21	121,25	17,00	0,33
Pulver	0	1	3,67	0,37	1,35	22,51	100,00	14,91	0,54
	1	1	3,60	0,36	1,36	22,67	100,73	14,66	0,52
	2	1	3,50	0,35	1,37	22,84	101,46	4,66	0,50
	3	1	3,30	0,33	1,35	22,51	100,02	3,99	0,62
Chips	0	1	4,31	0,43	11,62	193,78	<b>100,00</b>	9,72	1,86
	0,5	1	4,91	0,49	9,84	163,99	84,63	11,66	1,36
	1	1	4,40	0,44	5,18	86,42	44,60	0,86	1,51
	2	1	4,53	0,45	12,73	212,27	109,54	18,72	1,30
	3	1	4,67	0,47	12,85	214,25	110,57	12,37	1,29
	6	1	4,50	0,45	12,13	202,18	104,33	5,31	0,94
Frisch	0	1,60	2,70	0,17	11,48	191,44	<b>100,00</b>	8,02	0,34
	1	2,04	2,42	0,12	11,11	185,14	96,71	5,97	0,21
	3,5	2,01	2,08	0,10	3,71	61,85	32,31	0,00	0,19
	4	2,03	2,60	0,13	5,97	99,55	52,00	2,05	0,17
	5	2,00	2,60	0,13	5,62	93,74	48,96	6,68	0,13
	5,5	2,02	2,40	0,12	0,99	16,53	8,63	4,35	0,13
	6	2,03	2,60	0,13	0,10	1,65	0,86	0,00	0,10

Um nun eine annähernde Erfassung der tendenziellen Einwirkung der Bestrahlung auf Alliinase zu verdeutlichen, wurden hierzu die Linearen sowie deren Gleichungen für die vier Varietäten mit deren steigender Behandlungsdosis gegeneinander aufgetragen und grafisch in Abb. 3.25a dargestellt.

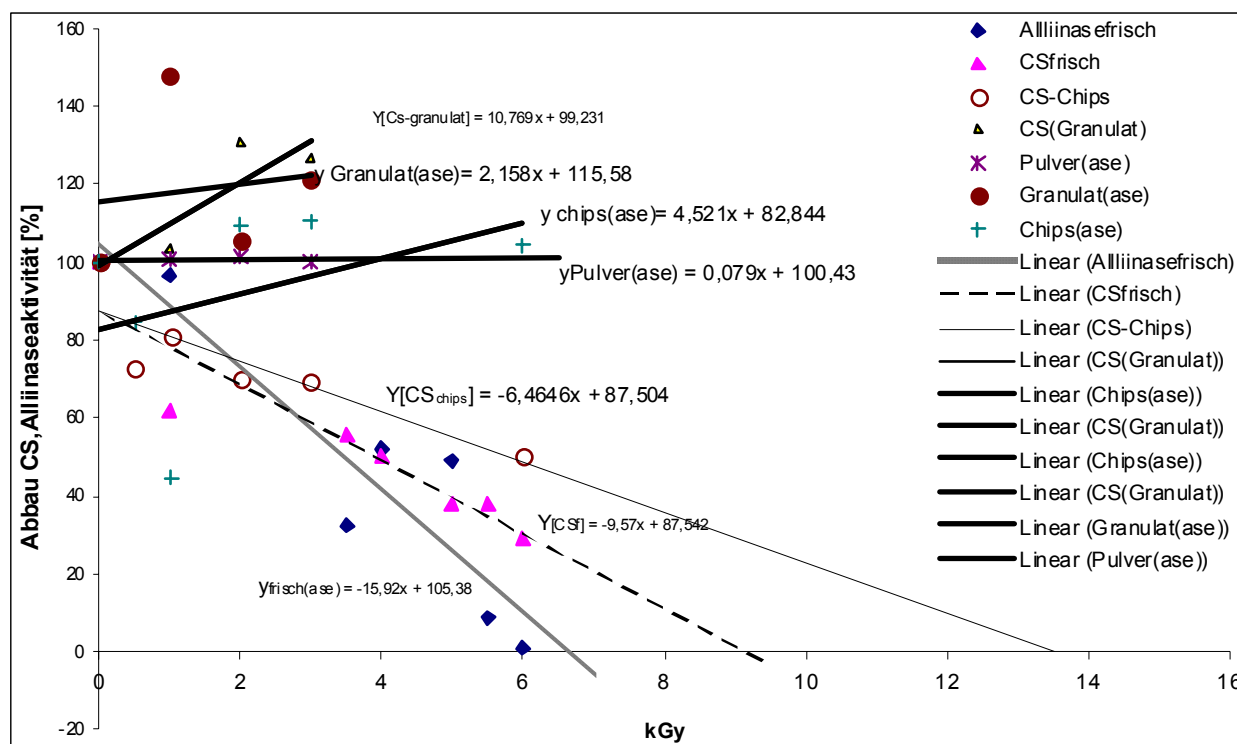


**Abb. 3.25a** Lineare Darstellung des Strahleneinflusses auf die spezifische Aktivität der Alliinase in frischem Knoblauch, Pulver, Granulat und Chips

Eine Aussage über den Einfluss der ionisierenden Strahlung auf Alliinase kann man hier wohl treffen: nämlich dass eine Bestrahlung bei frischem Knoblauch zu einer Linearen tendiert, Inaktivierung der Alliinase bei einer Steigung von (-16) stattfindet und ab 6 kGy eine totale Inaktivierung zu erwarten ist. Bei den anderen Varietäten (Granulat, Chips) trat eine Änderung bei 1 kGy auf, und für die verwendeten Strahlendosen wurden keine massiven Änderungen beobachtet. Hierfür sollten weitere steigende Strahlendosen auf Alliinase in Pulver, Chips und Granulat in Bezug auf technologische und charakteristische Interessen untersucht werden.

Um zu erfahren, in welchem Verhältnis Alliinase im Knoblauch zum Gesamtgehalt der Cysteinsulfoxide unter ionisierendem Strahlungseinfluss steht, wurde der Einfluss der Strahlendosis gegen die Änderung des CS-Gehalts in den Varietäten frischer Knoblauch, Chips und Granulat - unter Ausschluss des CS-Gehalts von Pulver anlässlich seines unregulären Verlaufs (s. Abb.3.23) - und die gemessene Alliinaseaktivität aus frischem Knoblauch, Chips, Pulver und Granulat, auf 100 normiert, aufgetragen (Abb. 3.25b). Zunächst kann man die Darstellung in Abb.3.25b in zwei Gruppen aufteilen. Die erste ist die mit den nach unten gerichteten Linearen

(Abschnitt mit der x-Achse). Sie lässt erkennen, dass der Abfall der Alliinaseaktivität mit einer Steigung von (-15) doch schneller ist in frischem Knoblauch bei steigender Strahlendosis als der CS-Abbau (-9). Ebenso ist der Abbau von CS in Chips langsamer, als er in frischem Knoblauch verlief. Diese Erkenntnisse könnten für die Optimierung unterschiedlicher technologischer Prozesse und Zwecke interessant sein.



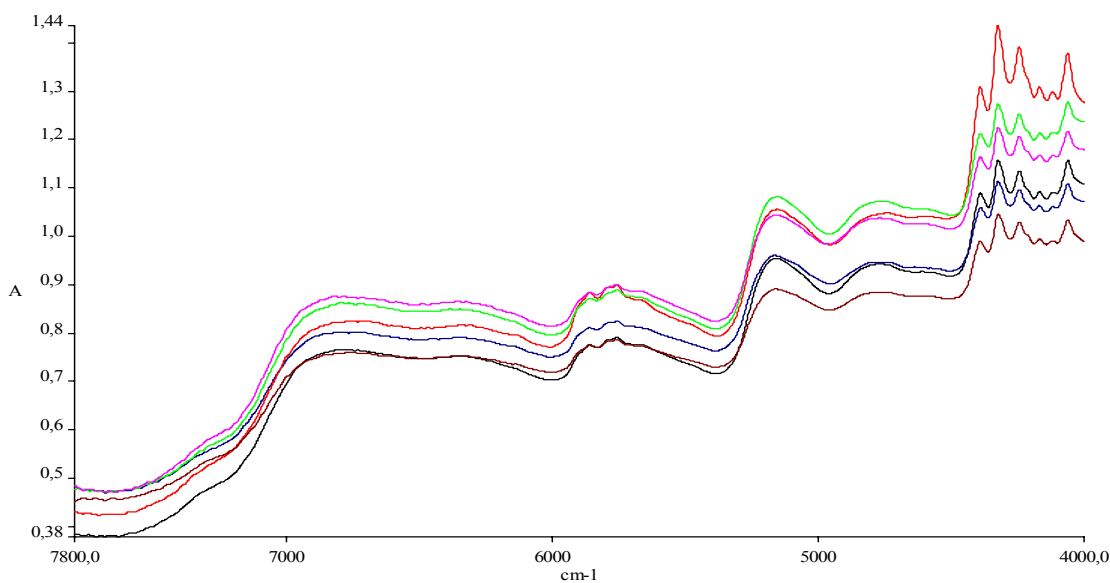
**Abb. 3.25b:** Trend der Wirkung von steigender Strahlendosis auf Alliinase und CS-Gehalt in verschiedenen Knoblauchvarietäten

Die andere Gruppe ist in der oberen Hälfte der Abbildung zu sehen, nämlich die Linearen, die lediglich drei Strahlendosen unterlagen. Sie offenbaren keine aussagefähige Korrelation mit deren jeweiligem CS-Gehalt. Ausgenommen ist, dass Alliinase sich bei Granulat und Pulver für die verwendeten Dosen 0 bis 3 kGy gleichermaßen als von der verwendeten Strahlendosis wenig angesprochen erwiesen, wobei Pulverproben, nahezu waagrecht unangesprochen von der Strahldosisänderung, wie beim Ausgangswert weiter verliefen (Steigung 0,07). Dies lässt auf eine Kandidierung des Knoblauchpulvers als vom Strahleneinfluss best verschonte Form schließen, die sich trotzdem für unterschiedliche Zwecke bestens eignet als durch Bestrahlung konservierte Quelle von Alliinase.

### 3.2.4 Untersuchung von bestrahltem Knoblauch mittels NIR

Um eine mögliche qualitative Unterscheidung zwischen bestrahltem und unbestrahltem Knoblauch zu erreichen, wurde die NIR-ATR-Technik (NIR – Nahinfrarot IR-Spektroskopie, ATR – attenuated total reflection) als schnelles Scanverfahren eingesetzt; Spektren im Bereich (7800 - 4000  $\text{cm}^{-1}$ ) wurden aufgenommen und mit den unbehandelten Kontroll-Proben verglichen.

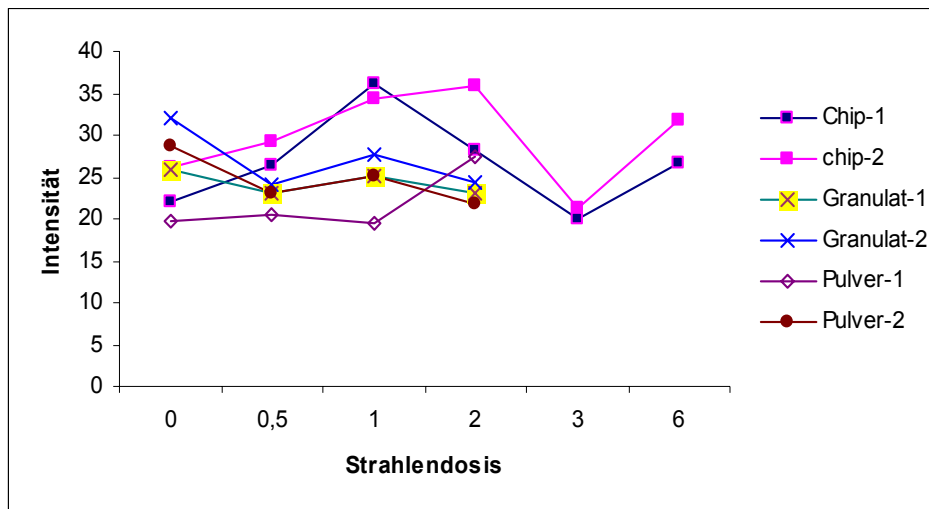
NIR- Spektren wurden bei Raumtemperatur ( $22 \pm 1^\circ\text{C}$ ) aufgenommen.



**Abb. 3.25-1:** NIR-Vergleich-Spektren von Knoblauch-Chips bei (4000-7800  $\text{cm}^{-1}$ )

Wobei: Blau (0-); Rosa (0,5-); Rot (1-); Grün (2-); Braun (3-); Schwarz (6- kGy).

Die erfassten Spektren ließen sich in den Bereichen 5392-5991; 4962-5346  $\text{cm}^{-1}$  geringfügig voneinander unterscheiden, wofür eine Integration für die jeweiligen Bereiche errechnet und die Abhängigkeit dementsprechend von der Strahlendosis grafisch dargestellt wurde (Abb. 3.25-2).



**Abb. 3.25-2:** Darstellung der MIR- Spektrenerauswertung für Knoblauchvarietäten in Abhängigkeit von den Strahlendosen; 1: [5392-5991], 2:[4962-5346] cm<sup>-1</sup>

In Abb. 3.25-2 erwies sich bis 3 kGy keine relevante Änderung bei den erfassten Spektren der Knoblauchvarietäten. Es sollten Versuche mit weiteren höheren Strahlendosen folgen.



### 3.2.5 Bestrahlung von Eiklar

Durch Lebensmittel übertragene Infektionskrankheiten sowie mikrobiell verursachte Lebensmittelintoxikationen spielen auch in Deutschland eine nicht zu vernachlässigende Rolle. Zwischen 1995 und 1999 erkrankten (starben) 515.218 (313) Personen an Salmonellose, 501.765 ( 676 ) an " Enteritis infectiosa ", 8.625 (12) an Shigellose, 565 (1) an Typhus, 388 an Paratyphus, 93 (1) an Trichinellose und 74 (3) an Botulismus (Ernährungsbericht 2000).

Deshalb wächst das Interesse an einer effektiven Behandlung mit ionisierenden Strahlen, die in der letzten Zeit in mehr als vierzig Ländern genehmigt wurde (Clearances of Irradiated Food, [www.iaea.org/icgfi](http://www.iaea.org/icgfi)). In Deutschland wurde vor kurzem die Bestrahlung von Kräutern und Gewürzen zugelassen (Bundesgesetzblatt 2000).

Damit die Behandlung unserer Nahrung besser kontrolliert werden kann, ist die Entwicklung von Nachweisverfahren für bestrahlte Lebensmittel wie Fleisch, Eiprodukte, Kaseinate u.a. eine wichtige Aufgabe.

Die Methoden, die bisher für den Nachweis bestrahlter Nahrungsmittel entwickelt wurden, basieren auf Veränderungen von Kohlenhydraten, Fetten, Enzymen, DNA sowie von anorganischen Bestandteilen (Knochen; Gräten; Sand) durch Bestrahlung. Lebensmittel, die anorganische Bestandteile enthalten, werden mit Hilfe der Thermolumineszenz oder photostimulierter Lumineszenz analysiert (Sanderson 1995, Schreiber et al. 1993).

Die DNA in Nahrungsmitteln wird mit Hilfe von Antikörpern gegen spezifische strahleninduzierte Änderungen getestet ( Jabir et al. 1989) oder über DNA-Fragmentierung nachgewiesen (Deeble et al.1990; Cerda,1998; Delincee 2001 ); fetthaltige Nahrungsmittel werden über GC-MS, LC-LC-GC erfasst (Nawar1986, Merritt et al. 1985).

Zur Analyse getrockneter Nahrungsmittel bzw. Lebensmittel mit harter Matrix werden ESR bzw. EPR eingesetzt (Desrosiers 1996).

Für proteinhaltige Nahrungsmittel wie flüssiges Eiweiß sind diese Nachweismethoden nicht einsetzbar. Deswegen wäre eine Methode wünschenswert, die auf dem Einfluss ionisierender Strahlung auf die Proteinstruktur basiert.

Die Bestrahlung wirkt auf Proteine in unterschiedlicher Weise. Einerseits werden die Proteine in kleinere Fragmente gespalten, andererseits erhöht sich das Molekulargewicht dieser Fragmente infolge einer Aggregationsbildung (von Sonntag 1997).

Es wurde angenommen, dass die radiolytischen niedermolekularen Fragmente spezifische Ansatzmöglichkeiten für Nachweismethoden bieten. So wurde Orthotyrosin zeitweilig als strahlenspezifisches Produkt bezeichnet und als eindeutiger Hinweis auf eine Bestrahlung der Lebensmittel beschrieben (Dizdaroglu and Simic, 1980; Simic und de Graff, 1981). In späteren Studien hat man es auch in unbestrahlten proteinhaltigen Lebensmitteln nachgewiesen (IAEA 1991). So bleibt die Entwicklung einer aussagekräftigeren Nachweismethode im Vordergrund.

Die Kapillarelektrophorese ist eine relativ neue analytische Technik und ermöglicht eine schnelle Auftrennung von Proteinen. Die Umweltfreundlichkeit und die einfache Handhabung dieser Technik macht die Verwendung der CE für die Routinekontrolle der bestrahlten Güter zu einer Notwendigkeit. Je nach Auftrennungsprinzip lassen sich mit der CE zahlreiche Methoden entwickeln.

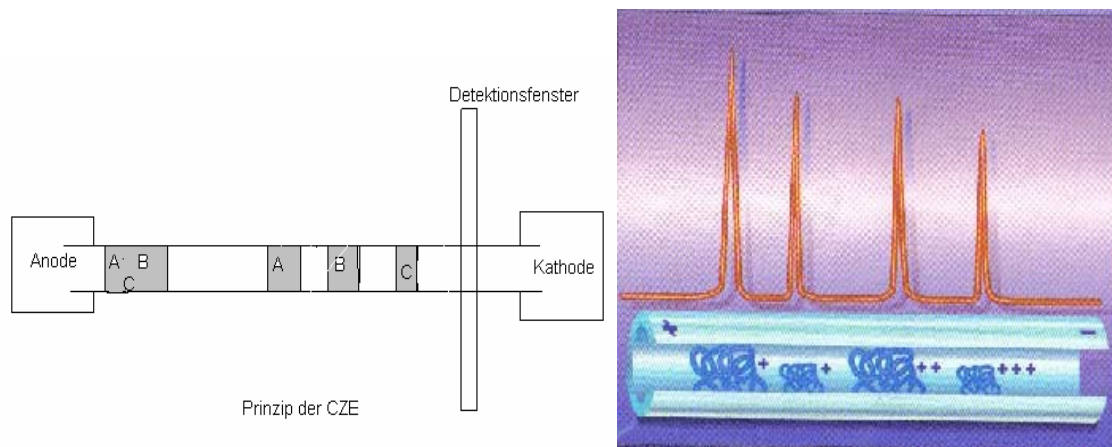
In dieser Arbeit wird die CE-Technik für den Nachweis von bestrahltem Eiklar eingesetzt, und es werden zwei Auftrennungsmethoden hierfür entwickelt. In den folgenden Abschnitten wird, wie bereits im Abschnitt 2.3.3 erwähnt, das CE-Prinzip erläutert und hier im Folgenden je nach Methode genauer aufgeführt.

### **3.2.5.1 Auftrennung durch CZE**

Bei der CZE handelt es sich um eine Elektrophorese von geladenen Teilchen in freier Lösung. Die Trennung der Analyten erfolgt aufgrund ihrer unterschiedlichen Ladungs-Massen-Verhältnisse in einem homogenen Puffersystem. Der pH-Wert und der Puffer wie auch die Feldstärke bleiben über die Trennstrecke hinweg konstant.

Die Proben werden als konkrete Zone im Gemisch am Anfang der Kapillare aufgegeben und als voneinander getrennte, diskrete Zonen durch den Detektor

nachgewiesen. Der Puffer hat bei dieser Technik die Aufgabe, den pH-Wert konstant zu halten und den Stromtransport zu gewährleisten (s. folgende Abbildung).



Die Wahl des Puffer-pH-Wertes bestimmt die Ladung der Probenmoleküle und damit die Migrationsrichtung (Chrambach et al. 1986).

Da die meisten Eiklarproteine einen isoelektrischen Punkt zwischen 4 und 7 aufweisen (Tab.3.14), wurde ein Puffer mit saurem pH-Wert eingesetzt, um einer möglichen Adsorption an der Kapillarwand entgegenzuwirken. Diese Maßnahme ermöglichte den Einsatz von günstigen unbeschichteten Kapillaren.

**Tab.3.14** Physikochemische Eigenschaften von Eiklarproteinen (Robinson 1972 )

Protein	% im Gesamtprotein	Molgewicht	i.P.
Ovalbumin	54,0	45000	4,6-4,8
Conalbumin	13,0	76000	6,1-6,6
Ovomucoid	11,0	28000	3,9-6,6
G-1 Lysozym	3,5	14300	10,5-11,0
G2-Globulin	4,0	40000	5,5
G3-Globulin	4,0	58000	4,8
Ovoflavoprotein	0,8	32000	3,9- 4,1
Ovomucin	1,5	8300000	4,5-5,0
Avidin	0,05	68300	9,5- 10
Ovoglykoprotein	0,5	24400	3,9
Ovomakroglobulin	0,5	720000	4,5- 4,7

Eingesetzt wurde ein 0,1 M Phosphatpuffer, pH 2,5 (Bio-Rad, München), der genügend Ladungsunterschiede zwischen den Analyten erzeugt, ohne dass gleichzeitig eine Denaturierung durch eine extreme Säurenstärke einhergeht.

Fünf verschiedene Proben von Eiklar wurden eingesetzt:

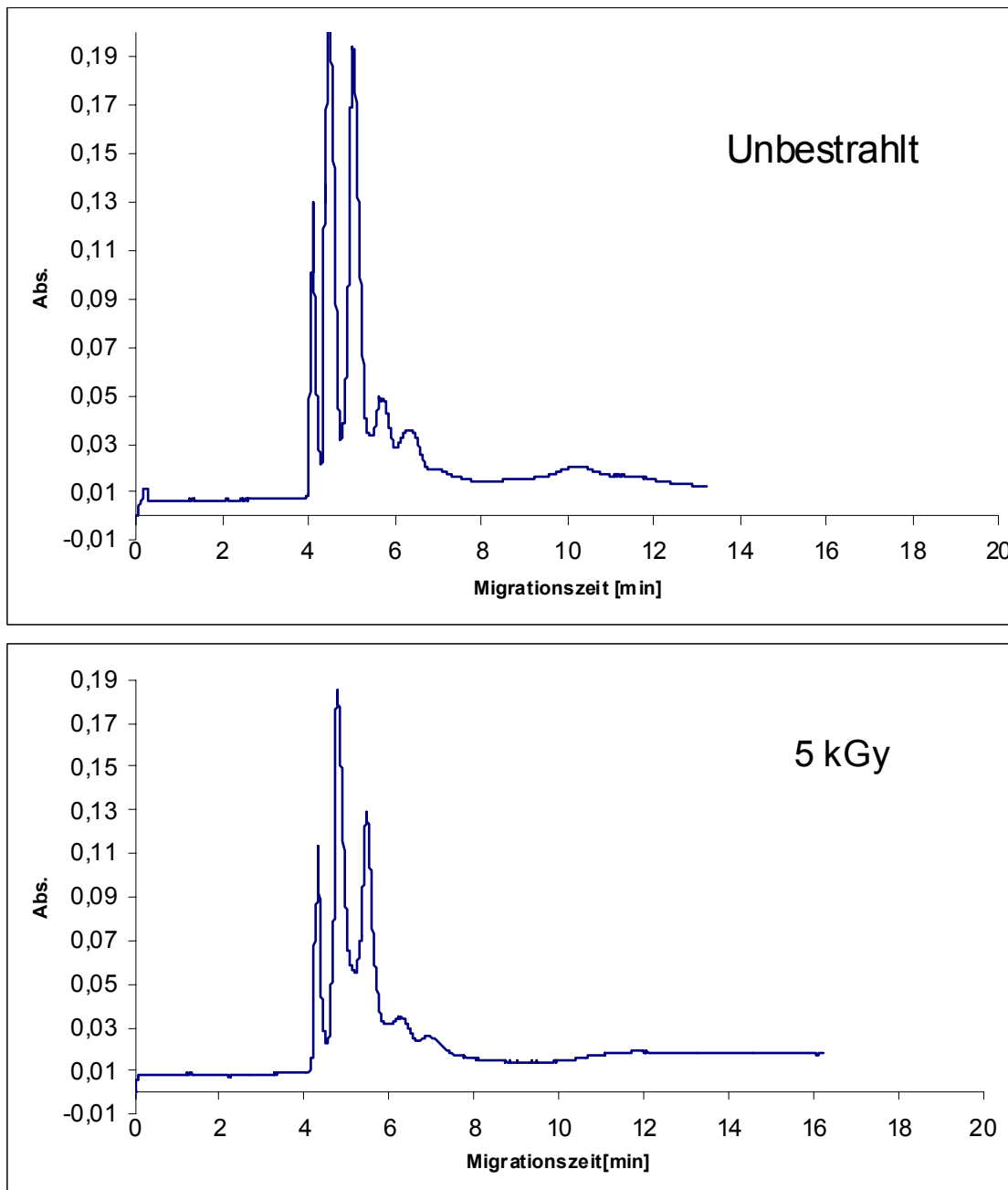
- a- flüssig, frisch (*nach Einkauf wird Eiklar portioniert und bis vor der Analyse eingefroren*)
- b- flüssig, nicht pasteurisiert (*um Lagereffekt auf Eiklar zu untersuchen, Proben sind in Raumtemperatur eine Woche aufbewahrt, dann 20 Tage bis vor der Bestrahlung bei 4 °C*)
- c- flüssig, pasteurisiert
- d- pulverisiert
- e- kristallisiert

Die Proben wurden mit Dosen von 0 bis 10 kGy bestrahlt und durch CZE aufgetrennt. Die Laufbedingungen für CZE sind in Tabelle 4 zusammengestellt.

Tabelle 4. Trennbedingung für CZE

CZE METHODE: SINGLE RUN GROUP
Capillary: 24 cm x 50 µm ID: Unbeschichtet
Karousel Setpoint Temp (C°): 20
Kapillare Temp(C°):15
Prep Cycle 1 Pre-Inject; Inlet, SRG; Outlet, Waste; 60 sec   Pressure Prep Cycle 2 Post-Inject, Inlet, SRG; Outlet, Waste;00 sec HI Pressure Injection: 10.00 kV, 20 sec. Run: 10.00 kV,50-55 µA
Polarity: + to -
Wavelength(nm): Scan, 195 - 360, 5, Integ 200

In allen flüssigen Proben war zu beobachten, dass sich die Peak-Fläche in den bestrahlten Proben besonders für die zwei letzten Peaks reduziert hat. Als Beispiel wird die Auftrennung von flüssigem frischem Eiklar hier gezeigt (Abbildung 3.26).



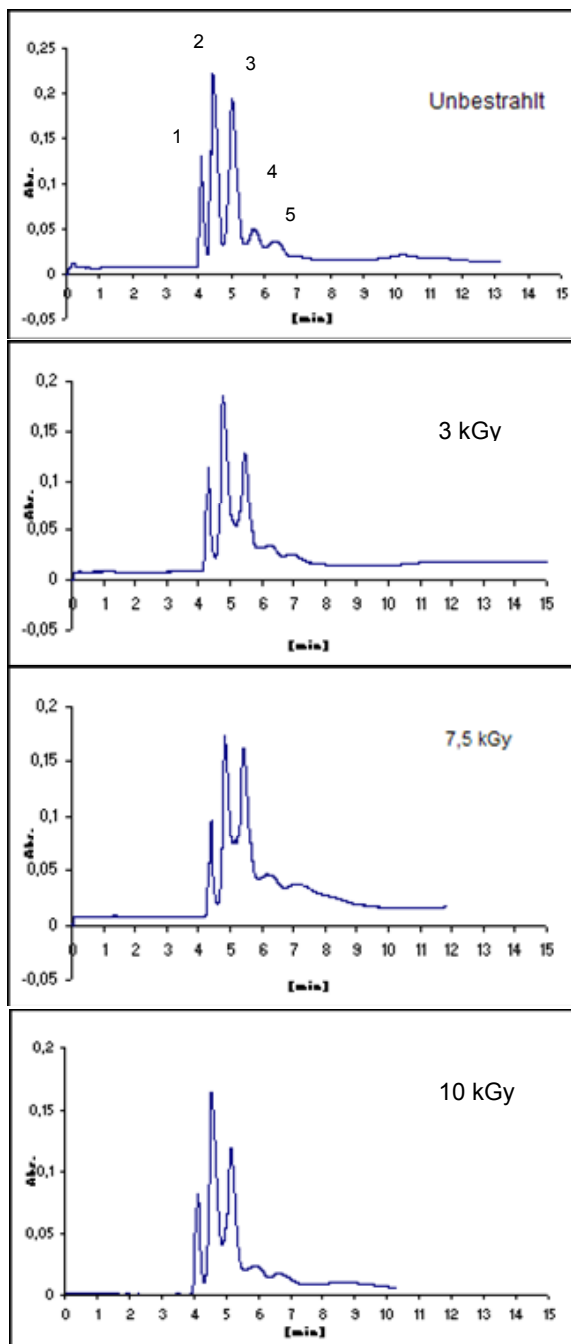
**Abb. 3.26** CZE-Auftrennung von flüssigem frischem Eiklar (Phosphat PufferpH2,5; Inject. 10kV, 20sec; Run: 10kV; unbesch. Kap. 24cmx50ID; Temp. (C°) 20 Polarität: + to -; Integ 200 nm )  
Karousel setpoint Temp. (C°): 15  
Prep Cycle 1 pre-inject; Inlet; SRGoutlet, Waste; 60 sec Hi Pressure  
Prep Cycle 2 pre-inject; Inlet; SRGoutlet, Waste; 00 sec Hi Pressure

### **3.2.5.1.1 Auftrennung von flüssigem frischem Eiklar**

Frisches Eiklar wurde mit unterschiedlichen Strahlendosen (0; 3; 5; 7.5; 10 kGy) bestrahlt und unter gleichen Laufbedingungen aufgetrennt.

Bis auf die Reduzierung in der Peak-Fläche wurde kein relevanter Unterschied zwischen bestrahlten und unbestrahlten Proben gefunden. Diese Reduzierung könnte möglicherweise auf die Fragmentierung und die Aggregations-Vorgänge zurückzuführen sein, die durch Bestrahlung hervorgerufen werden.

Zum Vergleich mit der unbestrahlten Probe sind die Auftrennungen für die mit unterschiedlichen Strahlendosen behandelten Proben in Abb. 3.27 dargestellt.



**Abb. 3.27-1** : CZE Auftrennung von flüssigem frischem Eiklar, das mit verschiedenen Strahlendosen behandelt wurde.

Phosphatpuffer pH 2,5; Injct. 10.00 kV, 20 sec ; Run: 10.00 kV; uncoated Cap. 24cm x 50 ID;

Polarity: + to - ; Integ 200 nm step. 5 nm

Carrousel setpoint Temp (C°): 15; Cap. Temp. (C°): 20

Prep Cycle 1 pre-Inject; Inlet, SRG; outlet, Waste; 60 sec HI

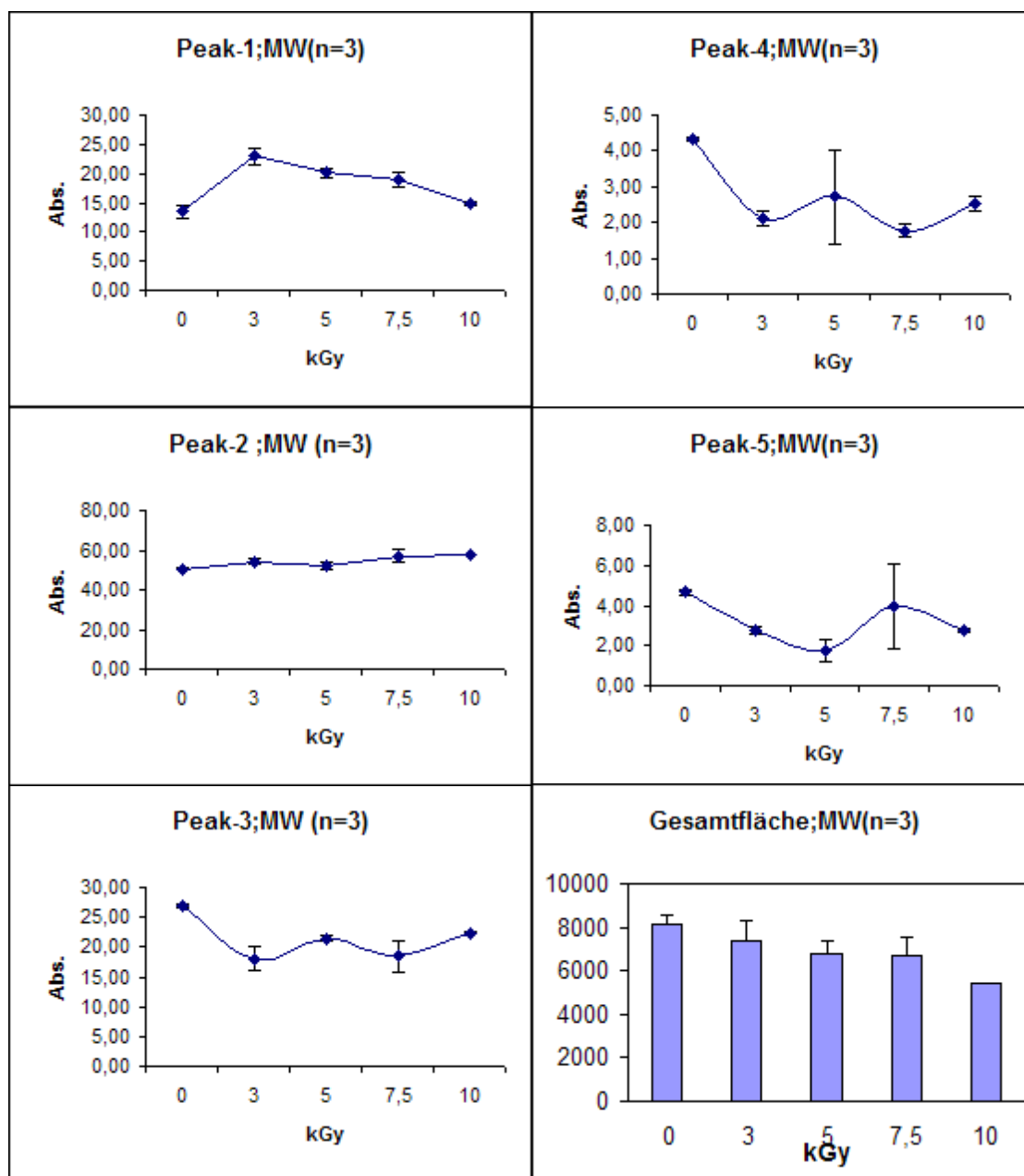
Pressure

Prep Cycle 2 pre-Inject; Inlet, SRG; outlet, Waste; 00 sec HI

Pressure)

Um die oben beschriebene Abnahme bzw. Strahlenänderung der aufgetrennten Eiklarproteine zu bewerten, wurden die Peaks beziffert, nach Peakfläche integriert, gegen die steigende Strahlendosis jeweils aufgetragen und in Abb.3.27-2 abgebildet. Die dazu gehörigen Messwerte sind dem Anhang (Tab.5-1, 2) zu entnehmen. Zur Erleichterung der Beschreibung von später gezeigter Identifizierung der aufgetrennten Proteine des Eiklars wurden diese im Text und Bild sowie in Tabellen als nummerierte Peaks behandelt.

**Abb. 3.27-2:** Änderung der Peakflächen von flüssigem frischem Eiklar, das mit verschiedenen Strahlendosen behandelt wurde (nach der CZE Auftrennung).





Bei der Auswertung der Peaks stellt sich heraus, dass eine Änderung der Peaksfläche mit steigender Strahlendosis erfasst werden kann.

Während Peak-1 bei 3 kGy einen Anstieg um 70 % des Ausgangswertes (0 kGy) aufwies, zeigten die anderen Peaks bei gleicher Strahlendosis bis auf Peak-2 (vernachlässigte Änderung) hingegen eine Abnahme von etwa 43 % bei Peak-3, 51 % bei Peak-4 und 40,9 % bei Peak-5.

Ebenso hat sich die Abnahme bei Peak-3 und Peak-4 bei 7,5 kGy wie bei 3 kGy dargestellt.

Auf der anderen Seite zeigten die aufgetrennten Peaks nach der ersten Strahlendosis (3 kGy) tatsächlich eine eindeutige Änderung, wonach dann nur eine Schwankung um diesen Wert registriert wurde. Diese Änderungen haben sich nach der Integration im gesamten Profil aller Peaks zusammen mit einer relativ gleichmäßigen gradierten Abnahme bestätigt. Die höchsten Änderungen wurden bei Peak-1 mit 70% bei 3 kGy als Zunahme, mit 73,53 % bei 5 kGy in Peak-5 sowie 59,2% bei 7,5 kGy in Peak-4 (Conalbumin) verzeichnet.

Aus den vorstehenden Absätzen lässt sich folgern, dass eine steigende Strahlendosis nicht unbedingt mit einer akkumulierten Wirkung in diesem Zusammenhang einhergehen muss. Denn jeder Peak hier bezeichnet ein Protein, das seine UV-Absorption einerseits mit steigender Strahlendosis unterschiedlich nach CZE-Auftrennung gezeigt hat; andererseits ließen die unterschiedlichen aufgetrennten Proteine doch unterschiedliche Veränderungen bei gleicher Strahlendosis verzeichnen. (Peak-1 Zunahme bei 3kGy gegen Abnahme bei Peak-3,4,5).

Nach der Identifizierung der Peaks (siehe kapt. 3.2.5.1.2.) hat sich herausgestellt, dass es sich beim Peak-1 um Lysozym handelt. Lysozym weist eine globuläre Struktur auf, ist mit fünf  $\alpha$ -Helices und fünf  $\beta$ -Faltblättern aufgebaut und besitzt vier Disulfidbrücken. Sein Molekulargewicht (wie in der Tab. 3.14) liegt bei 14,3 k Dalton (Robinson 1972).

Der strahleninduzierten Zunahme der Absorption beim Peak-1 kann u.a. eine Begünstigung der optischen aktiven Terminals des Lysozyms (wie Änderung an seiner Solvatation, Dielektrizitätskonstante etc.) zugrunde liegen. Möglicherweise haben sich aber auch ein bzw. mehrere Fragmente der anderen Proteine mit in der gleichen Zone des Lysozym in einer Aggregation verknäult und zu dieser Zunahme bei 3 kGy geführt, zumal ja eine Abnahme der Absorption bei den Peaks verzeichnet worden war. Denn bei CZE-Trennung werden vorhandene Analytenionen gleicher Masse/Ladung-Ration die gleiche Zone bilden und sich als Peak detektieren lassen. Die Strahlungseinflüsse auf das Lysozym sind schon in die Literatur beschrieben, wie z.B. bei Dizdaroglu et al. 1982, wo OH-Radikale induzierte Produkte aus gespaltenen Peptiden und Aminosäuren von Lysozym gaschromatographisch identifiziert haben. Ebenso konnte in CZE-Trennung Strahlungsanfälligkeit für Lysozym u.a. recht gut erfasst werden.

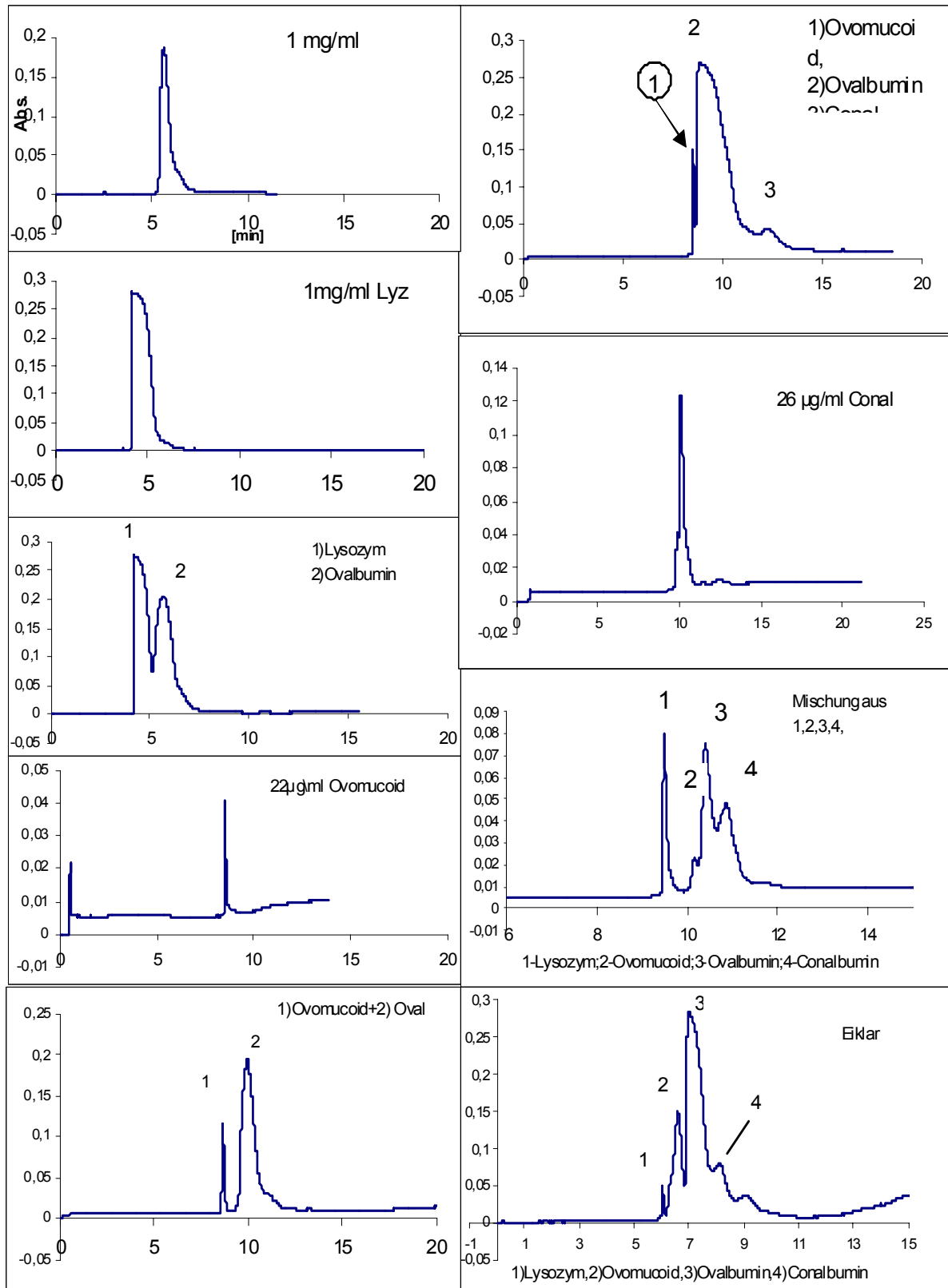
#### **3.2.5.1.2 Identifizierungen der Eiklar-Peaks und ihrer Nachweisgrenze**

Für die Identifizierung von Eiklarproteinen wurden einzelne Proteine wie Ovalbumin, Lysozym, Ovomuroid und Conalbumin unter gleichen Laufbedingungen einzeln und im Gemisch injiziert, CZE analysiert und in Abb. 3.3-1 sowie 3.3-2 dargestellt.

### Abb. 3.33-1 Identifizierung der Eiklar-Peaks

(Phosphatpuffer pH 2,5; Injct. 5.00 kv, 20 sec; uncoated Cap. 24 cm x 50 ID; Cap.

Temp.(C°): 20; Polarity: + to -; Integ 200 nm step, 5 nm

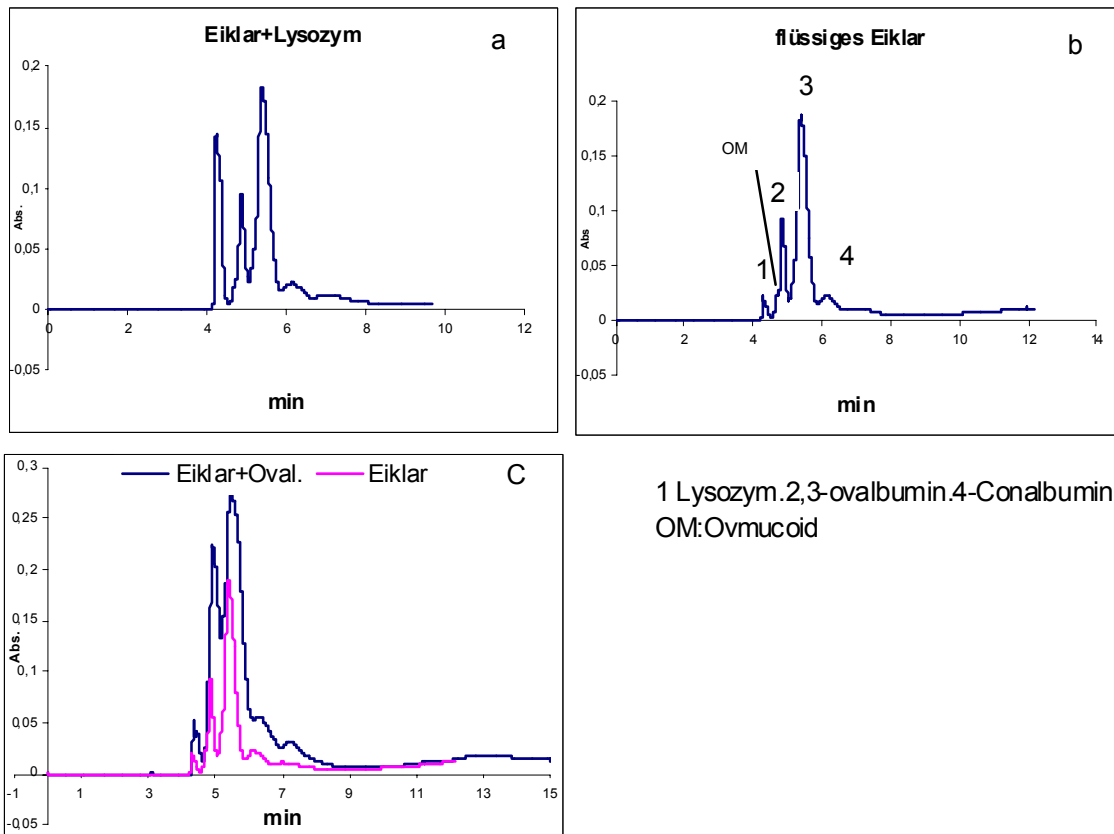


Da eine Identifizierung der Peaks nach Migrationszeit allein nicht möglich war, hinsichtlich der Migrationszeit - Unterschiede zwischen den einzelnen Proteinstandards - Injektionen und deren Gemisch, wurden die einzelnen Proteine der Eiklar-Probe als interne Standards hinzugefügt und erneut aufgetrennt (Co-Elektrochromatogramm).

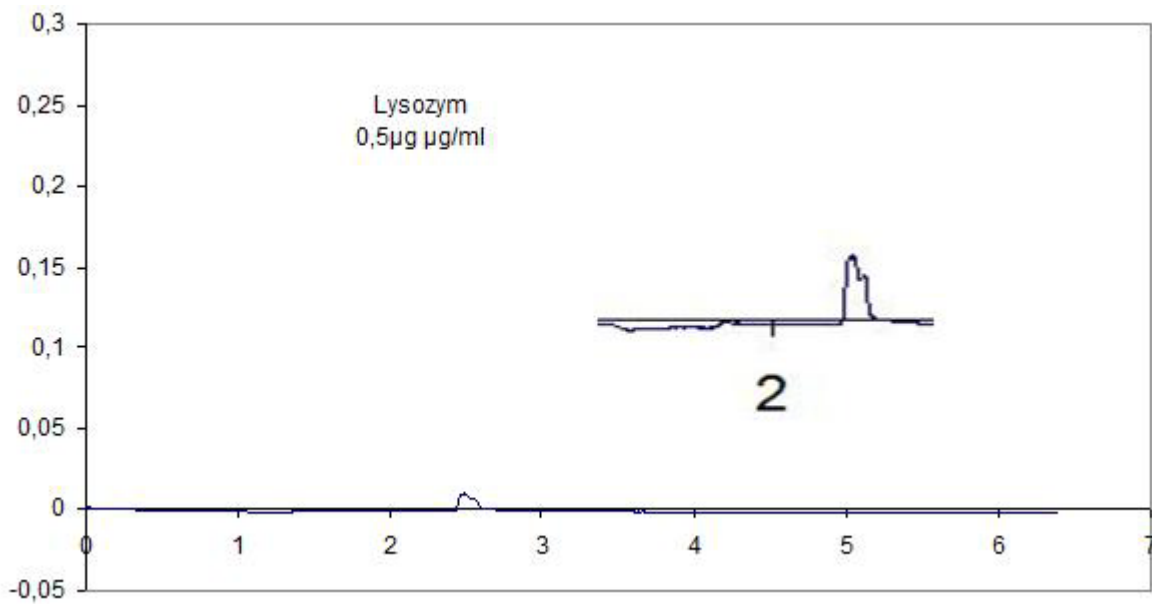
Dabei stellte sich heraus, dass es sich beim Peak-1 um das Lysozym handelt. Während der Peak-2 sich mit Ovomuroid vereinigt, war der Peak-3 als Ovalbumin zu erkennen. Der Peak-4 kann aufgrund der Migrationszeit möglicherweise das Conalbumin sein (Abb. 3.33-1; 3.33-2).

**Abb.3.33-2** CZE-Identifizierung-Auftrennung von flüssigem frischem Eiklar mit der Zunahme des Lysozym und Ovalbumin-Peaks

(Phosphatpuffer pH2,5; Injct. 5.00 kv, 20 sec ; uncoated Cap. 24cm x 50 ID; Cap. Temp.(C°):20; Polarity:+ to - ; Integ 200 nm step, 5nm; Runvolt 10 kv



Um eine Aussage über die Nachweisgrenze der Proteine bei der CZE zu treffen, wurden unterschiedliche Konzentrationen vom Lyz. injiziert. Bei einer Injektionsmenge von 0,5 µg/ml lag das Signal/Rausch-Verhältnis bei etwa 14. Die Nachweisgrenze (Signal/Rausch-Verhältnis 3) müsste demnach bei ca. 100 ng/ml liegen. (Abb. 3.34).



**Abb. 3.34** Detektionslimit für Lysozym in CZE Phosphatpuffer PH 2.5

Auftrennung Bedingungen : Unbeschichtetes Kapillar 50 ID x 24 cm.elect.inject.10 k/20 sec  
 kv/20 sec Polarity +> -- , Carrousel setpoint Temp(c°):15,Integ.wellenlänge(nm): 200  
 Run Volt 400-420 V/cm)X-axis:min;Y-axis:Absorption

### 3.2.5.1.3 Auftrennung von flüssigem gelagertem Eiklar

Abbildung 3 zeigt die Auftrennung von flüssigem gelagertem Eiklar, sowohl unbestrahlt, als auch mit verschiedenen Dosen bestrahlt.

Diese Proben unterscheiden sich von dem frischen flüssigen Eiklar, da sie nicht frisch und direkt analysiert worden sind, sondern als flüssiges Eiweiß in 50 ml Plastikflaschen unter Raum- und Transporttemperatur von 17-20°C im Durchschnitt für eine Woche gelagert und nach Bestrahlung bis vor der Analyse wie die anderen Proben weiter behandelt wurden.

Bei der CZE-Auftrennung ist es unter den aufgeführten Trennungskonditionen angedeutet, dass sich das Ladungs-/Massenverhältnis der Eiklarproteinionen leicht vergrößert, was sich in einer minimalen Besserung der Auflösung beim Peak-1 (Lysozym) widerspiegelt. Die Reduzierung der Peak-Fläche ist deutlich in den letzten zwei Peaks (4; 5; durch Pfeil markiert) (bei 10 bzw. 7,5 kGy) zu erkennen (s. entsprechende Auswertung im Diagramm).

Wie bei oben vorgenommener Auswertung sind die jeweiligen Peaks beziffert und gegen die Strahlendosen aufgetragen (Abb.3.28-1,2); die entsprechende Tabelle [Tab. 6.2] ist im Anhang einzusehen.

Hierzu hat sich herausgestellt, dass zwar ein Abnahmetrend in den vier Peaks zu erkennen ist; dies konnte man aber anhand der Standardabweichungsgröße in den Peaks-2,3,4 sowie bei der integrierten Gesamtfläche nicht als signifikant bewerten. Dagegen ähnelt Peak-1 bei 3 kGy dem Verlauf, wie er bei den flüssigen frischen Proben beobachtet wurde. Zunächst zeigte er eine Zunahme von etwa 34%, sank dann aber in den nächsten Dosen wieder fast auf den Ausgangswert ab. Eine signifikante Abnahme lässt sich lediglich bei Peak-4 und 5 von 30 bzw. 84% jeweils notieren (Abb.3.28).

#### **3.2.5.1.4 Auftrennung von flüssigem pasteurisiertem Eiklar**

Bei der Auftrennung des flüssigen pasteurisierten Eiklars (Abbildung. 3.29) wird, ähnlich wie bei der vorstehenden Untersuchung, in gelagertem Eiklar eine leicht verbesserte Auflösung der Peaks bei der Bestrahlung beobachtet.

Unterschiede zwischen den Proben in den unterschiedlichen Strahlendosen sind sehr geringfügig. Eine generelle Abnahme der Peaks war zu erkennen, die jedoch keinen signifikanten Unterschied im Hinblick auf die Standardabweichung darstellte.

Die Auswertung ist in Abb.3.29-1,2, dazu gehörige Tabelle im Anhang Tab. 6.3, zu finden.

#### **3.2.5.1.5 Auftrennung von Eiklar-Pulver**

Die Auftrennung für die unbestrahlte, aus Pulver vorbereitete Probe sieht anders aus als die unbestrahlte Probe aus flüssigen Eiweißproben (Abb.3.30).

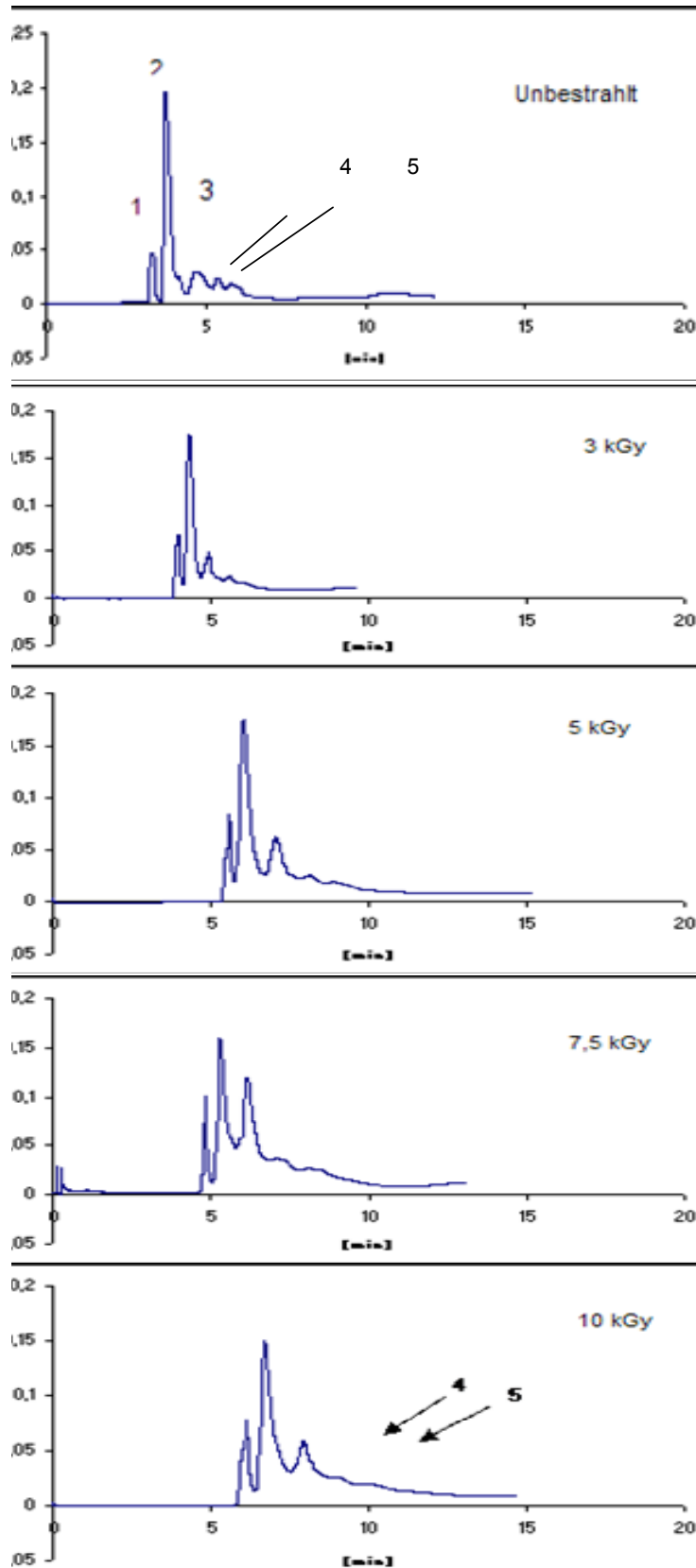
Die aus Pulver vorbereiteten Proben unterscheiden sich voneinander mit Zunahme der Strahlendosis, aber unter angegebenen Laufbedingungen wurde keine gute Auftrennung der Peaks erzielt. Auswertung ist der Abb.3.30-1,2, im Anhang Tab. 6.4 zu entnehmen. Kommentar dazu:

Das Trocknungsverfahren nahm Einfluss auf das Verhältnis Masse/Ladung der Eiklarproteine, so dass die Auftrennung durch CZE nicht vollständig erzielt werden konnte.

**Fazit:**

Eine Kapillarzonenlektrophorese (CZE) in den unterschiedlichen flüssigen Proben (frisch, gelagert, pasteurisiert) konnte zunächst bei frischem und gelagertem Eiklar eine signifikante strahleninduzierte Änderung erfassen.

Bei Pulver und pasteurisierten Proben konnten hingegen keine bedeutenden Unterschiede von den Kontrollproben erfasst werden.

**Abb. 3.28-1: CZE**

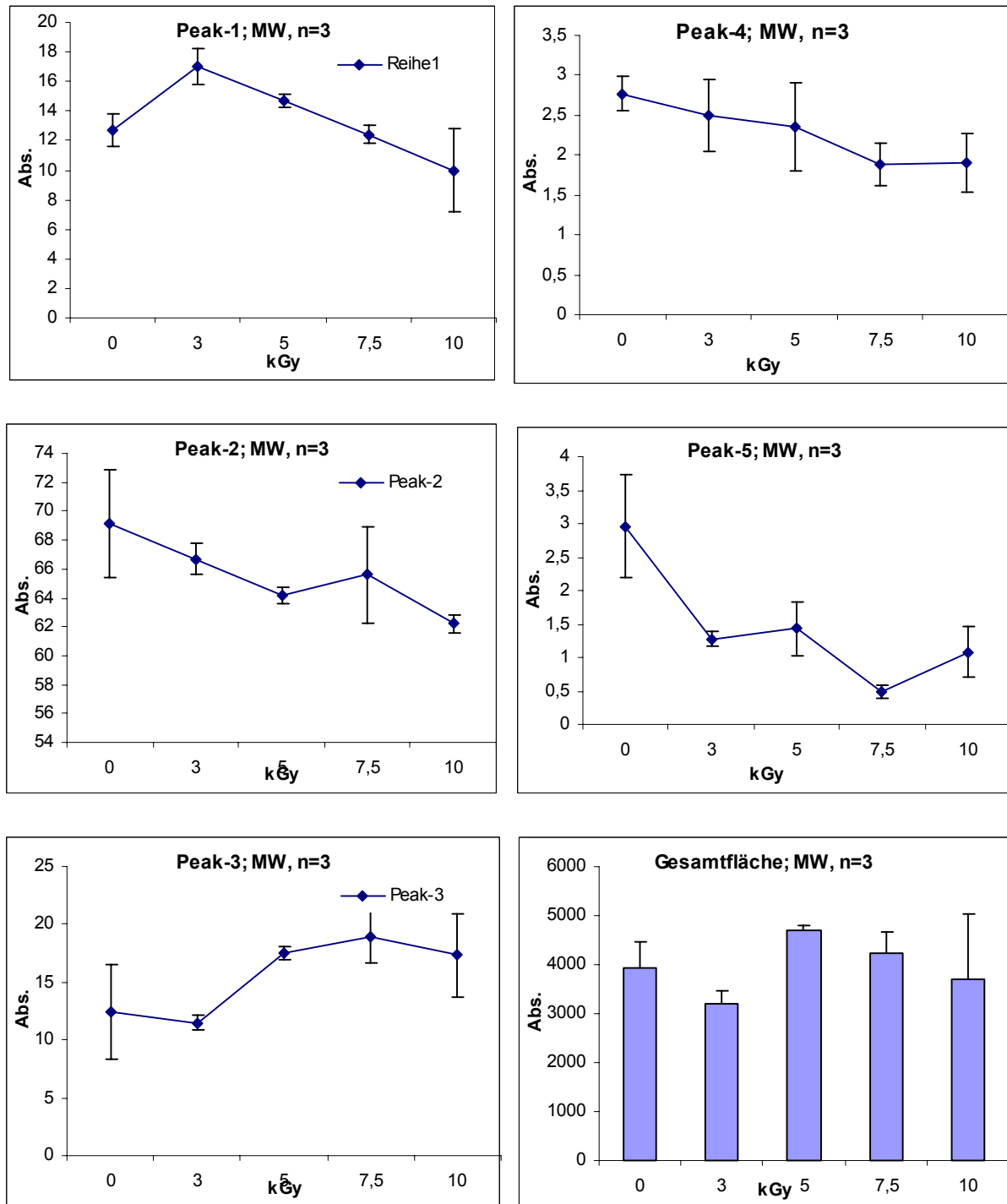
Auftrennung von flüssigem  
gelagertem Eiklar, das mit  
verschiedenen  
Strahlendosen behandelt  
wurde.

Phosphatpuffer pH 2,5; Injct. 10.00 kV, 20  
sec; Run: 10.00 kV; uncoated Cap. 24 cm x  
50 ID

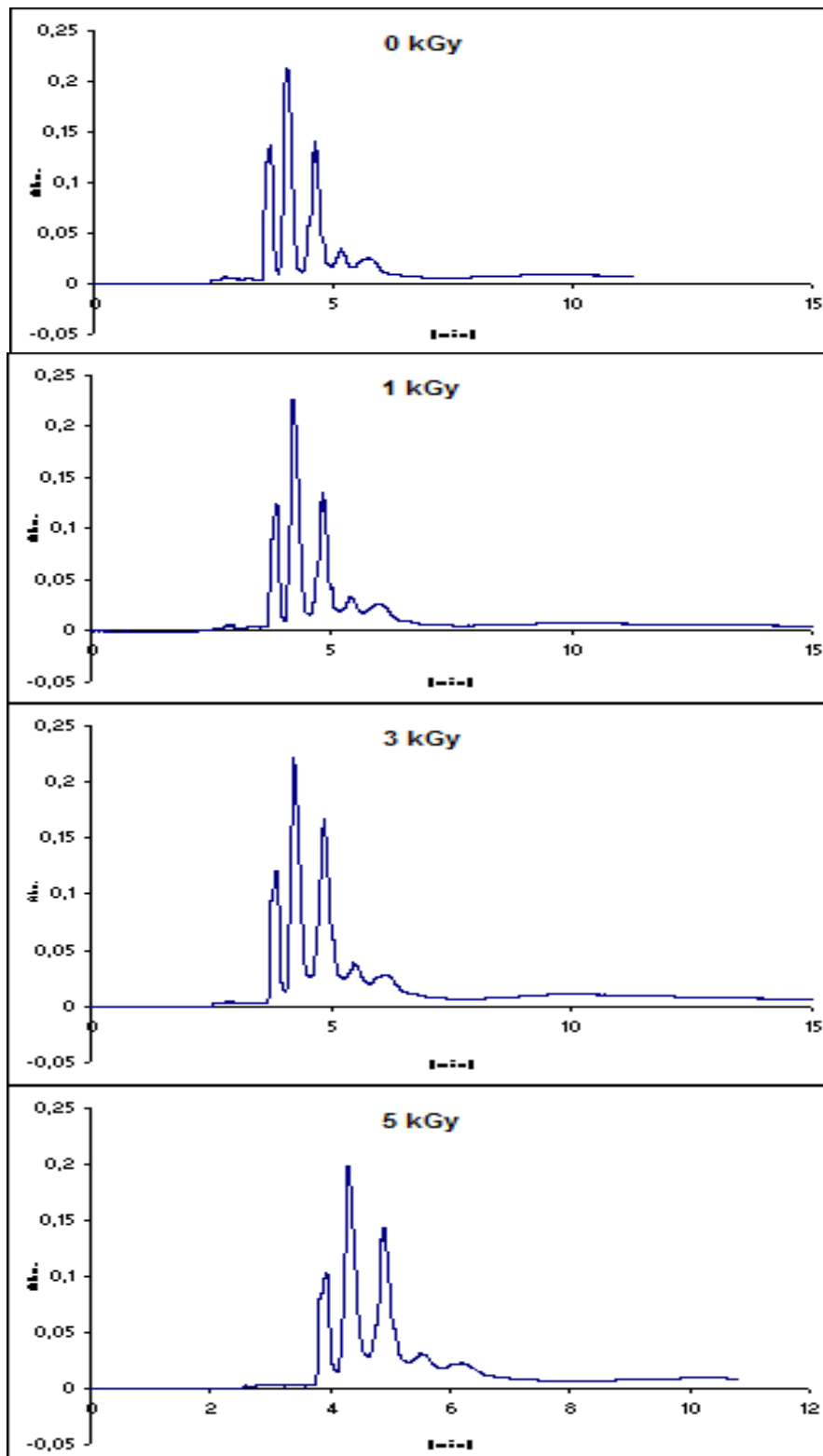
Polarity: + to - ; Integ 200 nm step. 5 nm  
Carrousel setpoint Temp(C°): 15; Cap.  
Temp. (C°): 20

Prep Cycle 1 pre-Inject; Inlet,  
SRG; outlet, Waste; 60 sec HI Pressure  
Prep Cycle 2 pre-Inject; Inlet,  
SRG; outlet, Waste; 00 sec HI Pressure)





**Abb. 3.28-2:** Änderung der Peakflächen von flüssigem gelagertem Eiklar nach der Behandlung mit verschiedenen Strahlendosen (CZE-Auftrennung)



**Abb. 3.29-1:**CZE-Auftrennung von flüssigem pasteurisiertem Eiklar, das

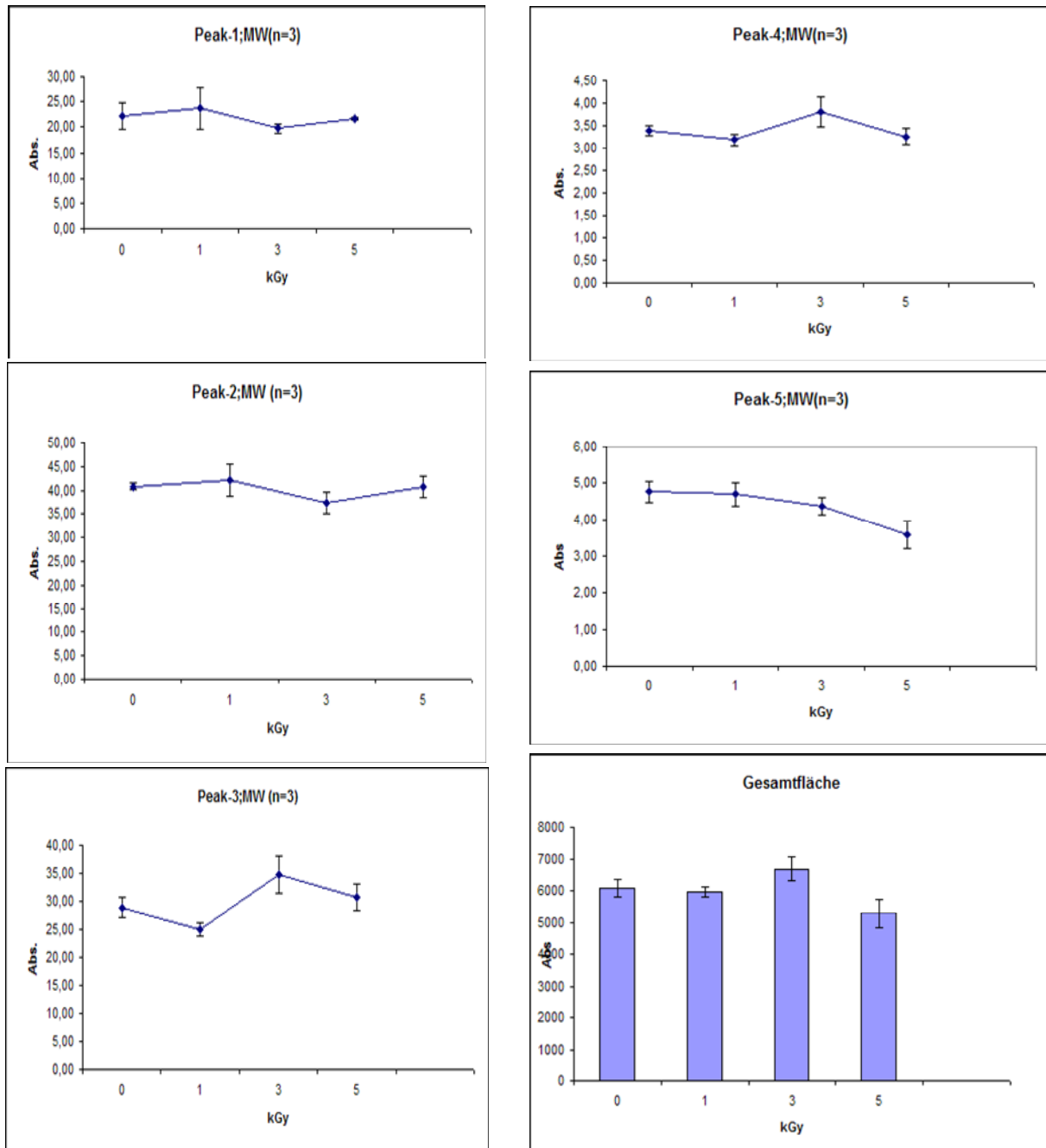
mit verschiedenen Strahlendosen behandelt wurde.

(Injct.10.00 kv,20 sec ;Run:10.00 kv;uncoated Cap.24cm x 50 ID; Cap.Temp.(C°):20

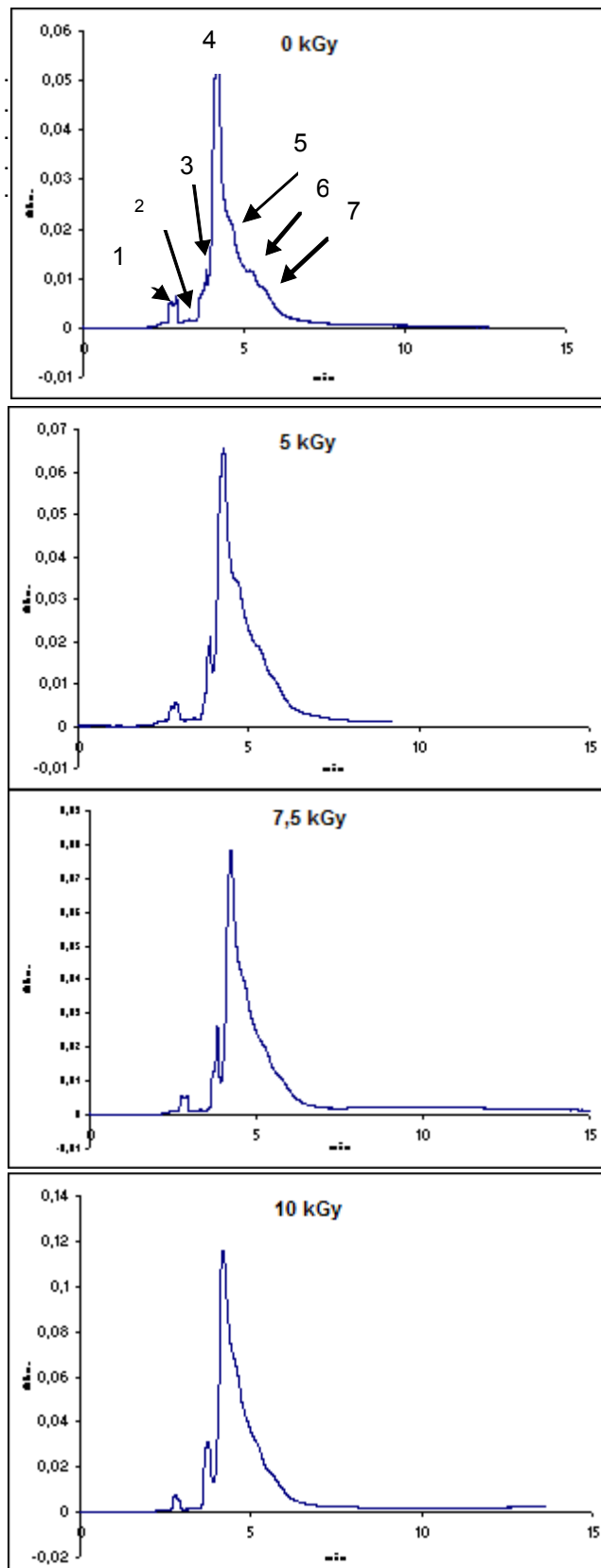
Polarity: + to -; Integ 200 nm step,5nm

Carrousel setpoint Temp(C°):15; Phosphatpuffer pH 2,5.

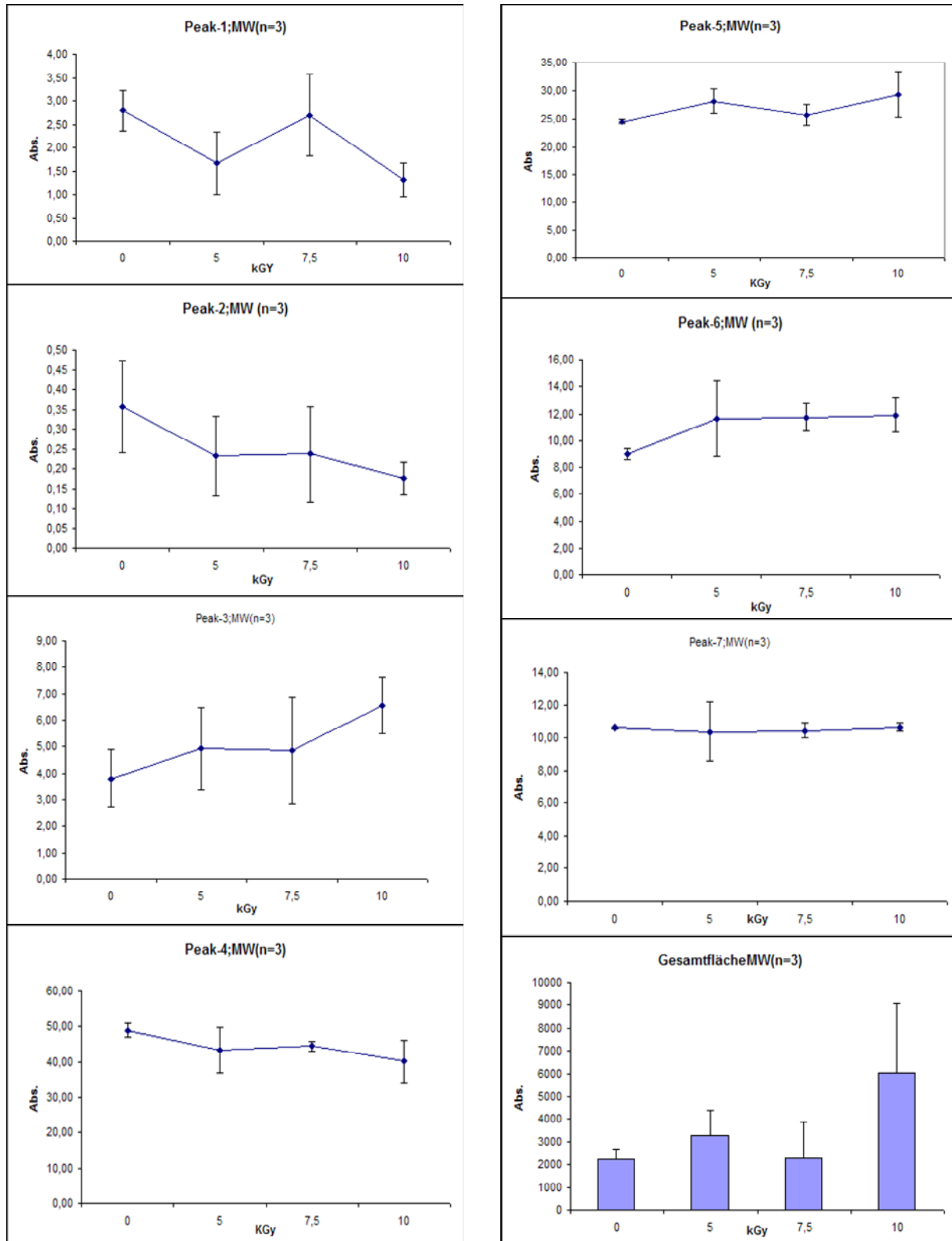
**Abb. 3.29-2:** Änderung der Peakfläche von flüssigem pasteurisiertem Eiklar mit verschiedenen Strahlendosen nach der CZE-Auftrennung



**Abb. 3.30-1:** CZE Auftrennung vom Eiklar-Pulver, das mit versch. Strahlendosen behandelt wurde. (Phosphatpuffer pH2,5; Injct.10.00 kv, 20 sec ; Run:10.00 kv;uncoated Cap.24cm x 50 ID;Cap.Temp.(C°):20 Polarity:+ to - ; Integ 200 nm step, 5nm... Carrousel setpoint Temp(C°):15)...



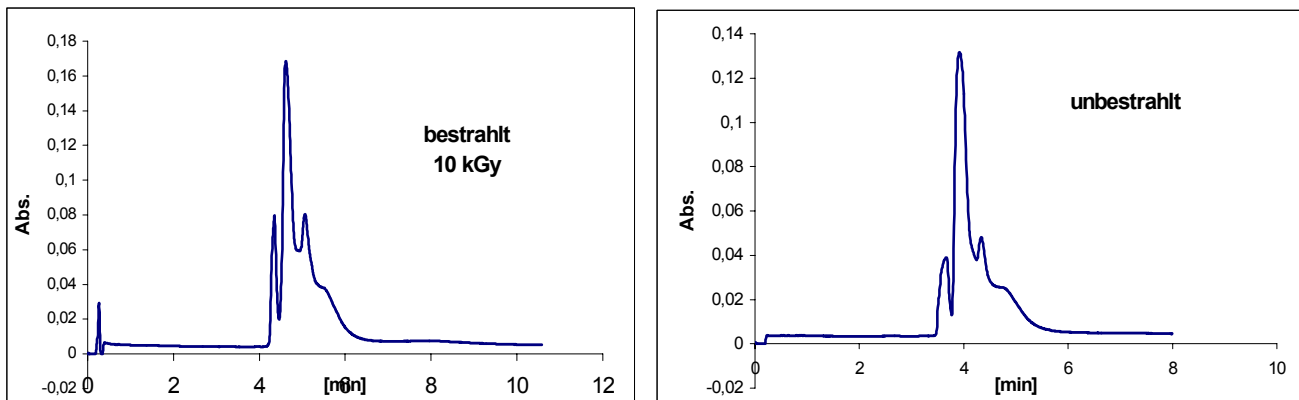
**Abb. 3.30-2:** Änderung der Migrationszeit der Peaks von Pulver-Eiklar, das mit verschiedenen Strahlendosen behandelt wurde (nach CZE-Auftrennung)



### 3.2.5.1.6 Auftrennung von kristallinem Eiklar (Kristall-Eiweiß)

Die Auftrennung in Abb.3.31 zeigt keinen relevanten Unterschied zwischen der bestrahlten und der unbestrahlten Probe trotz der relativ hohen Strahlendosis (10 kGy).

**Abb. 3.31** CZE-Auftrennung von Kristall-Eiweiß ( Phosphat Puffer pH2,5; Inject. 10kv, 20sec; Run: 10kv; unbesch. Kap. 24cmx50ID; Temp. (C°) 20 Polarität: + to -; Integ 200 nm )



Die kristalline Form der untersuchten Proben könnte hier die Wirkung der Strahlendosis und deren Auswirkung auf die Proteine verringern. (Dieser Schutzeffekt der Kristallstruktur des Eiweißes wird mit anderen CE-Auftrennungsverfahren untersucht und soll weiter erforscht werden, da die Kristallstruktur bzw. ihre Änderung nach Bestrahlung durch Thermolumineszenz-Technik in der Literatur am meisten Beachtung findet.).

Anmerkung: Unterschiedliche Probenvorbereitungen wurden für die Probe von kristallinem Eiklar eingesetzt:

Auflösung der Kristalle in dest. Wasser durch leichtes Rühren

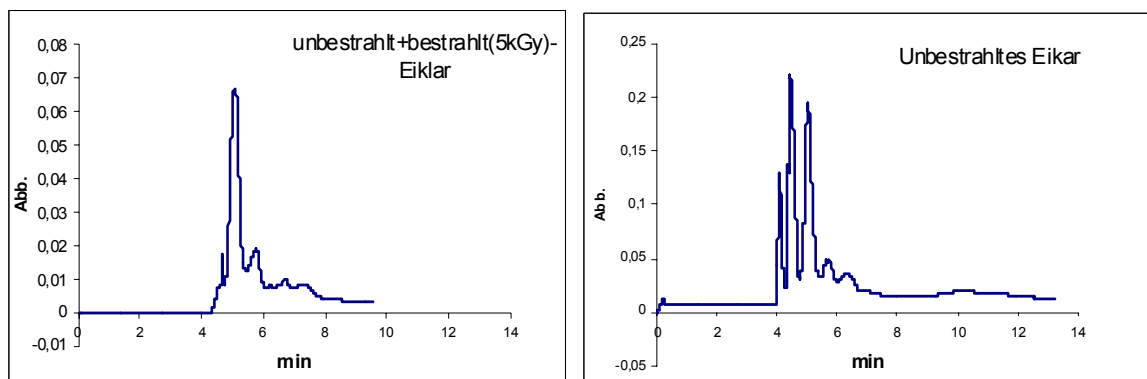
Mahlen der Kristalle mit Hilfe einer Mühle (AGI-X4, 100-200-MESH, Bio-Rad-München), danach im dest. Wasser aufgelöst sowie mit der CE analysiert.

**Fazit** Die beiden Probenvorbereitungen sowie Auftrennungsprofile zeigten keinen Unterschied bei der CZE Auftrennung.

### 3.2.5.1.7 Auftrennung einer Mischung aus bestrahltem und unbestrahltem flüssigem frischem Eiklar

Inwiefern die Auftrennung einer unbestrahlten Probe verändert wird, wenn bestrahltes Eiklar z.B. mit 5 k Gy 1:1 (v/v) auf Grund einer Protein-Protein-

**Abb. 3.32** CZE-Auftrennung von flüssigem Eiklar (Phosphatpuffer pH 2,5; Inject. 10 kv, 20 sec Run: 10kv, unbeschichtet Kap. 24 cmx50µmID; Temp.(c°)20; Polarität: +to-; Integ 200 nm Carousel setpoint Temp(c°): 15).

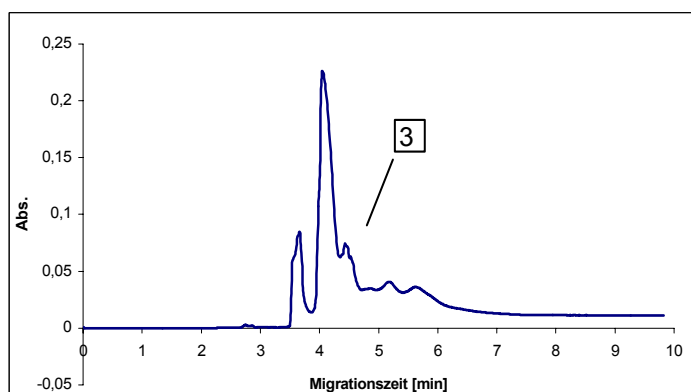


Wechselwirkung hinzu gegeben wird, ist in Abb.3.32 dargestellt.

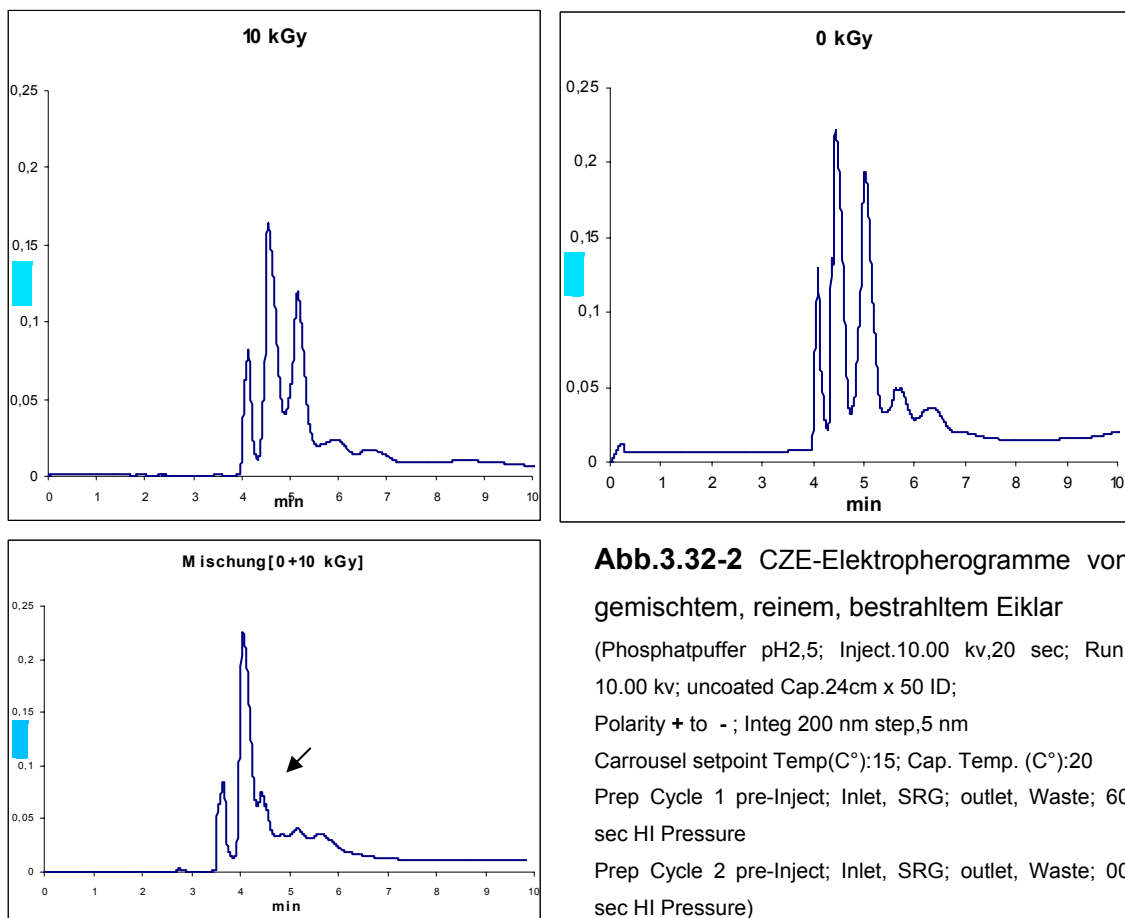
Die Mischung zeigte eine deutlich verringerte Absorption.

Bei einem weiteren Versuch wurde unter denselben Verhältnissen von flüssigem frischem Eiklar, wie sie oben angegeben sind, eine mit 10 k Gy bestrahlte Probe mit einer unbestrahlten zusammengemischt und CZE aufgetrennt (Abb.3.32-1).

**Abb.3.32-1** CZE-Auftrennung von flüssigem frischem Eiklar ( Phosphatpuffer pH 2,5; Inject. 10kv,20sec Run: 10kv; unbeschichtet Kap.24cmx50ID; Temp.(c°)20; Polarität: + to -; Integ200 nm Carousel setpoint Temp(C°): 15).



Bei Dreifachwiederholungen dieser Auftrennung hat man keine starke Abnahme der Gesamtabsorption beobachtet, sondern eine deutliche Abnahme (70%) beim Peak-3. Mit Hilfe dieses Versuchs könnte man eine Aussage über eine unbekannte Probe flüssigen frischen Eiklars treffen, ob sie bestrahlt worden ist oder nicht, indem man die Stichprobe zunächst aufteilt, selber einen Teil davon bestrahlt (mit 10 kGy in unserem Beispiel) und nachher die Elektropherogramme von den drei Proben (mit 10 bestrahlt, nicht bestrahlt, gemischt) miteinander vergleicht (Abb.3.32-2).



**Abb.3.32-2** CZE-Elektropherogramme von gemischtem, reinem, bestrahltem Eiklar (Phosphatpuffer pH2,5; Inject.10.00 kv,20 sec; Run: 10.00 kv; uncoated Cap.24cm x 50 ID; Polarity + to -; Integ 200 nm step,5 nm Carrousel setpoint Temp(C°):15; Cap. Temp. (C°):20 Prep Cycle 1 pre-Inject; Inlet, SRG; outlet, Waste; 60 sec HI Pressure Prep Cycle 2 pre-Inject; Inlet, SRG; outlet, Waste; 00 sec HI Pressure)



Sollte die Stichprobe unbehandelt sein, so sähe ihr Elektropherogramm aus wie bei der Nullprobe (0 kGy), was sich relativ nicht von pasteurisiertem Eiklar (0 kGy) unterscheidet. Handelt es sich jedoch um eine behandelte Probe, so müsste es wie bei bestrahlten Proben eine Abnahme der Absorption in den letzten zwei Peaks (4,5) des Elektropherogramms geben, was nicht der Fall ist beim pasteurisierten Eiklar. Sonst wird eine Mischung aus der Stichprobe mit unbestrahltem frischem Eiklar wie beim frischen aussehen (frisch+frisch ----> frisch); und eine Mischung mit sicher bestrahltem Eiklar wird sich wie in Abb. 3.32-2a darstellen, also an den im Diagramm markierten Stellen einen Unterschied zeigen.

Weitere Mischungen von pasteurisiertem und mit höheren Dosen bestrahltem Eiklar sowie pasteurisiertes Eiklar sind zu untersuchen.

#### **3.2.5.1.8 LIF-Detektion (Laser Induced Fluorescence) der Auftrennung von flüssigen frischen Eiklarproteinen mit ihrer Peak-Identifizierung**

Die bisher durch CZE erfasste UV-Absorptionsänderung bei den detektierten Eiklarproteinen-Peaks hat dazu Anlass gegeben, eine empfindlichere Detektion bzw. mögliche Fluorogene nachzuweisen.

Dabei und mit denselben Verfahren wie in Absatz 3.2.2.1.1 wurden die Proben, die mit verschiedenen Strahlendosen behandelt worden waren, analysiert und die Peaks mit Hilfe des extern angeschlossenen LIF-Detektors erfasst.

Ein Laser-Strahl bei 488 nm wurde als Anregungswellenlänge eingesetzt, und die Aufnahme der Fluoreszenz erfolgte bei 522 nm.

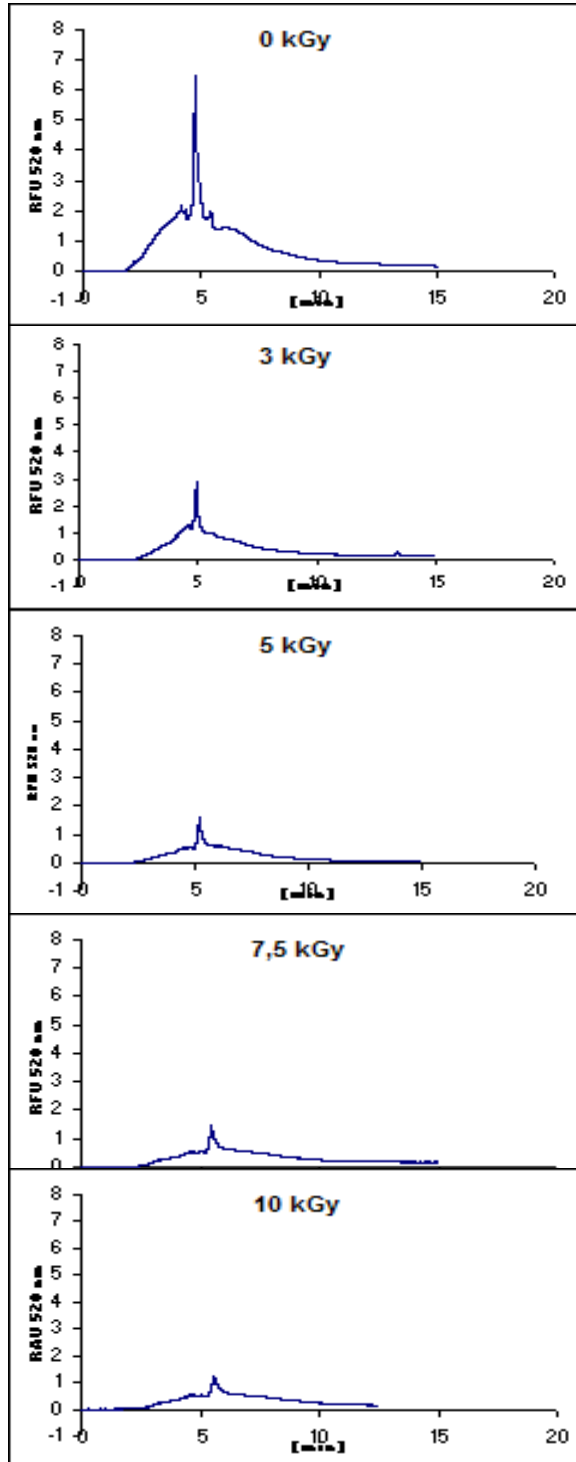
Wie erwartet, wurde eine sehr deutliche Abnahme der detektierten Peaks nachgewiesen, wie in Abb. 3.35 dargestellt.

Eine grafische Auswertung mit entsprechender Tabelle ist in Abb. 3.35-1, Tab. 5-8 dargestellt, in der deutlich wird, dass die Fluoreszenz bei zunehmenden Strahlendosen um bis zu 70 % zurückgegangen ist.

Die Durchführung von Versuchen mit anderen Varianten des Eiklars (flüssiges pasteurisiertes; pasteurisiertes bestrahltes) haben als Vergleichsversuch ebenso eine große Bedeutung und sollten weiter erforscht werden.

Um zu klären, welche Proteine diese relativ starke Abnahme an Fluoreszenz bei zunehmenden Strahlendosen gezeigt haben, wurden einzelne Proteine, 1 mg/ml von den Eiklarproteinen (Lysozym, Conalbumin, Ovalbumin, Ovomuroid ) jeweils unter gleichen Laufbedingungen analysiert und in Abb. 3.35-2 gezeigt.

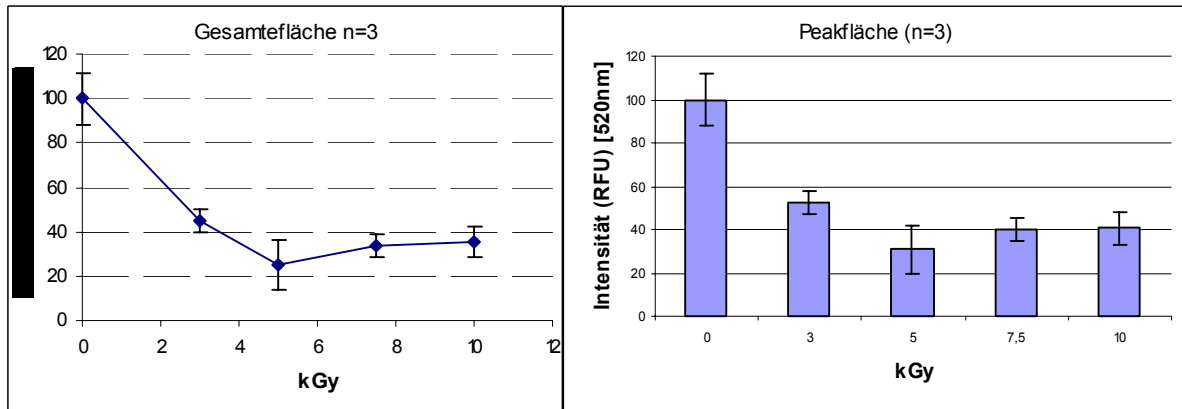
In Abbildung 3.35-2 ist zu erkennen, dass es sich um Conalbumin handelt.



**Abb. 3.35:** CZE-Auftrennung von flüssigem frischem Eiklar, mit verschiedenen Strahlendosen behandelt und mit Hilfe von LIF-Detektor detektiert.

(Phosphatpuffer pH 2,5; Inject.10.00 kv,20 sec ; Run: 10.00 kv;uncoated Cap.24cm x 50 ID; Polarity:+ to - ; Integ 520 nm step,5nm... Carrousel setpoint Temp(C°):15; Cap. Temp (C°):20... Prep Cycle 1 pre-Inject; Inlet, SRG; outlet, Waste; 60 sec HI Pressure. Prep Cycle 2 pre-Inject; Inlet, SRG; outlet, Waste; 00 sec HI Pressure).LIF-Detctor: laser induced fluorescence-detectors.

**Abb. 3.35-1:** Änderung der Peakfläche von flüssigem frischem Eiklar mit verschiedenen Strahlendosen nach der CZE Auftrennung, LIF-DETEKTION.



Wie die Abbildung zeigt, konnte man eine Abnahme der Fluoreszenz von 70% in den mit 5 kGy bestrahlten Proben verzeichnen. Diese war zu notieren sowohl in der Auswertung nach der gesamten Fläche der Elektropherogramme als auch nach der Integration des Peaks, welcher mit großer Wahrscheinlichkeit als Conalbumin zu vermuten ist. Jedoch war nicht nur Conalbumin an der erfassten Fluoreszenz beteiligt, sondern auch die anderen möglichen Komponenten können beteiligt sein. Die anderen Strahlendosen haben ebenso wie bei 3 und 7,5 sowie 10 kGy einen Einfluss auf die Fluoreszenzreduktion von 65% sowie 68 % jeweils. Die Elektropherogramme für die Identifizierung des fluoreszierenden Peaks sind in der folgenden Abbildung 3.35-2 dargestellt.

**Abb. 3.35-2:** CZE-Identifizierung des flüssigen frischen Eiklars mit Hilfe eines LIF\*-**Detectors**

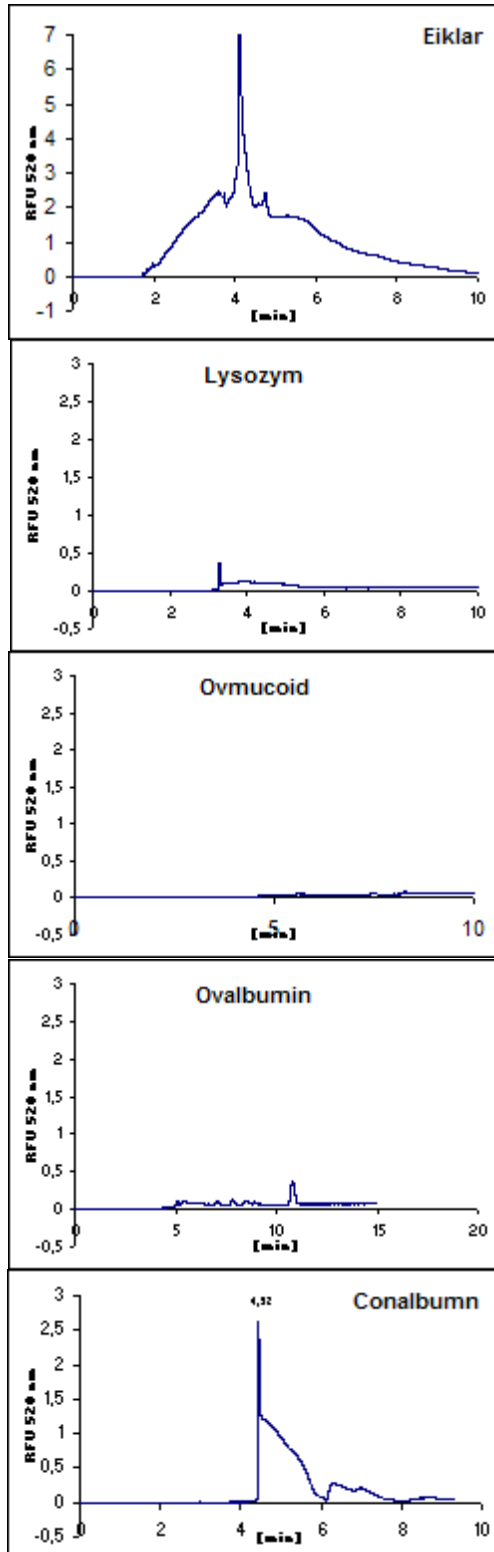
(Phosphatpuffer pH2,5; Injct.10.00 kv,20 sec ; Run:10.00 kv;uncoated Cap.24cm x 50 ID;.

Polarity:+ to - ; Laser 488nm; PMT 520 nm ....

Carousel setpoint Temp(C°):15; Cap.Temp.(C°):20....

Prep Cycle 1 pre-Inject; Inlet, SRG; outlet, Waste; 60 sec HI Pressure

Prep Cycle 2 pre-Inject; Inlet, SRG; outlet, Waste; 00 sec HI Pressure).



### **3.2.5.2 Auftrennung durch CGE**

Um mit CE eine mögliche Defragmentierung oder weitere Änderungen der Proteine im bestrahlten Eiklar nachzuweisen, werden Gele in die Kapillare eingesetzt. In diesem Versuch wurde LPA (Bio-Rad) als austauschbares Gel beim pH 8,5 angewandt. Die Trennungsspannung wurde auf 15 kV eingestellt.

Zur Unterscheidung bestrahlter und unbestrahlter Proben durch CGE-Trennung wurden zwei Methoden angewandt, und zwar einmal ohne Behandlung der Proben mit SDS und einmal mit SDS-Behandlung .

Ohne SDS findet eine Auftrennung der nativen Proteine nach Ladung und Masse statt, während durch die SDS-Behandlung die Proteine denaturiert und mit SDS beladen werden, damit praktisch die gleiche Ladung aufweisen und somit die Trennung nur nach der Masse erfolgt.

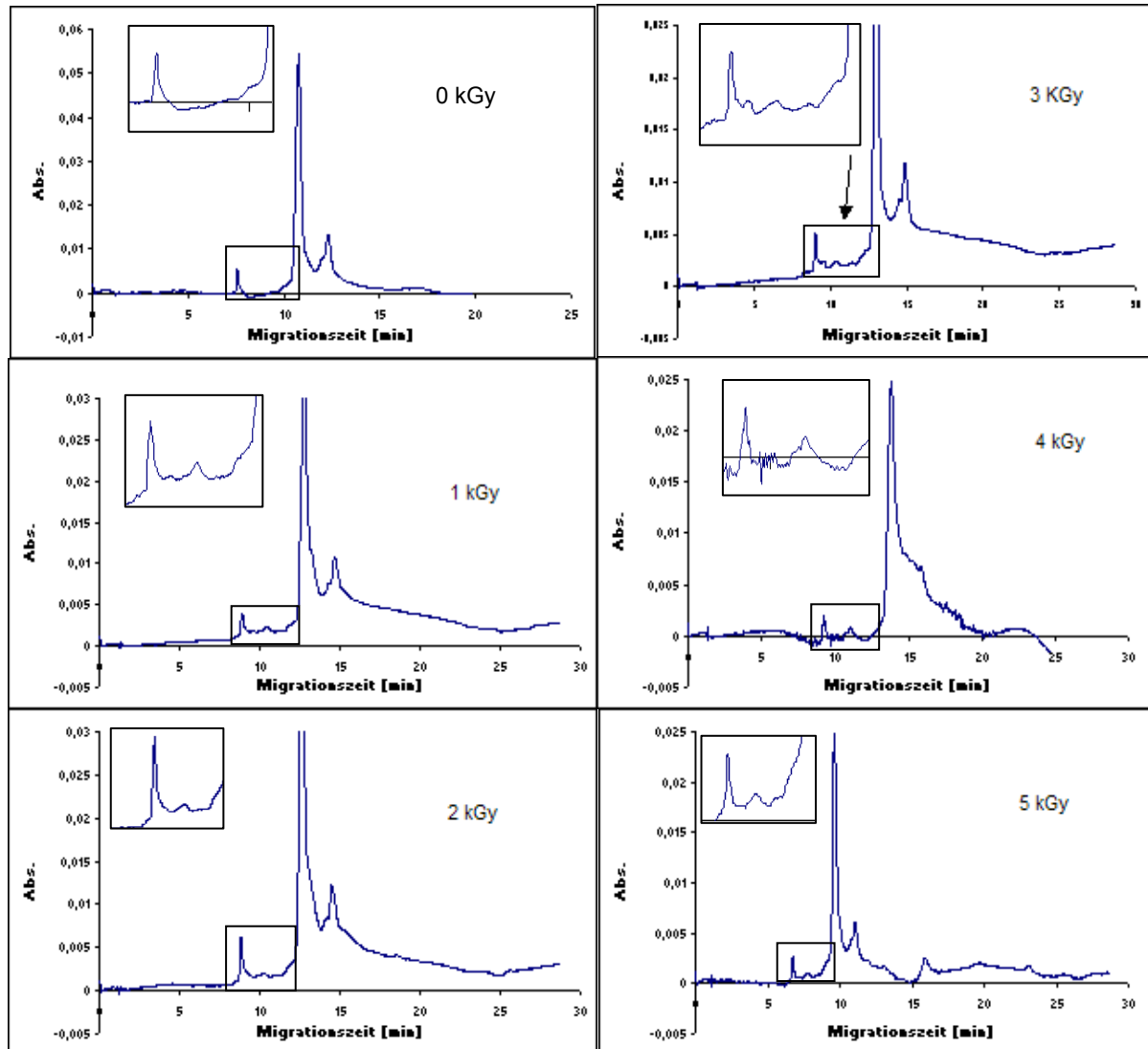
#### **3.2.5.2.1 SDS-CGE**

Durch die Auftrennung von flüssigem frischem Eiklar, das mit SDS vorbehandelt wurde, traten verschiedene Peaks je nach Molekülgröße auf (Abb. 3.36). Wenn Eiklar mit Strahlendosen von 1-5 kGy behandelt und dann mit SDS-CGE analysiert wurde, ist ein zusätzlicher kleiner Peak beobachtet worden. Dieser Peak trat bei allen bestrahlten Proben auf, nahm jedoch kaum mit steigender Strahlendosis zu.

Der neue Peak hat ein größeres Molekulargewicht als das Lysozym, da er eine längere Migrationszeit hat und ein Molgewicht im Bereich von 15 bis 23 kDalt haben soll; denn die Auftrennung erfolgt nach Masse.

Die Auswertung ist in 3.36-1 nachzulesen.

**Abb. 3.36:** CGE-SDS Auftrennung in LPA pH 8,5 / flüssiges frisches Eiklar  
(elect.inj.10 kV, 5 sec Run: 15.00 kV, Polarity: -to +, Integ 220 nm).



### 3.2.5.2.2 CGE (Nativ)

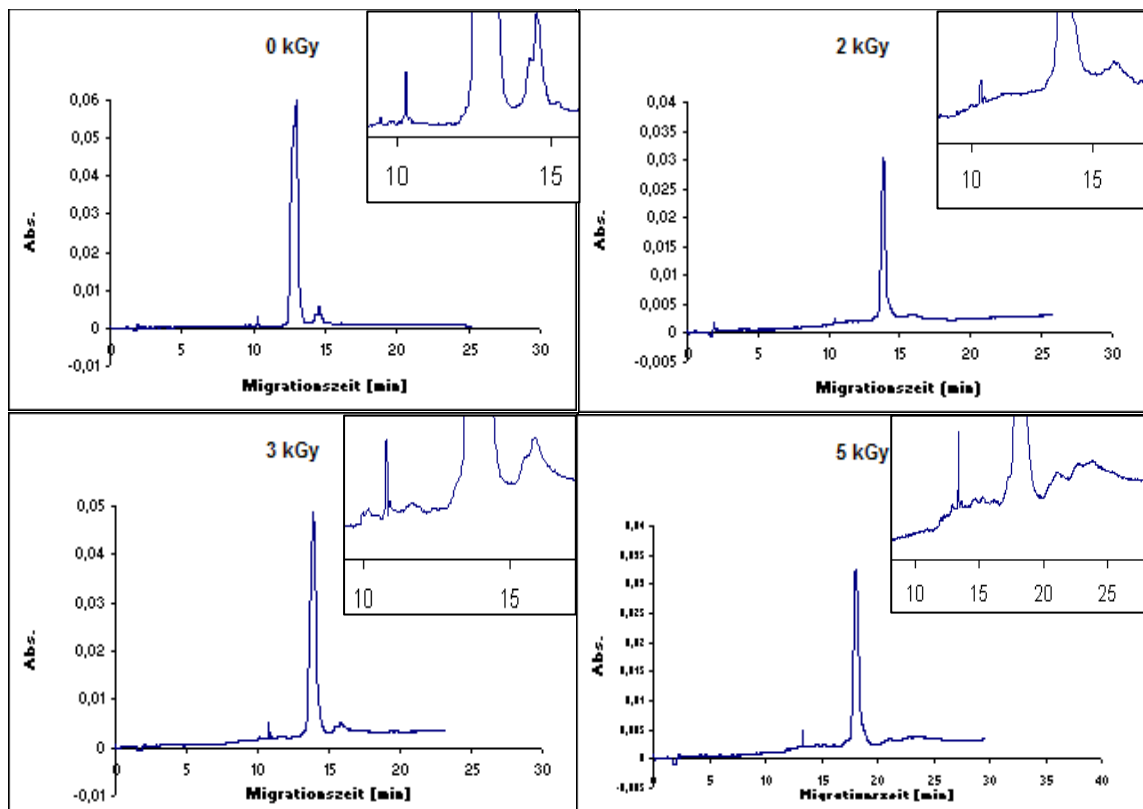
Wie die Auftrennung von flüssigem frischem Eiklar ohne irgendeine zusätzliche Veränderung der Proteine durch die Analyse hinzugefügt werden kann, war ohne weiteres nachzuvollziehen, wenn man auf die SDS-Vorbehandlung der Proben verzichtete, was hierfür der Fall war.

Der eingesetzte Gel-Puffer enthält jedoch SDS. Nach der Auftrennung ergab sich ein ähnliches Profil wie bei den mit SDS vorbehandelten Proben (Abb. 3.37).

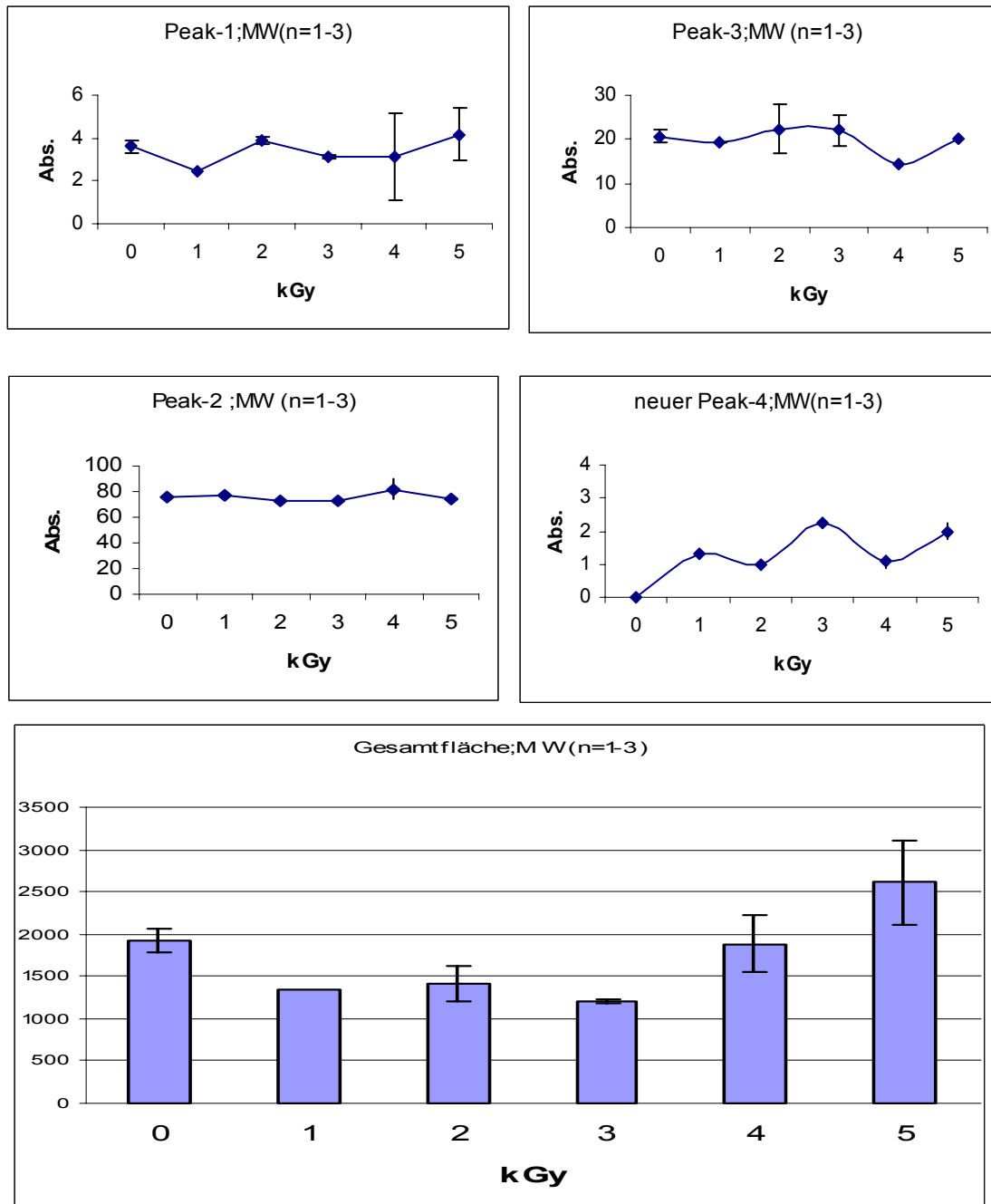
Bei der Vorbehandlung der Proben mit SDS (Abb.3.36) war der zusätzliche Peak sichtbar.

**Abb. 3.37** CGE- Auftrennung in LPA pH 8,5/natives flüssiges frisches Eiklar.

(elect.inject. 10 kV, 5 sec Run:10 kV, Polarity:- to +. Integ 220 nm)







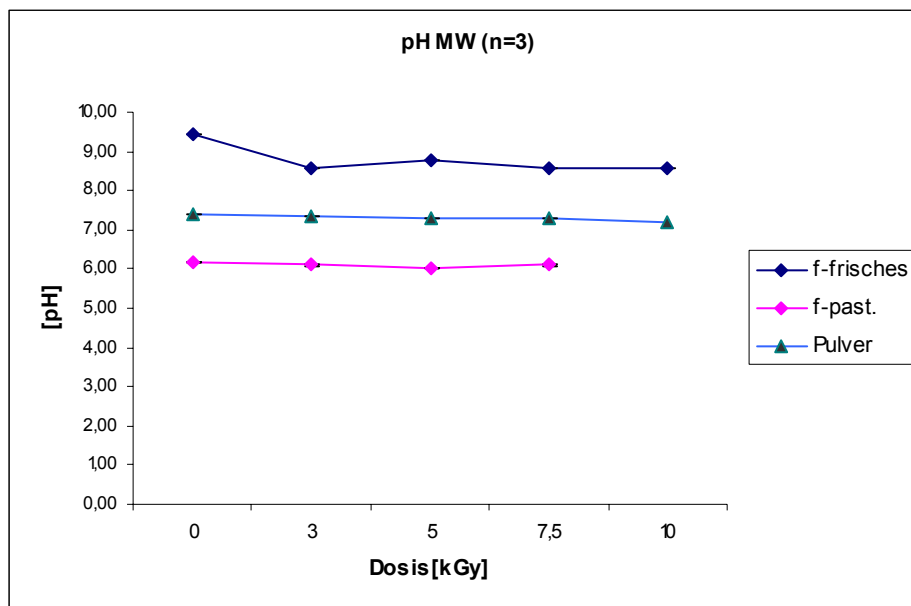
**Abb. 3.36-1:** Änderung der Peaks im Einzelnen sowie von der gesamten Fläche des Elektropherogramms von flüssigem frischem Eiklar nach der Behandlung mit verschiedenen Strahlendosen und SDS-CGE-Auftrennung

Die hier in Abb. 3.36-1 ausgewerteten Peaks beziehen sich auf die SDS-CGE-Auftrennung und bezeichnen die Bezifferung der Peaks in der Kontrollprobe von links nach rechts mit Peak-1 bis Peak-3. Dabei erschließt sich, dass mit einer steigenden Strahlendosis kaum eine relevante Änderung der bereits in der Kontrollprobe vorhandenen Peaks zu messen war. Es ist jedoch ein **neuer Peak-4** entstanden, der zu einer proportionalen Zunahme mit steigender Dosis tendiert (s. Diskussion).

Während bei der Integration der gesamten Fläche zunächst eine Abnahme um etwa 30 % zu beobachten war, verglichen mit dem Ausgangswert, folgt jedoch mit weiteren Dosen eine Zunahme, die ihr Maximum bei 5 kGy von etwa 40% des Ausgangswerts erreicht hat. Dies lässt sich vermutlich auf die Aggregationsbildung zurückführen.

### 3.2.5.3 Änderung des pH-Grads des Eiklar

Da eine Desaminisierung, Decarboxylierung bzw. viele Umsetzungen durch die ionisierende Strahlung im Eiklar entstehen könnten, wurde auf eine mögliche auftretende pH-Änderung des Eiklars hin untersucht. Es wurden hierzu die pH-Werte von den Eiklarvarietäten, frisches, pasteurisiertes und Pulver in Abhängigkeit von zunehmender Strahlendosis gemessen, in Tabelle 3.15 zusammengeführt und in Abb. 3.37 dargestellt. Dabei stellte sich heraus, dass zum Zeitpunkt der Messung, etwa 3-4 Wochen nach der Bestrahlung, keine relevante Änderung in den Proben gemessen werden konnten.



**Abb.3.37** Darstellung der pH-Werte für drei Eiklarvarietäten (frisch, pasteurisiert, Pulver) mit steigender Strahlendosis.

### 3.2.5.4 MIR-ATR Spektroskopie-Untersuchung für bestrahltes Eiklar

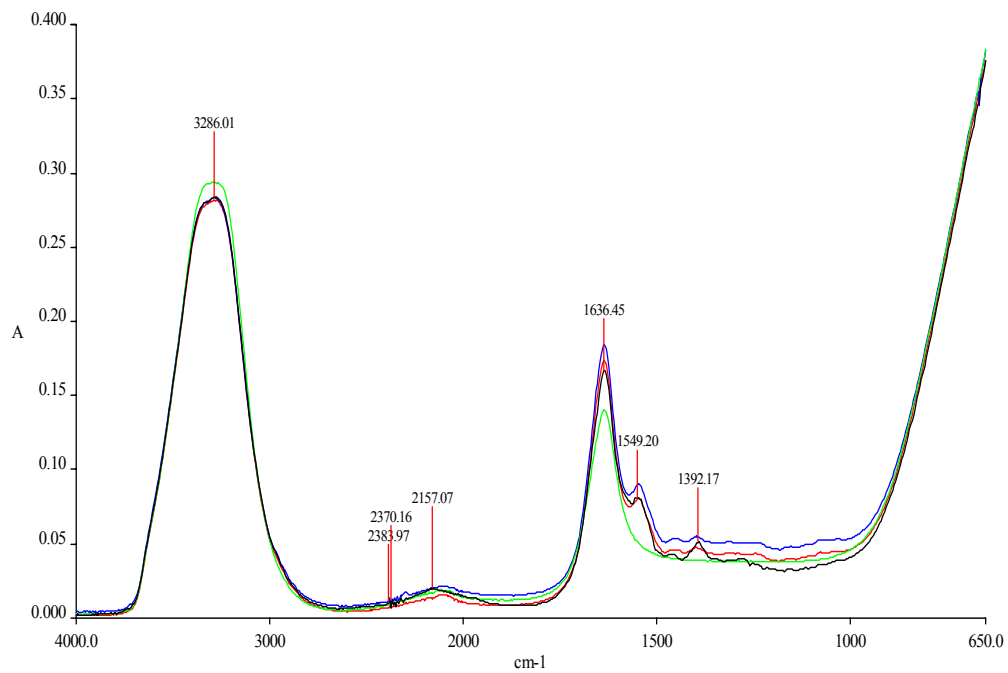
#### 3.2.5.4.1 Beobachtung der Proben nach der Bestrahlung

Die visuelle Beobachtung der bestrahlten Proben weist darauf hin, dass sich die Viskosität des Eiklars nach der Bestrahlung proportional zu der Strahlendosis verringerte.

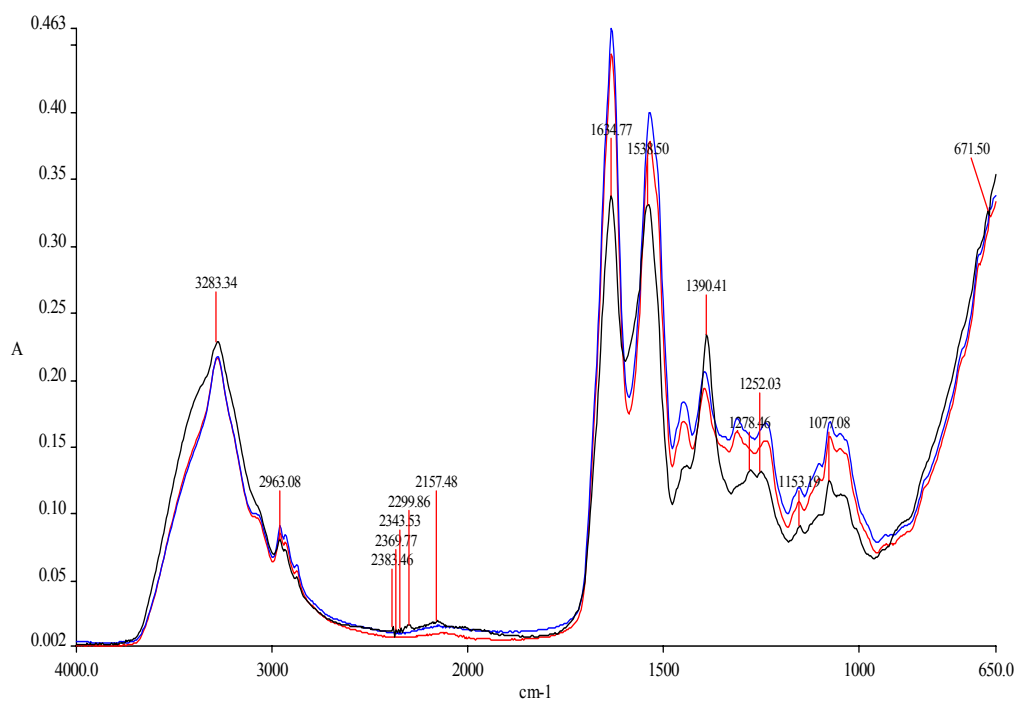
Während über diese Abnahme der Viskosität des Eiklars bereits publiziert wurde (Sato et al., 1969; Ball und Gardner, 1968; Wong and Herald, 1995), war dieses Phänomen bei gefrorenem Eiklar nicht zu beobachten (Ma et al. 1993).

#### 3.2.5.5 Spektrenbewertung

Die **Abb. 3.38** stellt die MIR-Spektren der drei untersuchten (nativen) Eiklar-Proben (d.h. als noch wässrige Dispersion) vor. Dabei wird deutlich, dass sich die pasteurisierte Probe mit einer verstärkten Absorptionsbande um  $1390\text{ cm}^{-1}$  von den beiden anderen Proben unterscheidet. Dieser Unterschied ist auch noch erkennbar, wenn die entsprechenden Trocknungsfilme der drei Proben miteinander verglichen werden (**Abb. 3.39**). Wie dort dargestellt, besitzen die drei Proben die gleiche Absorptionsbande, wobei die Banden-Intensität der pasteurisierten Eiklar-Probe sehr viel höher ausfällt als die der beiden Vergleichsproben.



**Abb. 3.38:** MIR-Spektren von Wasser (grün) und flüssigem Eiklar, pasteurisiert (schwarz), unbehandelt (rot) und bestrahlt (blau)

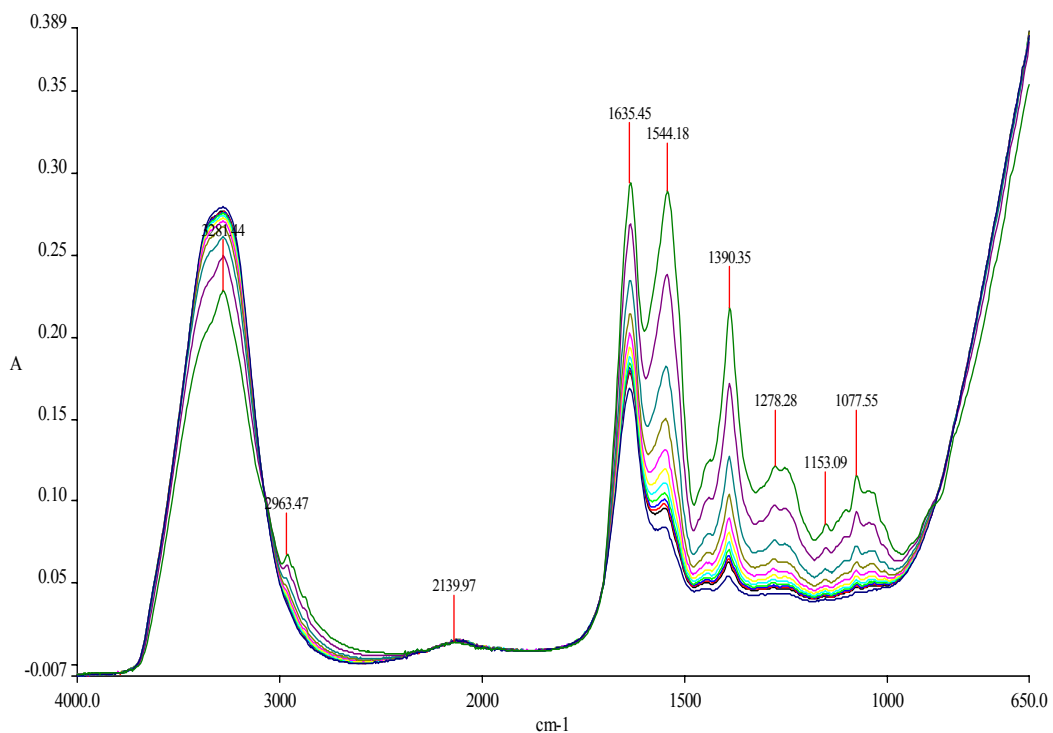


**Abb. 3.39:** MIR-Spektren von Eiklar als Film, jeweils pasteurisiert (schwarz), unbehandelt (rot) und bestrahlt (blau)

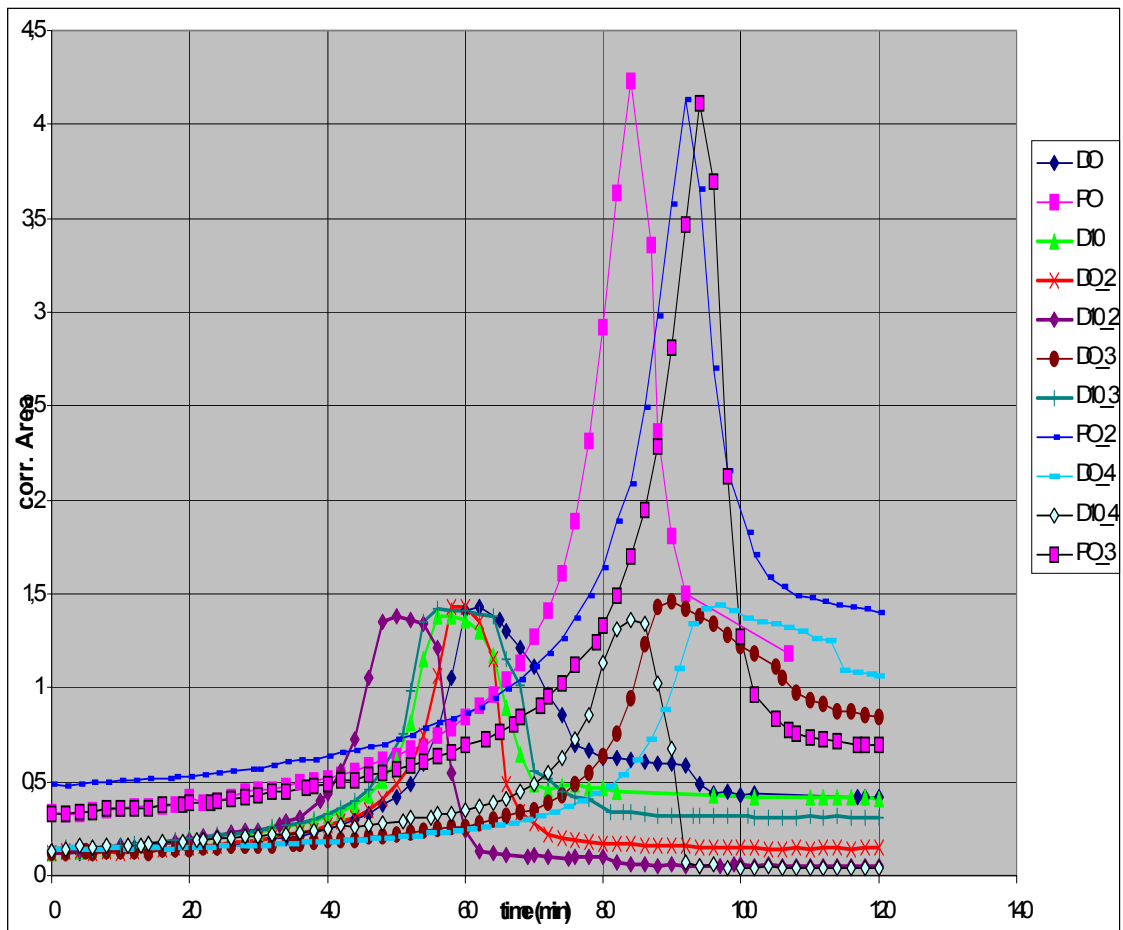
Die Trocknung von Eiklar lässt sich exemplarisch anhand der Spektrenschar in Abb.3.40 verfolgen, wobei die Filmbildung in Abhängigkeit der Bandenintensität um  $1390\text{ cm}^{-1}$  zeitabhängig bis zu einem Maximum zunimmt.

Neben anderen entsprechenden Signalverstärkungen im Spektrum ( $1000\text{--}1700\text{ cm}^{-1}$ ) während dieser Filmbildung wird die hier gewählte Messgröße (Bandenfläche um  $1390\text{ cm}^{-1}$ ) als günstig hinsichtlich ihrer absoluten Wertzunahme angesehen und daher für die weitergehende Beurteilung zugrunde gelegt.

Um den Trocknungsvorgang möglichst umfassend, jedoch verzögert, zu erfassen, wurde die Probe während der Messserie abgedeckt.



**Abb. 3.40:** MIR- Spektren von flüssigem, pasteurisiertem Eiklar während der Trocknung; Einzelspektren nach jeweils 2 min

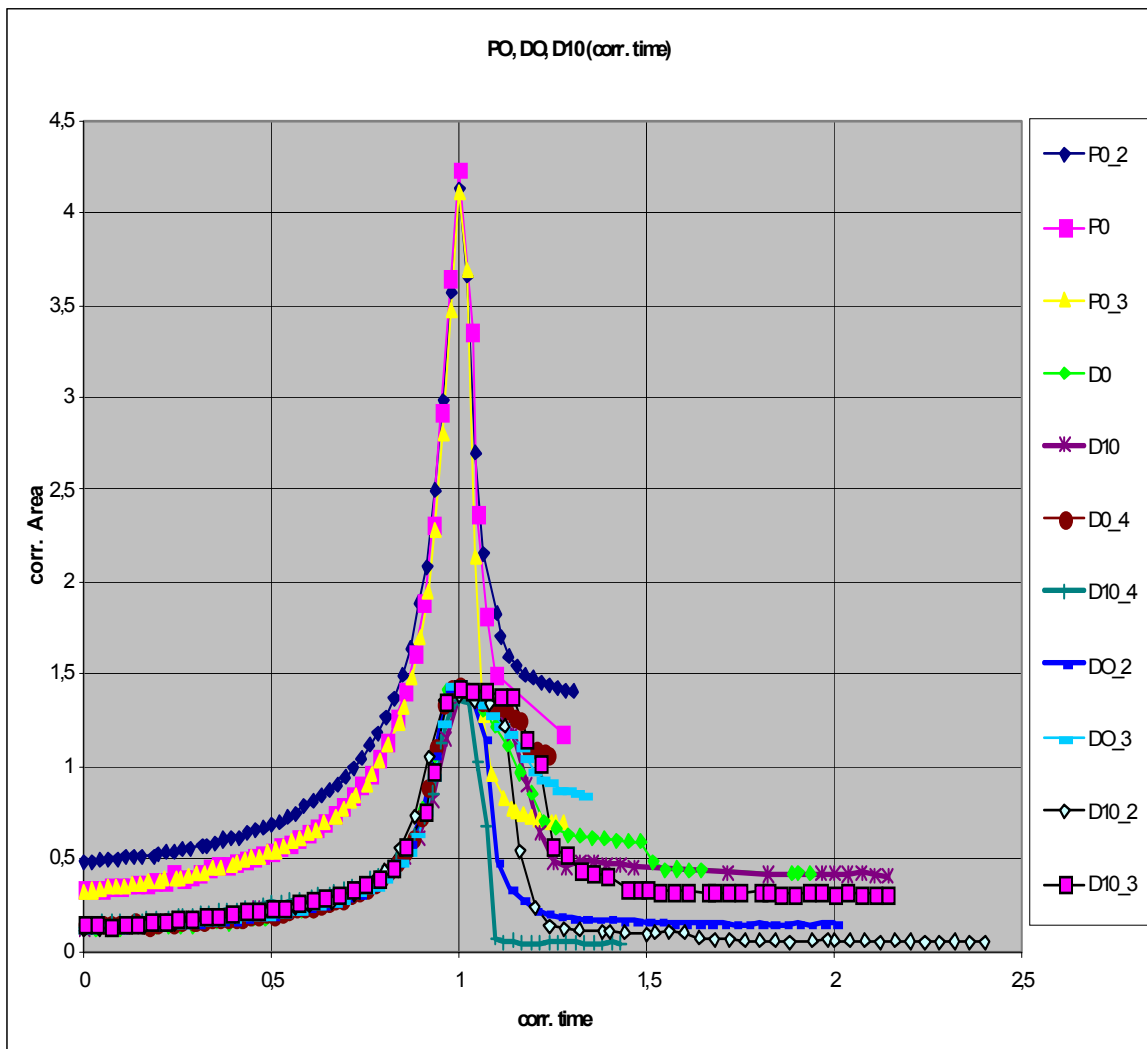


**Abb. 3.41:** Bandenflächenwerte ( $1390\text{ cm}^{-1}$ ) von trocknenden Eiklarproben in Abhängigkeit zur Messzeit; P0\_x (pasteurisierte Proben), D0\_x (unbehandelte Proben), D10\_x (bestrahlte Proben 10 kGy)

Die **Abb. 3.41** vereinigt in Abhängigkeit zur Trocknungszeit die Bandenflächenwerte aller untersuchten Eiklar-Proben und führt zu zwei unterschiedlichen Kurven-Scharen, bei denen sich die bestrahlten und nativen Eiweißproben von den entsprechenden pasteurisierten Proben deutlich unterscheiden lassen.

Dieser wesentliche Unterschied besteht in den erreichbaren Maxima, die bei den pasteurisierten Eiklar-Proben mehr als doppelt so hoch liegen wie bei beiden Vergleichsproben.

Um die Voraussetzungen einer rechnerischen Differenzierung der untersuchten Proben zu verbessern, werden diese Kurven (auf die Zeit ihrer jeweiligen Flächen-Maxima) normiert und mit dieser Normierung in **Abb. 3.42** vorgestellt.



**Abb. 3.42:** *Normierte Kurven* - Bandenflächenwerte (1390  $\text{cm}^{-1}$ ) von trocknenden Eiklarproben in Abhängigkeit zur normierten Messzeit; P0\_x (pasteurisierte Proben), D0\_x (unbehandelte Proben), D10\_x (bestrahlte Proben 10 kGy)

Erkennbar ist, dass in der normierten Darstellung der o.a. skizzierte Unterschied (des pasteurisierten Eiklars gegenüber beiden anderen Proben) bzw. die Übereinstimmung (zwischen nativer und bestrahlter Probe) noch deutlicher wird.

Auffällig ist, dass die Filmbildung bei der unbehandelten sowie bei der bestrahlten Probe früher, dann jedoch langsamer einsetzt. Bei den pasteurisierten Proben geschieht die Filmbildung später, jedoch schneller.

### 3.2.5.6 Hauptkomponentenanalyse (PCA – Principal Component Analysis)

Mit Hilfe der von Pearson und Hotelling entwickelten mathematischen Methode lassen sich u.a. IR-Spektren durch eine Datenanalyse gruppieren. Dabei wird versucht, durch eine Datenreduktion im Rahmen einer mehrdimensionalen Vektormatrix die einzelnen Spektren in einem mathematischen Modell zu beschreiben. Bestandteile dieses Modells sind die Vektoren (component loadings) und die Gewichte (component scores). Verwandte Spektren zeigen sich anhand eines Clusters (Wolke) innerhalb des sogenannten score plots. Je nach Anzahl der Components spricht man von einem 2, 3, 4 oder 5 Komponenten-Modell. Der Grad der Übereinstimmung zwischen Modell und Wirklichkeit ergibt sich aus der Summe der Restfehlervarianzen.

**Tab. 3.16:** Spektrenscharen (Beispiel in Abb. 3.40), die bei der PCA eingesetzt wurden

Spektrenscharen, vom flüssigen bis festen Zustand (Film),	PCA 1	PCA 2	PCA 3	PCA 4 (alle)
<i>pasteurisiert</i>				
P0	P0_1	P0_1		D0_1
P0_2	P0_2	P0_2		D0_2
P0_3	P0_3	P0_3		D0_3
				D0_4
<i>unbehandelt</i>				D10_1
D0_1	D0_1		D0_1	D10_2
D0_2	D0_2		D0_2	D10_3
D0_3	D0_3		D0_3	D10_4
D0_4	D0_4		D0_4	
<i>mit 10 kGy behandelt</i>				P0_1
D10_1		D10_1	D10_1	P0_2
D10_2		D10_2	D10_2	P0_3
D10_3		D10_3	D10_3	
D10_4		D10_4	D10_4	

Zur Anwendung kam in diesem Fall das Programm „The Unscrambler 8.0“. Mit einer Full Cross Validation im Rahmen jeder Analyse wurden die Spektren der folgenden Proben modelliert.



Bei jeder der 4 Analysen gelang es, mit Hilfe eines 2-Komponenten-Modells die Daten ausreichend zu beschreiben. Die Scoreplots der Analysen 1 bis 4 werden in den Abb. 3.43-3.46 gezeigt.

Abb. 3.43 verdeutlicht, dass die unbehandelten und die pasteurisierten Proben sich in zwei Cluster auftrennen lassen.

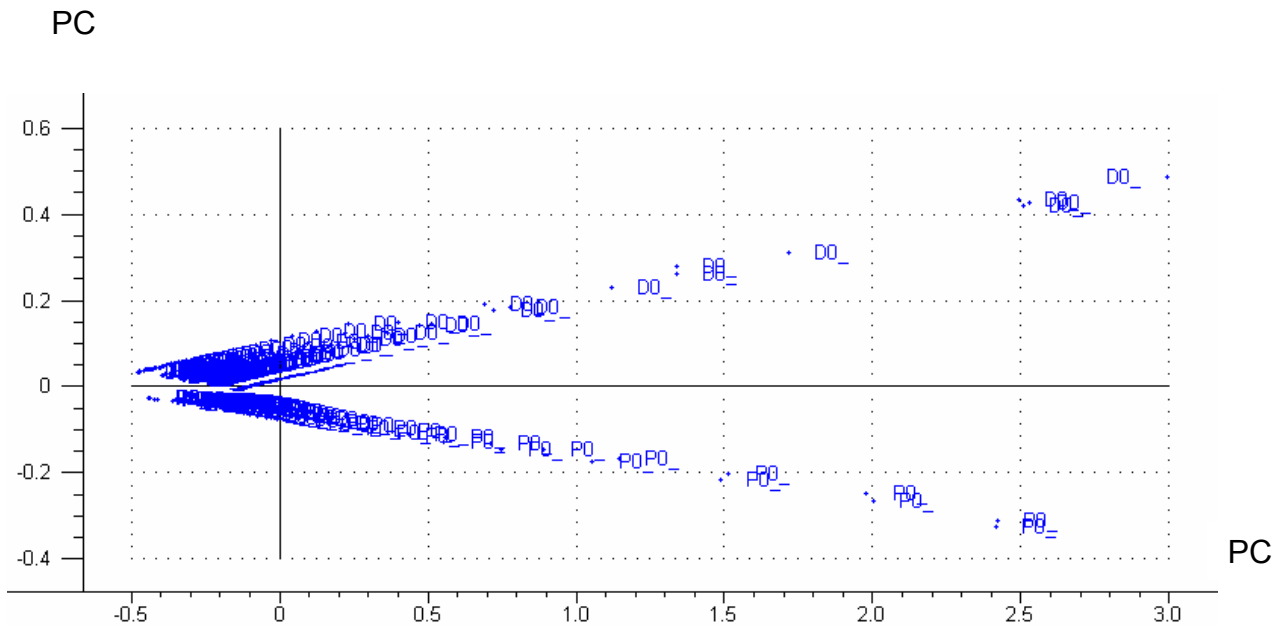
Innerhalb der pasteurisierten Proben sind große Unterschiede zu erkennen, die sich in weit auseinander liegenden Scorewerten bemerkbar machen. Trotzdem ist ein Zusammenhang der Scorewerte dieser Gruppe in Form eines lang gestreckten Dreiecks zu erkennen.

Gleiches gilt für die Scorewerte innerhalb des Clusters der unbehandelten Proben.

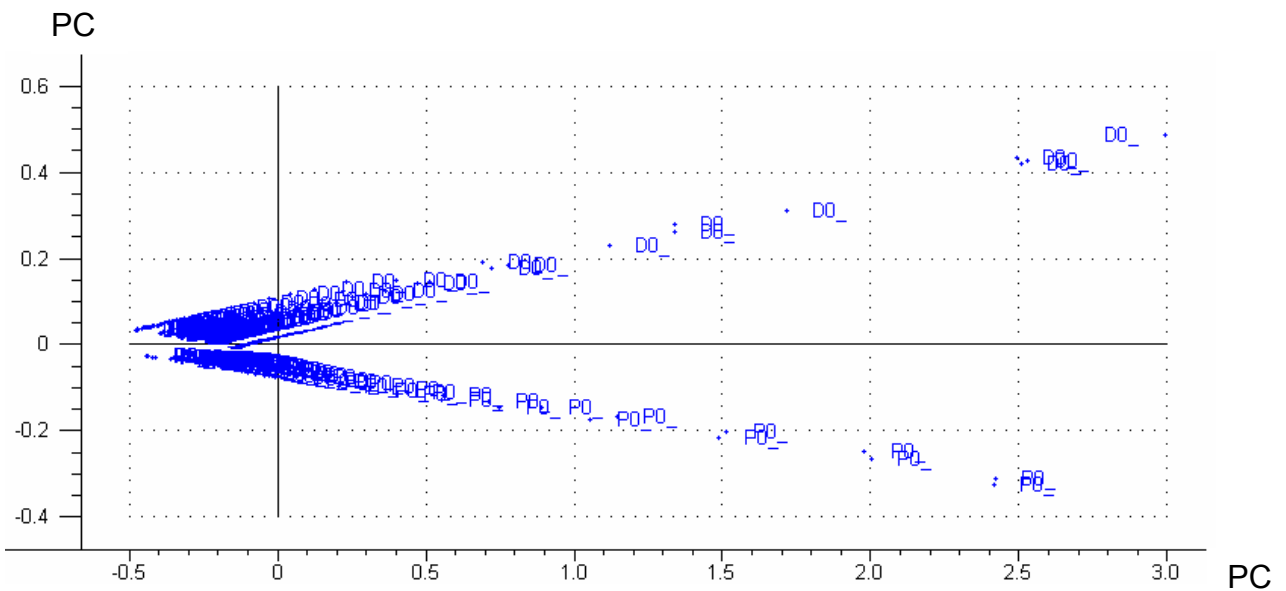
Bei der PCA 2 ergibt sich ein ähnliches Bild, wobei die mit 10 kGy behandelten Proben anstelle der unbehandelten Proben treten (Abb. 3.44).

PCA 3 (Abb. 3.45) zeigt, dass sich die Scores der unbehandelten und die der mit 10 kGy behandelten Probe teilweise vermischen. Trotzdem sind Gruppen von unbestrahlten Proben und getrennt davon Gruppen von bestrahlten Proben zu erkennen. Hier könnte eine genaue Auswahl der Spektren noch zu einer Clusterbildung führen. Dies wird weiter verfolgt.

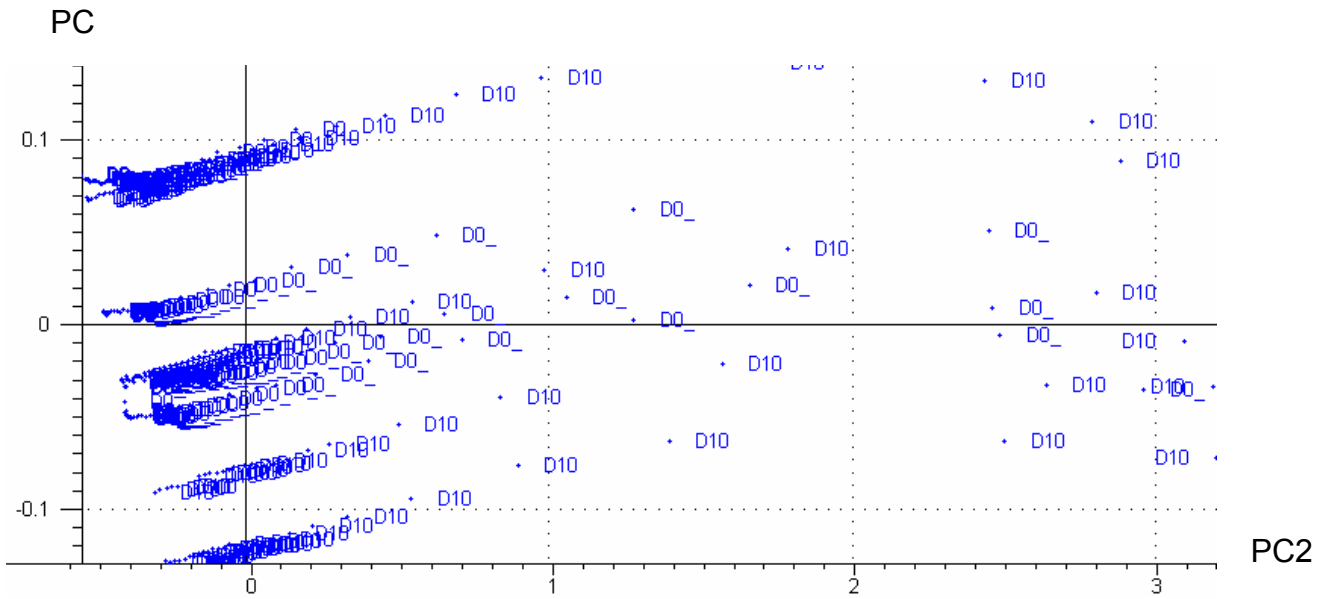
Mit Hilfe der PCA 4 (Abb. 3.46) konnte dargestellt werden, dass sich das Cluster der pasteurisierten Proben klar von dem gemeinsamen Cluster der bestrahlten und unbehandelten Proben unterscheidet.



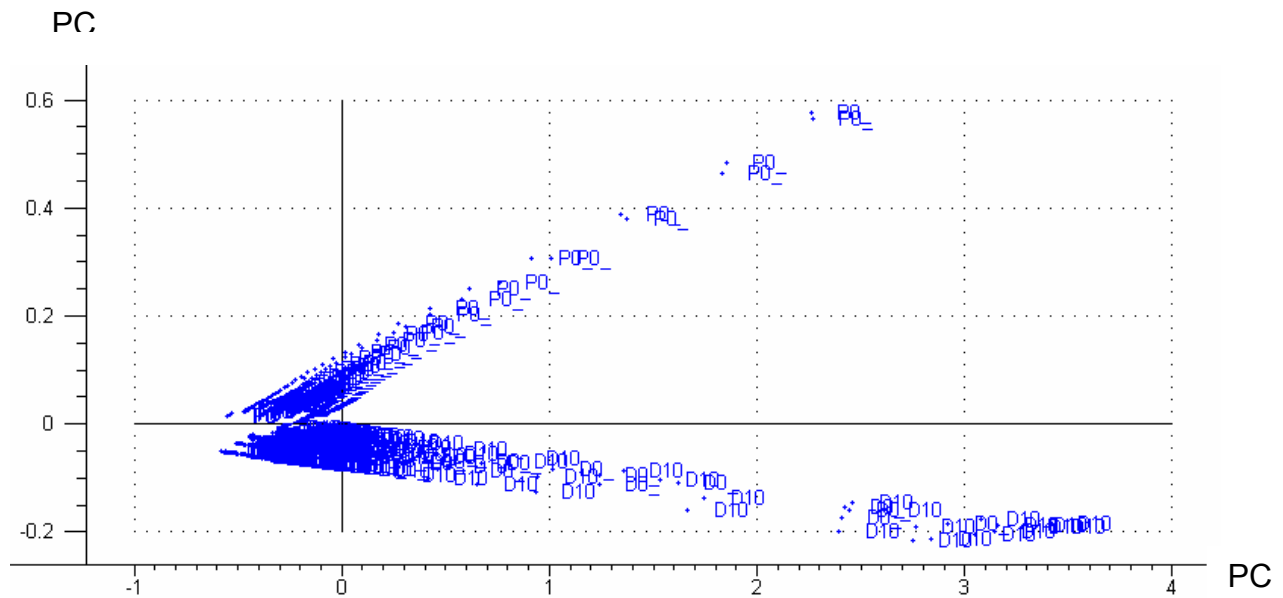
**Abb. 3.43:** Score plot 1- pasteurisierte Probe P0\_ // unbehandelte Proben D0\_



**Abb. 3.44:** Score plot 2 – pasteurisierte Proben P0\_ // bestrahlte Proben 10 kGy D10



**Abb. 3.45:** Score plot 3 – unbehandelte Proben D0\_ // mit 10 kGy bestrahlte Proben D10



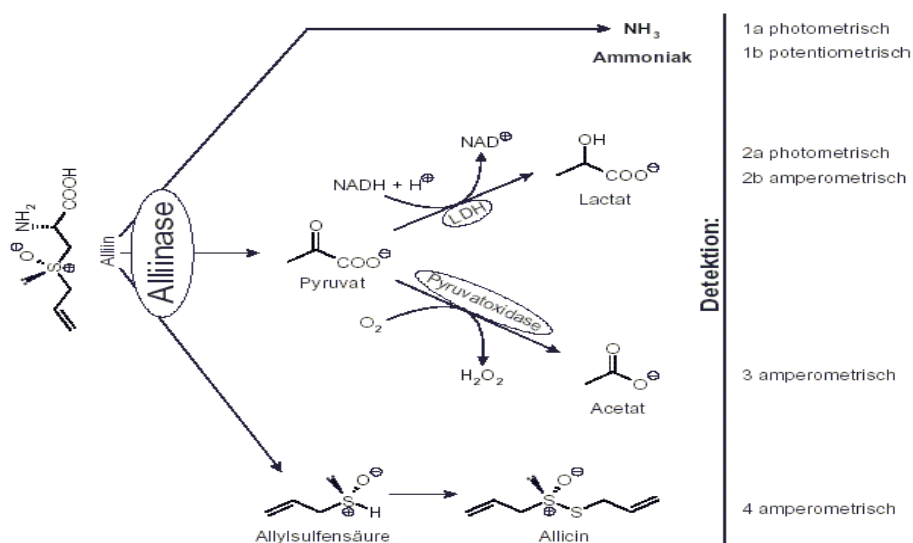
**Abb. 3.46:** Score plot 4- sämtliche Spektren

## 4 Diskussion

### 4.1 Biosensorik

Wie einleitend erwähnt, konnte in der vorliegenden Arbeit eine biosensorische Messmethode zur Bestimmung von Cysteinsulfoxiden als Qualitätsindikator für deren medizinische Bedeutung in Lauchgewächsen entwickelt und angewandt werden.

Alk(en)ylcysteinsulfoxide können jedoch enzymatisch (Alliinase) behandelt, in diverse Folgeprodukte wie Ammoniak, Lactat oder Acetat bzw. Allicin umgesetzt und dementsprechend mit unterschiedlichen sensorischen Messmethoden qualitativ und quantitativ bestimmt werden. Einen Überblick hierüber bietet Abbildung 4.1.



**Abb. 4.1** Ammoniak-Freisetzung durch Alliinase sowie andere Folgeprodukte und deren Detektionsmöglichkeit (Krest 2000).

Wie das entstandene Allicin bzw. Acetat als Folgeprodukte der Einwirkung durch Alliinase amperometrisch nachgewiesen werden können, war es auch möglich, das freigesetzte Ammoniak sensorisch sowohl amperometrisch als auch photometrisch auszuwerten, wodurch die vorhandenen Cysteinsulfoxide zu ermitteln sind (Keusgen 1999).

Der Versuch/Wunsch, ein schnelleres, genaueres, flexibles und kostensparendes Messverfahren zu finden, welches eine effiziente Routinemessung der CS

begünstigt, stellt eine Herausforderung dar. Aus diesem Grund wurde auf der Basis des freigesetzten Ammoniaks eine Fließinjektionsanlage (FIA) zum Einsatz herangezogen.

#### **4.1.1 Gründe für den Einsatz des FIA und die hohe Empfindlichkeit der fluorimetrischen Bestimmung**

Fließinjektionsmethoden in ihrer gegenwärtigen Form wurden, wie in der Einleitung erwähnt, von Ruzicka und Hansen in Dänemark und Mitarbeitern in den Vereinigten Staaten Mitte der 70er Jahre beschrieben. Die Technik in der Analytik stellt eine Weiterentwicklung von Verfahren mit unterteiltem Fluss dar, die in den 60er- und 70er-Jahren für automatische Routinebestimmungen einer Vielfalt von Substanzen in Blut- und Urinproben eingesetzt wurde.

Als Vorteile zu bezeichnen sind

- kurze Analysezeiten (bis 5 Minuten) und hoher Probendurchsatz
- kurze Proben-Vorbereitungszeiten
- geringer Einfluss von Kontaminationen
- geringer sowie günstiger Reagenzverbrauch
- gute Reproduzierbarkeit
- hohe Flexibilität für diverse Bestimmungsreaktionen, Detektoren sowie Trenn- und Anreicherungsoperationen (Lacy N. et al. 1990; Fernandes-Band et al. 1990; Valcarcel M et al. 1991)
- Leichte Automatisierung komplexer Analyseverfahren
- Eignung für die Online-Kupplung an technische Stoffumwandlungsprozesse (Ruzicka J. 1986)

In der vorliegenden Arbeit wurden die Proben in dem verwendeten FIA-System mittels einer wässrigen Lösung, die eng aufeinander folgende Luftblasen enthielt, zu einem Detektor transportiert. Die Luftblasen dienen dazu, eine übermäßige Verteilung der Proben zu verhindern, die Vermischung von Proben und Reagenzien zu unterstützen und die Wände des Leiters zu säubern, um eine Kreuzkontamination zwischen aufeinander folgenden Proben zu vermeiden.

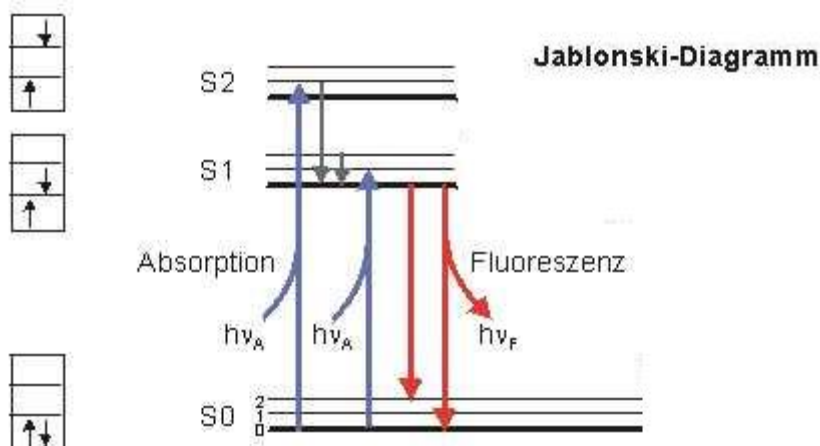
Als Detektionsmöglichkeiten ergeben sich in dieser Hinsicht, wie bei chromatographischen Analysemethoden üblich, viele Detektorarten, die man in zwei

Kategorien unterteilen kann: zum einen *Lösungseigenschaften-sensitive Detektoren*, welche auf bestimmte physikalische Parameter der gesamten Fließlösungen ansprechen, wie Brechungsindex, Dielektrizitätskoeffizient oder Dichte, die in Anwesenheit gelöster Substanzen verändert werden; zum anderen *analytselektive Detektoren* – wie im Falle des Ammoniaks in dieser Arbeit –, die nur auf eine bestimmte Eigenschaft der gelösten Substanzen ansprechen, die bei der mobilen Phase nicht allgemein auftreten, nämlich auf UV-Extinktion, Fluoreszenz oder Diffusionsstrom.

Die analytselektive Detektion bringt Vorteile mit sich, die sich im Falle der Fluoreszenz im Vergleich zu der Absorption, wie in dieser Arbeit realisiert, auswirken. Hierfür mussten die zugrunde liegenden Fakten und Informationen wie in den folgenden Abschnitten diskutiert werden.

#### 4.1.2 Vergleich der Absorptometrie mit der Fluorimetrie als bevorzugter Detektion für den FIA

Nachfolgend werden die unterschiedlichen Aspekte der Fluoreszenz und Photometrie beleuchtet.



Mit Hilfe von Energiediagrammen, die nach dem polnischen Physiker Alexander Jablonski benannt sind, kann die Energie der Elektronenübergänge, die bei Absorption und Emission von Photonen auftreten, dargestellt werden. Viele Fluorochrome haben aromatische Ringstrukturen. Solche Moleküle besitzen delokalisierte Elektronen in sogenannten bindenden  $\pi$ -Orbitalen. Die Elektronen

dieser Orbitalen treten leicht in Wechselwirkung mit der Umgebung und erreichen bei Absorption eines Anregungsphotons ein höheres Orbital ( $\pi^*$ ). In bindenden Orbitalen liegen Elektronen normalerweise mit antiparallelem Spin vor - eine Anordnung, welche die sogenannten Singulett-Zustände charakterisiert (**S0**, **S1**, **S2**). Die Absorption eines Anregungsphotons ( $h\nu_A$ ) hebt ein Elektron aus dem Grundzustand **S0** in einen der angeregten Zustände **S1** oder **S2**. Dieser Vorgang verläuft extrem schnell, er vollzieht sich innerhalb etwa  $10^{-15}$  sec.

Aus dem oberen angeregten Zustand ist ein Übergang nach S1 möglich, ohne dass ein Photon emittiert wird ("innere Umwandlung"), aber beim Übergang in den Grundzustand wird die freiwerdende Energie mit gewissem Verlust als Fluoreszenzphoton ( $h\nu_F$ ) emittiert. Die Energie des emittierten Photons ist immer geringer als die des absorbierten Photons - damit ist die Wellenlänge des Fluoreszenzlichts größer als die des Anregungslichts (Stokessche Regel). Die mittlere Verweilzeit im angeregten Zustand (Fluoreszenz-Lebenszeit) liegt bei vielen Fluorochromen im Bereich von 10 ns (Adam W. 1980, Moore W. J., Hummel D. O. 1986).

Wenn eine Küvette mit dem Durchmesser **d** cm eine Flüssigkeit enthält, in der eine fluoreszierende Substanz (ein Fluorochrom) mit der Konzentration **C** und dem molaren Extinktionskoeffizienten  $\epsilon$  gelöst ist, zeigt diese sowohl eine Absorption **A** als auch eine Fluoreszenz **F**, wenn sie mit parallel initiativem Licht **I<sub>0</sub>** bestrahlt wird, das geeignet ist, die Fluorochrom-Moleküle anzuregen (Skoog D.A.; Leary J.J. 1992).

Dank der Beer-Lambert-Gleichung kann man das absorbierte Licht **A** mit den oben aufgeführten Parametern wie folgt berechnen:

$$I_d = I_0 \cdot 10^{-\epsilon cd} \quad \rightarrow \quad \text{Log.}(I_0/I_d) = \epsilon cd$$

Also 
$$\mathbf{A} = I_0 - I_d = I_0 \cdot (1 - 10^{-\epsilon cd})$$

Bei Strahlungsanregung des aufgelösten Fluorochroms zeigt sich neben der Absorption auch **Fluoreszenz**, welche nicht nur proportional ist zur Konzentration des untersuchten Substrats, sondern auch zur Intensität des anregenden Strahls bzw. dessen Quantum-Effizienz **Q**.

Demnach gilt für die Stärke der Strahlungsfluoreszenz **F** bei einer Strahlungsleistung **P<sub>0</sub>** des in die Lösung einfallenden Strahls und **P** entsprechend nach Durchqueren der Wegstrecke **b**, die Gleichung:  $F = k'(P_0 - P)$ , wobei **k** eine Konstante ist und vom Wirkungsgrad der Quantenausbeute **Q** des Fluoreszenzprozesses abhängt.

Das Beersche Gesetz lässt sich bei der Fluoreszenz wie folgt zeigen:

$$F = I_0 \cdot (1 - 10^{-\epsilon c d}) \cdot Q$$

Hierbei gibt **Q** als Quantenausbeute die Wahrscheinlichkeit an, mit der ein Photon einer bestimmten Wellenlänge ein Elektron-Loch-Paar erzeugt, das zum Photostrom beiträgt. Sie stellt damit das Verhältnis der photogenerierten Elektronendichte zur eingestrahltten Photonendichte wellenlängenabhängig dar (Skoog et al. 1992):

$$Q(\lambda) = (n_{EI} / n_{PH})$$

Aus den oben aufgeführten Gleichungen und Parametern geht Folgendes hervor:

Die erhöhte Empfindlichkeit der Fluoreszenz rührt von der Tatsache her, dass der konzentrationsbezogene Parameter unabhängig von der Strahlungsleistung der Quelle **P<sub>0</sub>** gemessen werden kann. Im Gegensatz dazu erfordert eine spektral-photometrische Messung sowohl die Erfassung von **P<sub>0</sub>** als auch **P**, weil die Extinktion **A**, die proportional zur Konzentration ist, vom Verhältnis dieser beiden Größen abhängt.

Die Empfindlichkeit einer fluorimetrisch basierten Methode kann durch Erhöhung von **P<sub>0</sub>** ODER durch die weitere Verstärkung des Fluoreszenzsignals verbessert werden. Im Gegensatz dazu führt bei der Spektralphotometrie eine Zunahme von **P<sub>0</sub>** zu einer proportionalen Änderung von **P** und beeinflusst **A** daher nicht.

Fluorimetrische Methoden besitzen deshalb generell Empfindlichkeiten, die ein bis drei Größenordnungen höher ausfallen als entsprechende photometrische Verfahren.



#### **4.1.2.1 Reflexion über die experimentelle Empfindlichkeit des FIA im Vergleich**

Im Hinblick auf den vorhergehenden Abschnitt erweist sich die fluorimetrische Ammoniakbestimmung als Leitfaden zur Berechnung der vorhandenen Cysteinsulfoxide in den untersuchten Knoblauch-Proben als empfindlicher. Zum ersten Mal konnte mit einem Messsystem wie FIA eine Nachweisgrenze von  $0.9 \mu\text{M}$   $\text{NH}_3$  mit einem Bestimmtheitsgrad von 0,99 definiert werden (Tannous 2003). Denn bislang lag die Nachweisgrenze photometrisch bei einem Bestimmtheitsgrad von 0,82 bei  $100 \mu\text{M}$  (Schmitt M. 2004) und bei  $3 \mu\text{M}$  bei einem Bestimmtheitsgrad von 0,99 bei Keusgen 1999; jedoch lag sie nach Krest 2000 bei  $5 \mu\text{M}$ . Außerdem war für die empfindliche Erfassung von Ammoniak wichtig, dass das genuine Ammoniak in den Knoblauchproben durch den Enzymreaktor ohne weiteres ausgeschlossen werden konnte. Dies zeichnet FIA als kombispezifisches Messverfahren aus.

#### **4.1.3 Immobilisierung**

Für die Anwendbarkeit des neuartigen biosensorischen Messsystems stand die Immobilisierung der Alliinase als zentrales Problem im Mittelpunkt; entscheidende Schritte in die Lösungsrichtung wurden in dieser Arbeit getan.

Eine solche Aufgabe lässt sich in einem Messverfahren am besten umsetzen, indem man einerseits diesen Schritt als Teil eines integrierten Systems betrachtet und mit den umgebenden Einheiten in Einklang bringt; andererseits muss man solche Kriterien in Betracht ziehen, die eine Immobilisierung und deren Vollständigkeit, Langzeitstabilität und Einfachheit sowie ihre Wiederverwendbarkeit wirtschaftlich ermöglichen.

Der Literaturrecherche nach bieten sich für die Alliinase-Immobilisierung eine Reihe von unterschiedlichen Immobilisationsverfahren an, die sich von der Handhabung bzw. Verweilzeit über die Kostenfrage bis hin zur Wiederverwendbarkeit voneinander unterscheiden. Im vergleichenden Überblick zwischen dem in dieser Arbeit verwendeten Immobilisierungsverfahren der Alliinase und den Verfahren der Immobilisation auf anderen Trägern wie Teflon, Aluminiumoxid, Gold und anderen Polymeren lassen sich die Eignung und die Relevanz des lediglich einstündigen

Verfahrens der Immobilisation auf dem Träger Concanavalin Agarose sehr leicht erkennen.

Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass der 1:10 verdünnte Rohextrakt der Alliinase ohne jegliche vorhergehende Reinigungsschritte und damit verbundene Kosten und Umstände auf den Träger Lektin Concanavalin Agarose mit Hilfe eines peristaltischen Pumpensystems 0.1 ml/min innerhalb weniger als einer Stunde erfolgreich aufgebracht und vollständig immobilisiert werden kann. Anschließend ist es möglich, das Immobilisat-Substrat bzw. den Mikroreaktor unmittelbar in der Durchfluss-Messeinheit einzusetzen oder ihn bei 4 °C in einem verschlossenen, mit Phosphatpuffer gefüllten Behälter „Falcon Tubes“ zum nächsten Einsatz aktiv aufzubewahren. Ein derart vorbereiteter Mikroreaktor konnte nach mehrfacher Lagerung bei 4 °C problemlos monatelang für bis zu 200 Messungen verwendet werden. Dies zeigt die sehr gute Langzeitstabilität dieser Immobilisation gegenüber pH- Änderungen durch während der Lagerung mögliches Auftreten von Ionisation oder Dissoziation. Denn die aktive unbehinderte Anbindung der Alliinase an den sogenannten Spacer Lektin–Con.A bewährte sich durch seine Aktivität bzw. Einwirkung auf die umzusetzenden Cysteinsulfoxide und bewirkte gleichzeitig eine relativ starke Immobilisierung. Denn es handelt sich hier NICHT um Wasserbrücken oder Ionenwechselwirkung mit dem Immobilisat, sondern um eine stabile Amino/Carboxyl-Bindung, die wiederum bei sonstigen physikalischen oder chemischen Versuchsschritten wie Spülen oder Reinigen eine sehr bedeutende Rolle spielt.

Andererseits lässt sich die Alliinase auch, wie bei Milka 1997, aufbauend auf Arbeiten von Schults et al., 1979; Tan et al., 1993; Piyakis et al., 1995, auf Teflon als inertes Trägermaterial immobilisieren. Ein Blick in diese Arbeiten lässt jedoch die zahlreichen verwendeten Chemikalien, Geräte, sowie die damit verbundenen Kosten, Umstände und Verweilzeiten sehr leicht erkennen. Denn bei der Vorbereitung von Teflon, basiert auf Teflon®- Pulver oder Folien, werden zur Konditionierung und Funktionalisierung der Oberflächen für eine saubere und effektive Ankerfunktionsgruppe bis zum erfolgreichen Abschluss der Immobilisierung zwischen Reduktion und Silanisierung nicht nur Stunden, sondern Tage benötigt. Allein zur „Vervollständigung der Silanisierung auf aluminiumbeschichteten Teflonproben

werden die Proben für 12 Stunden auf 115 °C erhitzt“ Milka et al., 2000. Nichtsdestotrotz eignet sich der Teflon- Pulver-Träger als Füllmaterial für den Einsatz in einer Durchfluss- Messapparatur (Keusgen M 1999, P.69).

Offenbar zählen sich Umstände bei einem anspruchsvollen Immobilisierungsverfahren erst dann aus, wenn es sich um eine Erweiterung der Immobilisierungsalternativen oder um eine bestimmte geometrische Lokalisierung eines Moleküls handeln soll. Denn es ließ sich nach jetzigem Stand der Beschichtung für den vorgesehenen Einsatz in dieser Arbeit kein einfacher Weg zur Immobilisierung der Alliinase auf Lektin Con. A erforschen.

Es ist nicht zuletzt deshalb Con. A eingesetzt worden, weil die quervernetzte Concanavalin-A-Agarose (Con-A) bereits über viele Vorteile für die Immobilisierung von Alliinase verfügt und sich in dieser Arbeit aus weiteren Gründen als vorteilhaft erwies: Die Aufbaueinheiten des Glycoproteins (Con-A) verfügen über viele Bindungsstellen, welche die Immobilisierung der Alliinase in stabilen Bindungen begünstigen (Abb. 3.4 Lektin-Komplex Ergebnisse).

Das Enzym konnte schonend unter physiologischen Bedingungen immobilisiert werden.

Die biologisch aktive Beschichtung ist regenerierbar, da durch einen mannanhaltigen Puffer die Bindungen des Con-A gespalten werden und nach einem Spülvorgang erneut Con-A und Alliinase aufgebracht werden können.

Die komplexe Lektin-Agarose wird bereits in umfangreichen Applikationen wie der Proteinreinigung eingesetzt, ist wiederverwendbar und kommerziell erhältlich.

#### **4.1.4 FIA und HPLC-Methoden im Vergleich**

Um die zahlreichen pflanzlichen Proben zwecks chemo-taxonomischen Vorhabens oder sonstiger Routineanalyse auf CS-Gehalt zu bestimmen, erwies sich das Durchflussanalysesystem als bestens geeignet. Denn die Probenaufbereitung für den entwickelten FIA war zwar teilweise analog zu den Aufbereitungsschritten bei der HPLC, nämlich nach Inaktivierung der Alliinase mit Ethanol und Aufnahme des Extraktes in 10 ml Phosphatpuffer; man verzichtete jedoch auf die

Derivatisierungsschritte und den damit verbundenen Zeitverlust und einige Umständlichkeiten. Außerdem nimmt eine HPLC-Analyse etwa eine Stunde Retentionszeit in Anspruch, wofür bei der hier vorgestellten FIA-Methode 3-5 Minuten benötigt werden (s. Methoden), während einige Methoden über GC noch ungefähr 25-30 Minuten beanspruchen (Wang H. et al. 2007). Die umweltfreundliche, angenehme Handhabung und der Umgang mit wässrigen Lösungen (Phosphatpuffer) zeichnen den FIA aus, verglichen mit dem unentbehrlichen Einsatz von organischen Laufmitteln und deren Kosten und Toxizität bzw. ihrer Entsorgung.

Über die Vergleichbarkeit der gemessenen CS-Werte bei gleichen Proben konnte man trotz kleiner Abweichungen (etwa 10 %, verglichen mit HPLC-Werten) mit Hilfe des FIA eindeutige, signifikante Aussagen über den Gehalt an Cysteinsulfoxiden treffen. Denn das Hauptinteresse des vorliegenden Vorhabens richtete sich zunächst auf den gesamten CS-Gehalt. Bis zu 36 Proben konnten dank automatisierter Racks (Autosampler) pro Tag (1 Arbeitstag = 8 Stunden) bestimmt werden, wofür man mit dem HPLC Verfahren mehrere Wochen benötigt hätte. Allerdings ermöglicht es der FIA nicht, Aussagen über die einzelnen Cysteinsulfoxide zu treffen, da es sich bei FIA nicht um ein trennanalytisches Verfahren handelt, welches bei Interesse über die mögliche Ankopplung der beiden genannten Verfahren ohne weiteres realisiert werden kann.

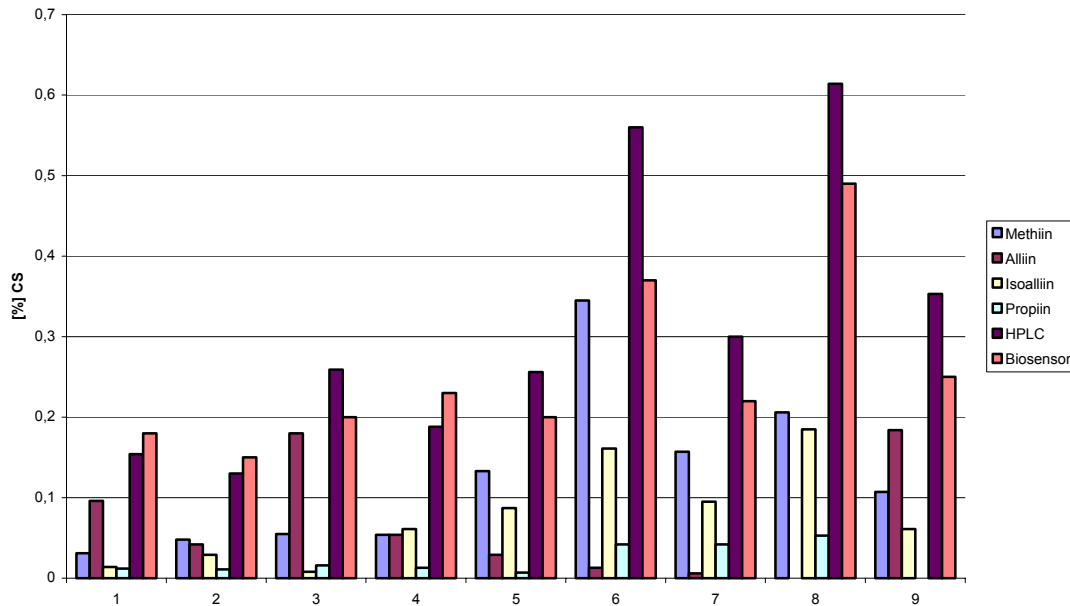
Nachteilig beim FIA sind deshalb die peristaltischen Förderungsschläuche, weil sie sich mit der Zeit durch die entwickelte Reibungswärme am Pumpen-Kopf (siehe Methoden) entspannen und ihre Anhaftung sich an den Spannstellen im System lockert. Hierdurch ergibt sich für die eingestellte Laufzeit der einzelnen Pumpen eine negativ veränderte Förderrate der entsprechenden Lösungen, die sich auf die Peaksymmetrie auswirkt. Das Problem lässt sich jedoch über eine Abkühlung oder Pausierung leicht beheben. Eine vorläufige Ablösung der Förderschläuche vom Pumpenkopf wirkt sich zugunsten der Lebensdauer und Effizienz des Einsatzes aus. Das Fördersystem sollte künftig zur Einhaltung der eingestellten Förderrate für längere Zeiten als 8 Stunden technisch entsprechend verbessert oder das Pumpsystem unter Umständen mit den gewohnten HPLC- Pumpen ersetzt werden.

**Als Schlussfolgerung** aus den obigen Abschnitten kann man wohl kundtun, dass die neu entwickelte und erstmalig eingesetzte fluorimetrische FIA- Methode ihre Eignung für die Routinenanalyse oder Kontrolle bestens bewiesen hat. Die Genauigkeit bei einer Standardabweichung von 0,2 %, ihre Flexibilität, vielfältige Anwendungsmöglichkeiten, wie hier in dieser Studie für die Bestimmung von hochwertigen Substanzen in Lauchgewächsen, als Pharmakon oder als Lebensmittel, sprechen dafür. Denn diese Methode kann auch zum Messen von NH<sub>3</sub>-haltigen Proben zuverlässig sowohl in Umweltstudien als auch für klinische Untersuchungen eingesetzt werden. Mit der erreichbaren Empfindlichkeit von 0,9 µM NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, ihrer Zeit- und Kostengünstigkeit sowie Umweltfreundlichkeit (wässrige Lösungen) und der Vergleichbarkeit der erzielten Ergebnisse mit konventionellen analytischen Systemen konnte sich diese Methode als erfolgreich erweisen.

#### **4.1.5 Quantitativer und qualitativer Bestimmungsvergleich des CS-Gehaltes mittels FIA und HPLC.**

Wie im vorigen Kapitel erläutert, wurden 9 Proben der Gattung *Allium* einheitlich aufbereitet, für die Bestimmung mittels FIA und HPLC entsprechend vorbereitet und jeweils analysiert und ausgewertet.

Um ein besseres Verständnis des Unterschieds zwischen den beiden eingesetzten Techniken bzw. deren Einflüsse auf die Analysen zu erlangen, werden hierfür die erzielten Bestimmungen grafisch verglichen und diskutiert.



**Abb. 4.2:** Vergleich der prozentualen Gesamt- und Einzelanteile an CS (bezogen auf die Einwaage des Probenmaterials), in 9 Proben analysiert mit HPLC und FIA.

Die Abbildung 4.2 zeigt in den ersten Balken die einzelnen Homologen der Cysteinsulfoxide Methiin, Alliin, Isoalliin, Propiin (von links nach rechts), gefolgt von ihrer berechneten Summe mittels HPLC, und anschließend die gesamte CS, mittels FIA in 9 Gruppen dargestellt, sprich 9 Proben (Tab. 3.5, Ergebnis).

Im Hinblick auf den gesamten Gehalt der Cysteinsulfoxide haben sich im großen Teil der analysierten Proben leichte bis deutliche Unterschiede, je nach Homologengehalt der Probe, bemerkbar gemacht. Das ist einerseits ein unmittelbarer Hinweis auf den relativ erhöhten Gehalt an Alliin und Isoalliin in den Proben bei der FIA-Bestimmung. Andererseits muss man davon ausgehen, dass eine leichte Abweichung bei der FIA-Bestimmung von HPLC von durchschnittlich etwa  $\pm 10\%$  auftritt.

Denn wie aus den Ergebnissen gefolgert wurde, wurde die Analyse mittels FIA-Bestimmung basierend auf der Umsetzung der einzelnen Homologen der Probe durch die Alliinasespezifität nachvollzogen. Diese Spezifität bzw. höhere Affinität der Alliinase gegenüber Alliin bzw. Isoalliin von etwa  $40\%$ , verglichen mit anderen Homologen (siehe Abb. Ergebnis-Kapitel), erklärt bei den entsprechenden Proben (1, 2, 4) die Abweichung zu Gunsten der FIA-Bestimmung. Auf der anderen Seite

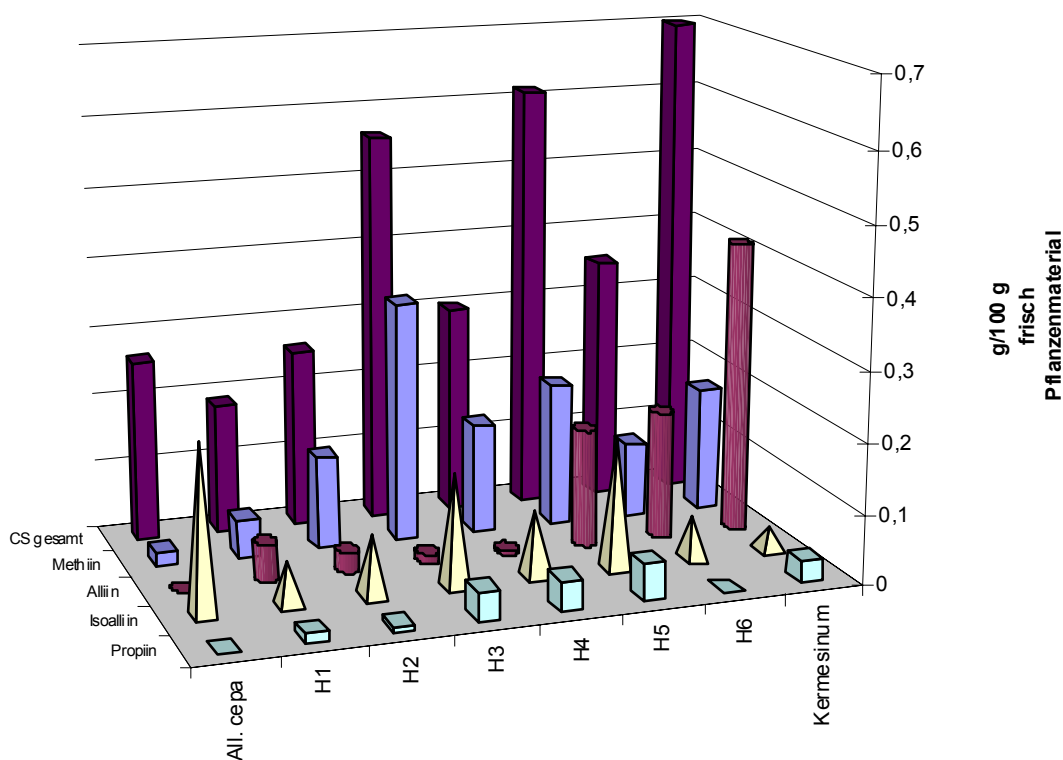
ergeben sich die erhöhten HPLC-Werte gegenüber FIA durch den erhöhten Inhalt an Methiin, welches in der Berechnung des gesamten CS-Gehalts der Kalibrierung zu Grunde liegt.

**Fazit:**

- Das FIA-Bestimmungsverfahren konnte problemlos mit einem einzigen Lauf (etwa 5 Minuten) Aufschluss geben über den gesamten Gehalt an Cysteinsulfoxiden.
  
- Mit sehr großer Wahrscheinlichkeit gibt FIA einen Hinweis auf den erhöhten Gehalt von Alliin und Isoalliin in den untersuchten Proben, was man sich bei entsprechendem Interesse zunutze machen kann.
- Die mit dem FIA-Verfahren erzielten CS- Werte können als durchschnittlich bis zu etwa  $\pm 10-13$  % abweichend von einer vergleichbaren HPLC-Analyse angenommen werden.

#### 4.1.6 Vergleich der verschiedenen *Allium*-Hybriden mit deren Parents

Im Rahmen der Zusammenarbeit mit dem Projektpartner bei IPK Gatersleben werden Hybride der Gattung *Allium*, nämlich *Allium cepa* x *kermesinum*, in dieser Arbeit mittels FIA und HPLC auf CS bestimmt und hierfür mit deren Vätern im Vergleich diskutiert.



**Abb. 4.3** Verbreitung der Cysteinsulfoxide [CS] in *A. kermesinum*- bzw. *A. cepa*-Hybriden (H1 oder Hyb1: All 1096, H2:All 1098, H3: All 1099, H4:1101, H5:All 1456, H6:All 1519).

Aus der Graphik lässt sich, ausgehend von der Maternus *A. cepa* (0,26%, bezogen auf das Pflanzenfrischmaterial) und dem Paternus *A. kermesinum* (0,67% CS), leicht erkennen, dass die unterschiedlichen erprobten Hybriden *A. cepa* x *kermesinum* (H1 bis H6), einen Zwischengehalt von etwa 0,5 % (gradiert zwischen dem elterlichen Gehalt) an gesamten CS nachweisen konnten. Dies ist ein typischer Gesamtgehalt für Hybriden aus dem erwähnten Elternteil.



Während die Analyse bei *A. cepa* keine Alliin- und Propiin-Anteile aufweist, sind diese bei dem Paternus und bei fast allen Hybriden bis auf Hybrid 6 (H1, 2,...5) nachgewiesen worden. Der Vergleich zwischen den Hybriden und den Eltern zeigt einen Methiin-Gradienten, ausgegangen von den elterlichen Arten, 0,02 % bei Maternus *A. cepa* und Paternus 0,18 % über die Hybriden bis hin zu einem Höchstwert bei Hyb.3 von 0,34 %.

**Daraus folgt**, dass ein Anstieg des Methiin von 50% durch diese Kreuzung möglich war. Ferner konnten andere Homologen, wie geringe Mengen Isoalliin beim Paternus von etwa 0,02% bis hin zu 0,16 %, 0,19 % Isoalliin bei Hyb3 und Hyb5, jeweils dank des Maternus- Inhalts von 0,24% Isoalliin und von spurlosen Anteilen wie Alliin bei *A. cepa* 0 bis 0,18 % bei Hyb6 erzielt werden.

Die Bestätigungsuntersuchung für den genetischen Einfluß auf die untersuchten Proben wurde durch das Projektpartnerlaboratorium dieser Studie durchgeführt, und es konnte gezeigt werden, dass die adäquaten DNA-Banden der Elternteile bei den Hybriden nachgewiesen und charakterisiert worden sind (Storsberg, Tannous et al 2004).

#### **4.1.6.1 *Allium proliferum* mit unterschiedlicher Zwiebellokalität im Vergleich**

*A. proliferum* (Moench) Schrad, auch Etagen- oder Luftzwiebel genannt, bildet anstelle von Blüten (in der Luft) kleine (in zwei oder drei Etagen angeordnete) Brustzwiebeln an den Stengelspitzen, die in der Küche als Gewürz oder zu agronomischen Zwecken weiter verwendet werden können. Die Herkunft dieser Art ist nach Angaben der Datenbank der Hybrid: *A. cepa* L. x *A. fistulosum* L; angebaut wird sie vorwiegend in Nordkaukasien, im Altai, in der Taigazone Westsibiriens und in der Gegend um Leningrad. Die Etagenzwiebel kann bis zu 60 cm hoch aufwachsen. Die in der Luft gebildeten Zwiebeln (Bulben) werden hauptsächlich zur Vermehrung verwendet, während die Zwiebel an der Wurzel der Pflanze zu Ernährungszwecken eingesetzt wird. Im dritten Jahr bilden sich von der Mutterwurzel 8-12 Nebenzwiebeln, die eine violette Farbschattierung aufweisen.

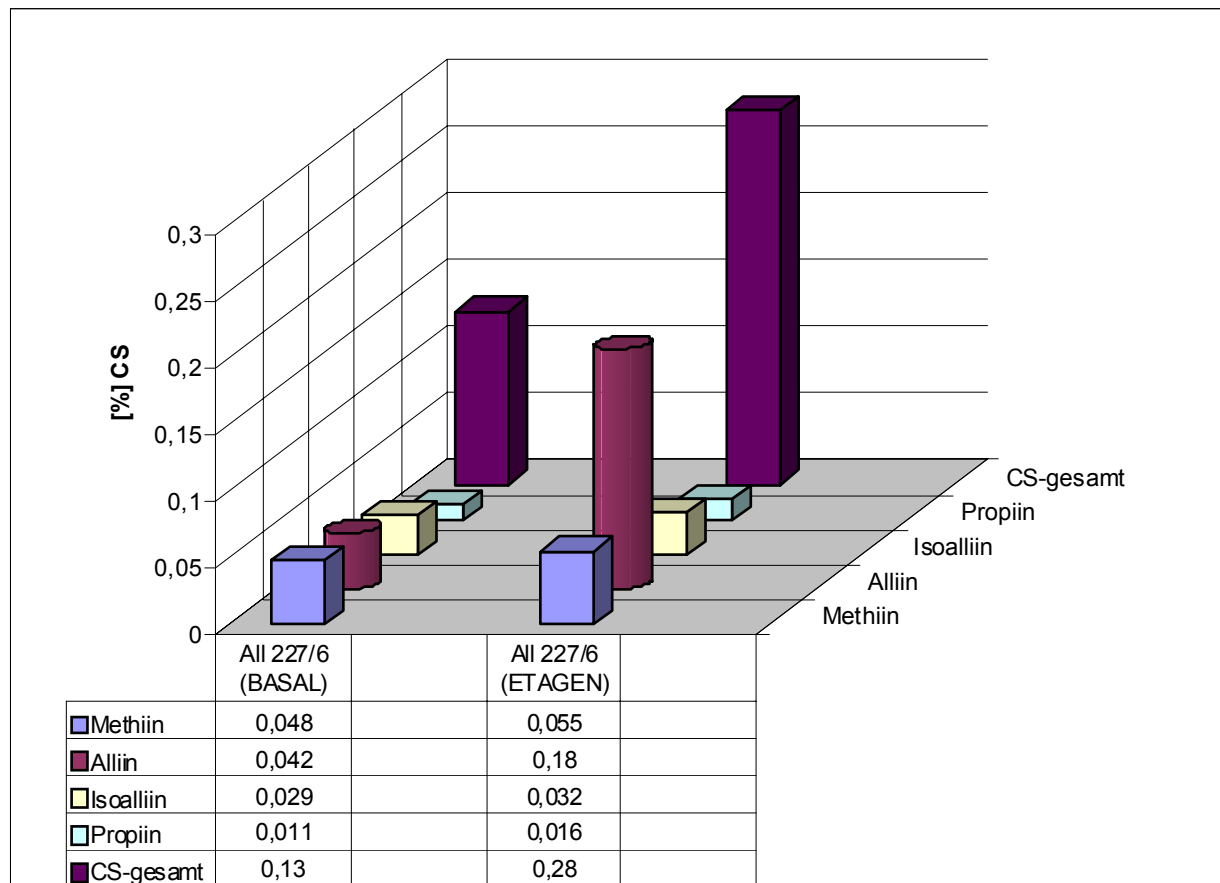


Foto: Luft-Etagenzwiebeln (kultiviert).

In dieser Untersuchung wurde *Proliferum* mittels HPLC auf seinen Gehalt an Cysteinsulfoxiden bestimmt. Hierzu werden die in der Luft gebildeten Zwiebeln (Etagenzwiebeln) mit den an den Wurzeln der Pflanze wachsenden Basalzwiebeln verglichen.

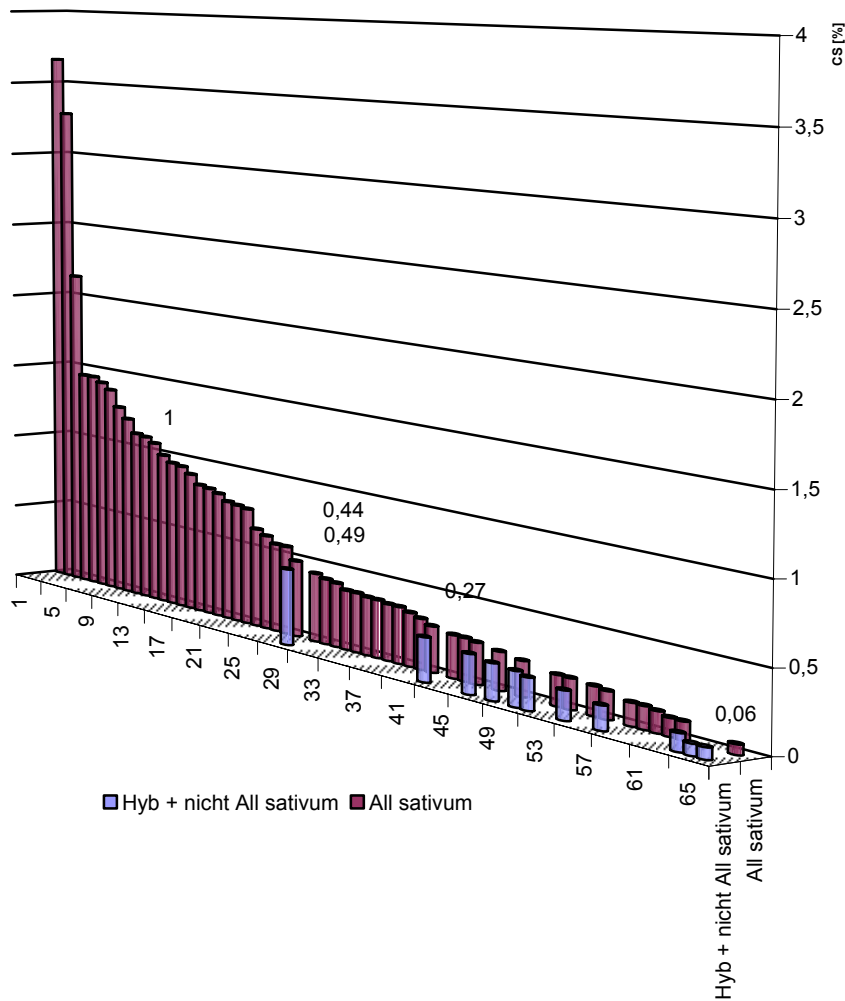
Der Vergleich der unterschiedlichen Homologen zeigt einen sehr signifikanten Unterschied des Gesamtgehalts an Cysteinsulfoxiden. Bei den Etagenzwiebeln liegt dieser etwa 50% höher als bei den Basalzwiebeln. (Abb. 4.4.) Während der gesamte Gehalt an CS in den basalen Teilen  $0,13 \pm 0,005$  % betrug, lag er in den Etagenteilen hingegen bei  $0,28 \pm 0,011$  %.

Dieser Unterschied lässt sich sowohl dank des großen Anstiegs des Alliin-Anteils von 0,042 auf 0,18 % verzeichnen als auch aufgrund der geringfügigen Zunahme der anderen Homologen. Hier kann spekulativ vermutet werden, dass die besseren Lichtverhältnisse, u.a. die Synthese der untersuchten Homologen, insbesondere Alliin begünstigen und bei den in der Luft gebildeten Zwiebeln zu diesem Anstieg führten.



**Abb. 4.4** Vergleich des relativen Gehalts an Cysteinsulfoxiden in *A. proliferum* in Basal- und Etagenzwiebeln.

#### 4.1.7 Cysteinsulfoxide im erprobten *Allium sativum* im Vergleich.



**Abb. 4.5** Vergleich des totalen CS [%]-Gehalts innerhalb des Genus *Allium* in den untersuchten Proben (*All. sativum* mit anderen Arten und Hybriden) (Tab 6.1 im Anhang).

Im Hinblick auf den CS-Gehalt in den 66 untersuchten Proben ist ein Vergleich unter den Arten von *Allium* von großer Bedeutung. In der Abbildung 4.5 sind die 55 Proben (*Allium sativum*) untereinander und mit den anderen untersuchten Arten des Genus *Allium* verglichen.

Einerseits zeigt sich deutlich eine große Variabilität zwischen fast spurlosen Gehalten, wie etwa bei Probe 66 mit nur 0,06 % CS, bis hin zu großen Mengen wie bei Probe 1 mit etwa 3,66 % (siehe Tab 4.1). Andererseits liegt der arithmetische Mittelwert bei 0,64 % CS. Dieser Wert bestätigt sehr deutlich die durchschnittliche Größenordnung des CS-Gehalts im Genus *Allium*.

Man konnte in den untersuchten Proben drei Stufen von CS-Gehalt feststellen.

Bereich 1: (0,00 - 0,27) sehr niedrig

Bereich 2: (0,27 - 0,70) mittel

Bereich 3: (0,70 - 3,66) hoch bis sehr hoch

Die erwähnten Bereiche sind sehr realistisch und vertreten das Subgenus *Allium* (Fritsch 2006; Storsberg 2004, Keusgen 1999, Krest 2002, Keusgen 2002). Denn ein Gehalt an CS über 2 % gilt als sehr hoch, unter 0,27 als niedrig.

Eine andere Einordnung des CS-Gehalts der untersuchten Hybriden wurde in derselben Abbildung dargestellt. Die Hybriden sowie die anderen Arten lagen, verglichen mit den Sativen, im niedrigen bis mittleren Bereich, was für Hybride mit *sativum* als Elternteil vertretbar ist.

#### **Fazit :**

Die Subgenera von *Allium* vertreten einen sehr variablen Bereich an Cysteinsulfoxiden und lassen sich in der untersuchten Auswahl recht gut repräsentieren.

#### **4.1.8 Erläuterungen der Variabilität des CS-Gehalts in den untersuchten *Allium*arten sowie ihre Vergleichbarkeit innerhalb der Gattung *Allium***

Eine Begründung dieser CS-Variabilität könnte die Folge der unten aufgelisteten Kriterien sein.

- Die physikalische, chemische und biologische Zusammensetzung sowie Inhomogenität des Bodens, die zu lokalen Abweichungen der Wasser- und Nährstoffzufuhr führen (Beispielsweise wurden der Stickstoff- und Schwefeleinfluss auf die Größe des Cysteinsulfoxidmusters in *Allium cepa* bei

Cooling und Randle 2003 untersucht, wobei sie eine klare Abhängigkeit feststellten. Ähnliche Verläufe in anderen Arten der Gattung *Allium* sind bei den untersuchten Sativen unumstritten gleichermaßen denkbar.)

- Die umgebenden Lichtverhältnisse und die Luftzusammensetzung sowie andere Biotope und deren Wechselwirkungen und Einflüsse in der Biosynthese der schwefelhaltigen Aminosäure in der Pflanze bzw. den Pflanzenteilen
  
- Eine generative Fortpflanzung ermöglicht einen Gen-Eintrag aus anderen Populationen, der zu einer höheren Diversifizierung des Genoms innerhalb der Population führt und wie in der Abbildung 4.3 auf die Verteilung der Cysteinsulfoxide Einfluss nimmt.

Diese oben genannten Kriterien variieren natürlich sehr, abhängig von der geografischen Lokalität bzw. dem jeweils herrschenden Klima und dessen Einflüssen auf die Gewächse in ihren unterschiedlichen Wachstums- bzw. Entwicklungsperioden (ontogenetisch). Denn die Gattung *Allium* ist von den gemäßigten und warmgemäßigten Zonen der nördlichen Hemisphäre bis in den Mittelmeerraum und Südwestasien (Türkei bis zu den mittelasiatischen Republiken) verbreitet. Insofern verfügt die Gattung über ein breites Spektrum der Klimaanpassung, welche sich natürlich u.a. auf die Biosynthese der enthaltenen Aminosäuren und schwefelhaltigen Aminosäuren in der Pflanze auswirkt.

Die gemessenen CS-Werte in dieser Untersuchung vertreten einen breiten Bereich und überlappen Wild- und Kulturarten der Gattung *Allium*. Insofern bieten sich viele Möglichkeiten für Vergleiche der CS-Werte. Um den Vergleich mit den Wildarten genauer zu verzeichnen, sind einige Wildarten innerhalb der Arbeitsgruppe untersucht worden und in Tab. 4.1 aufgelistet.

TAB. 4.1 AUSGEWÄHLTE WILDARTEN DER GATTUNG ALLIUM		
Alliumarten mit Akzessionbezeichnung		[%] Gehalt des Cysteinsulfoxiden
<i>A. galantum</i>	(All 689)	0,03
<i>A. scordoprasum</i>	(Tax 5832)	0,12
<i>A. maximovicii</i>	(Tax 1995)	0,19
<i>A. nutans</i>	(Tax 0568)	0,19
<i>A. albidum</i>	(All 1223)	0,24
<i>A. oreoprasum</i> <b>Blatt</b>	(Tax 5743)	0,25
<i>A. senescens</i>	(Tax 0825)	0,25
<i>A. angulosum</i>	(G-Tax 1524)	0,28
<i>A. rupestre</i>	(Tax 0652)	0,28
<i>A. oreoprasum</i> <b>Zwiebel</b>	(Tax 5743)	0,29
<i>A. prostratum</i>	(Tax 0640)	0,30
<i>A. lusitanicum</i>	(Tax 0363)	0,41
<i>A. karelinii</i>	(Tax 0279)	0,42
<i>A. pskemense</i>	(Tax 2724)	0,43
<i>A. victorialis</i>	(Tax 0648)	0,85
<i>A. ampeloprasum</i>	(All 1549)	0,15
<i>A. ampeloprasum</i> POT	(All 0557)	0,21
<i>A. ampeloprasum</i> POT*	(All 0550)	0,34
<i>A. ampeloprasum</i> GHG	(Tax 1027)	0,36
<i>A. ampeloprasum</i> GHG**	(Tax 1023)	0,63
<i>A. ampeloprasum</i> POT	(All 0559)	0,68
<i>A. ampeloprasum</i> GHG	(Tax 1025)	0,75
* Pearl onion typ (Perlzwiebel)		
**Gread headed Garlic (Pferdeknolauch)		

Die tabellarisch aufsteigenden CS- Werte der untersuchten Wildarten erstrecken sich, verglichen mit denen in der Abbildung 4.3, von Spuren wie bei *A. galantum* (0,03% CS) bis kurz über den mittleren Bereich hinaus wie bei *A. victorialis* (0,85% CS). Sie bleiben jedoch unter 1% CS. Selbst bei unterschiedlichen Akzessionen einer Art wie in *A. ampeloprasum* (aus der Mittelmeerregion) zeigt sich die Variation des CS-Gehalts sehr deutlich, wobei anzugeben ist, dass sich die Perlzwiebel *A. ampeloprasum* (POT; pearl onion type) schon vom sogenannten Pferdeknolauch morphologisch unterscheidet.

Welche Variation innerhalb unterschiedlicher Speicherorgane (Blätter/ Zwiebel) derselben Akzession vorlag, zeigt auch die Tab. 4.1 bei *A. oreoprasum* Tax 4753.

Daraus lässt sich folgern, dass eine mögliche Klassifizierung der *Allium*arten nach Gehalt der Cysteinsulfoxide zwar möglich, aber nicht unproblematisch ist.

Diese festgestellte Variabilität betrifft sowohl kultivierte als auch wilde Arten, auch in Bezug auf die Variabilität ihrer Schwefelverbindungen. Typisch für das *A. sativum* sind z.B. Alliin, Isoalliin und Methiin, wobei der Literatur zufolge das Alliin in einer ungefähr 10fach höheren Konzentration vorkommt als die anderen beiden Sulfoxide. Während Methiin und Isoalliin für die Küchenzwiebel *A. cepa* charakteristisch sind, sind Methiin und Propiin für Breitlauch (*A. porrum* L) typisch. Außerdem wurden in Arten der Gattung *Allium* etwa 24 Gamma-Glytanylpeptide mit schwefelhaltigen Aminosäuren gefunden (Lancaster und Shaw 1989 u. 1991; Keusgen 1999), die auch eine ähnliche Relevanz bzw. ähnliche pharmazeutische Wirkung haben könnten.

Die Relevanz bzw. Bedeutung des höheren Gehalts an CS liegt meistens dem Alliin zugrunde. Denn das Alliin (zurückzuführen auf die Folgeprodukte Allicin und Ajoen – Radikalfänger-) gilt als Hauptvorstufe für die meist gewünschten pharmazeutischen Wirksamkeiten, sei es in Fragen des Herz-Kreislaufsystems oder als Antikoagulanzen bzw. wegen seiner cholesterinsenkenden, antiarteriosklerotischen Wirkung (Koch 1996).

Die Bedeutsamkeit des CS-Gehalts drückt sich auch durch das ziemlich stabile Verhältnis der dominierenden Schwefelverbindungen aus, nämlich der Muster, die in der vorliegenden Arbeit erfasst sind (Methiin, Alliin, Isoalliin, Propiin), und des somit relativ stabilen Geruchs und Geschmacks der Gattungsarten des *Alliums*.

Einerseits sind die vier Homologen für den typischen Geschmack der Gattung *Allium* zuständig, und andererseits prägt jedes Homolog den typischen Geschmack bzw. Geruch der Untergattung *Allium* aus, z.B. bei überspitztem Isoalliin bekommt man den typischen Geruch von Küchenzwiebeln; bei dominierendem Alliin und dem daraus durch Alliinase entwickelten Allicin wird der typische Geruch von Knoblauch vermittelt; überwiegendes Isoalliin, begleitet von Propiin, verursacht den typischen Geruch von Lauch, wobei das Methiin für den härteren, unbedenklichen Geschmack und Geruch verantwortlich ist (Fritsch & Keusgen 2006).



**Fazit:**

- Die untersuchten Proben zeigten vergleichbare Gehalte an CS.
- Der Gehalt an Cysteinsulfoxiden in einer Art vermittelt ihre Relevanz bzw. ihre pharmazeutische Bedeutsamkeit und durch ihr untersuchtes Muster ihren relativen Geruch und Geschmack.
- Unterschiedliche Speicherorgane in einer Art und damit verbundene morphologische Unterschiede zeigen unterschiedlichen Gehalt an Cysteinsulfoxiden.

**4.2 Bestrahlung**

Die Behandlung von Lebensmitteln mit ionisierenden Strahlen ist eine der neueren Konservierungsmethoden. Diese Methode hat ihre Hauptanwendung in der Praxis bei der Abtötung von unerwünschten Mikroorganismen, Parasiten oder Insekten. Dabei verbessert die Bestrahlung die hygienische Qualität der Lebensmittel und verhindert Krankheiten, die sonst durch Verzehr von mit Parasiten oder pathogenen Mikroorganismen kontaminierten Nahrungsmitteln verursacht werden können. Weiterhin ermöglicht die Bestrahlung für bestimmte Lebensmittel eine Verbesserung der Haltbarkeit.

Sie wird inzwischen in verschiedenen Ländern bei einer großen Palette von Lebensmitteln angewandt, die entweder direkt zum Verbraucher gelangen oder in der Lebensmittelindustrie weiterverarbeitet werden. Besonders bei Lebensmittelzutaten für die industrielle Weiterverarbeitung ist heute vielfach die Bestrahlung eine aussichtsreiche Alternative zu anderen Konservierungsverfahren. So können Kräuter und Gewürze erfolgreich durch Bestrahlung entkeimt werden, statt sie einer Begasung, z.B. mit Ethylenoxid, zu unterwerfen, da diese Begasungsmittel potentiell schädliche Rückstände hinterlassen. Durch den Verzehr von bestrahlten Lebensmitteln bzw. Lebensmittelzutaten wird der Verbraucher daher der Wirkung ausgesetzt.

#### **4.2.1 Bestrahlung von Knoblauch**

Das Pharmakon Knoblauch wurde in seinen herangezogenen vier unterschiedlichen Ausführungen (frisch, Chips, Pulver, Granulat) auf seine mögliche Beeinträchtigung durch eine Behandlung mit ionisierender Strahlung untersucht. Dafür sollten das passende Messverfahren und die notwendigen Messmethoden erarbeitet und entwickelt werden, um den Einfluss der Bestrahlung bemerkbar zu machen.

Bei den frischen Knoblauchzehen wurde der Schaden mit Hilfe des Comet-Assay-Tests nachgewiesen, wobei es sich hier um DNA-Beschädigung bzw. Beschädigungsausmaß handelt.

Dahingehend konnten die Strahleneinflüsse auf die anderen Knoblauchvarianten mit Hilfe des Flow Injection Analyser und des Spektrophometers erfasst werden.

##### **4.2.1.1 Frische Knoblauchzehen und Comet Assay**

Es wurde beabsichtigt, in dieser Untersuchung den frischen Knoblauch dem Strahleneinfluss zu unterwerfen und die Beschädigung der DNA mit dem Comet Assay-Verfahren zu bestimmen. Denn in der Strahlenchemie ist bekannt, dass die möglichen Einflüsse bzw. die durch Strahlung ausgelöste Kettenreaktion in einer wasserhaltigen Materie viel einflusskräftiger wirken und sie somit analytisch erfassbarer werden (siehe Einleitung).

Um den Schaden zu erfassen, wurden in der Literatur oft, wie bereits im Abschnitt der Ergebnisse beschrieben, Messkriterien wie Länge bzw. Intensität des durch Bestrahlung entstehenden Kometen als Auswertungsparameter verwendet. Ebenso wurde in dieser Studie verfahren, und im folgenden Absatz werden die ausgewerteten Parameter im Vergleich behandelt.

Die so präparierten und behandelten Proben, wie in der Methode beschrieben, konnten einerseits nach Länge (Angabe in %) und Intensität des vermessenen Kometenschweifs offensichtlich DNA-Brüche ab 1 kGy nachweisen und zeigten eindeutige Unterschiede zu den unbestrahlten Proben. Hierbei konnten keine signifikanten Unterschiede unter den unterschiedlich bestrahlten Proben (mit 1, 2, 3 kGy) festgestellt werden.

Andererseits wies die Auswertung nach Gesamtfläche bzw. Intensität des Kometen als Messparameter eine eindeutige proportionale Abhängigkeit der Strahlenbeschädigung mit zunehmender Strahlendosis auf.

Das Comet-Assay-Verfahren konnte somit in einem Teil seiner Auswertungsparameter (gesamte Fläche/ Intensität der Kometen) DNA-Brüche bzw. hervorgerufene Strahlenbeschädigung in einem Intervall von 0,5 kGy feststellen; es ist aber nicht möglich, nach Länge bzw. Intensität des Schweifs klare Aussagen zu machen.

Die verwendeten Strahlendosen sind in Schritten von 0,5 kGy ausgewählt, welche die Strahlungsanlage (LINAK) leisten konnte. Das kann natürlich bei Interesse an der genaueren Verfolgung von Strahleneinfluss und Korrelation (Korrelation von Strahlungseinfluss und dessen Veränderungen) ein Problem darstellen, wobei die Strahlendosis 3 kGy das Limit der Methode darstellte. Denn die bestrahlten Proben mit 3 kGy waren zwar auf dem Glasobjektträger mikroskopisch zu sehen, lagen jedoch durch totale Beschädigung nicht in einer ausreichenden Menge vor - es sollten mindestens 50 zufällige Zellen auf dem Slide- Test erfassbar sein), so dass man mit dieser Methode eine weitere (ab 3 kGy aufwärts) ausgewertete Aussage treffen bzw. vertreten kann.

Insofern erwies sich, dass eine Aussage für bestrahlte frische Knoblauchzehen mit Hilfe des Comet-Assay-Verfahrens möglich ist, während eine Abhängigkeit unter den bestrahlten Proben mit zunehmender Strahlendosis teilweise hergestellt werden kann. Somit kann man dieses Verfahren als Semi-Messverfahren in diesem Zusammenhang einordnen und als neue Methode für den Nachweis von ionisierendem Strahleneinfluss auf Knoblauch neben den klassischen chromatographisch basierten Analysen einsetzen.

Nicht weniger wichtig sind die zahlreichen Comet-Assay-Applikationen im Bereich der Toxikologie und Umweltmedizin, wo dieses Verfahren als eine der viel versprechenden Methoden für den Nachweis von Nekrosen bzw. toxische Effekte gilt (Faust F et al. 2004, Mersch-Sundermann V, Lu WQ 2002). Die Methode wird selbst für den Nachweis der chemopräventiven Effekte zahlreicher pflanzlicher Rohextrakte eingesetzt, wie z.B. die proapoptotische Wirkung von Diallyldisulfid (DADS) als stark riechendem Sekundärpflanzenstoff im Knoblauch (Wu X, Kassie F, Mersch-Sundermann V 2005).

#### **4.2.1.2 Strahlungseinflüsse auf den gesamten Gehalt von Ammoniak und Cysteinsulfoxiden mit Hilfe des FIA-Messverfahrens sowie auf Alliinase im Vergleich mit anderen Behandlungen in ähnlichen Untersuchungen aus der Literatur**

Vier Knoblauchausführungen (frisch, Granulat, Pulver, Chips) sind auf den Einfluss unterschiedlicher Strahlendosen untersucht worden.

Mit dem in dieser Arbeit neu entwickelten Biosensor konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass es einen signifikanten Unterschied zwischen mit 1 kGy bestrahltem und unbestrahltem frischem Knoblauch sowie Knoblauchchips gibt. Dieser Nachweis erfolgte über das Nachspüren von zwei Indikatoren, nämlich des Ammoniakgehalts und des gesamten Gehalts der Cysteinsulfoxide in den Proben.

Offensichtlich sanken beide Indikatoren bei der nächst höheren Strahlendosis (1 kGy) um 25%. Dies erfolgte erwartungsgemäß bei den Proben, in denen mehr Wasser enthalten war, nämlich in den frischen Zehen und den Chips. Eine proportionale Abhängigkeit von zunehmender Strahlendosis und Abnahme des CS-Gehalts war für Chips und frische Knoblauchproben erkennbar, wobei sich bei 5 KGy ein deutlicher Verlust von etwa 50% CS einstellte (s. Abb. 3.23 Ergebnis).

In den anderen Knoblauchformen (Pulver, Granulat) konnte hingegen kein Unterschied zu den unbestrahlten Proben gezeigt werden. Hier könnte der Einfluss der Herstellungsverfahren (Pulverisierung, Granulat) jegliche erfassbare Änderung, die durch Bestrahlung verursacht werden könnte, überlappen und unterdrücken. Allein die Absenkung des CS-Gehalts und des damit verbundenen Abbaus der Sulfhydrylgruppen bei unbestrahlten Proben von Chips und Pulver erklärt neben dem Wassergehalt den Unterschied, der in keinem Fall bei 70% lag, den degenerativen Einfluss des Pulverisierungsprozesses (mechanisch und Temperatur, Redoxidation usw.).

Hieraus lässt sich folgern, dass die thermische Behandlung von Knoblauch viel aggressiver auf den Gehalt der sulfhydrylhaltigen Aminosäure wirkt als die Bestrahlung. Außerdem ist bedeutsam, dass der Gehalt an CS in Chips-Form viel höher ist, als bei den anderen Formen festgestellt werden konnte. Somit sind Chips

als Vorstufe der weiteren Verarbeitung denkbar. Dies bedingt allerdings, dass die Alliinase nach der Knoblauchchipsherstellung möglichst wirksam erhalten bleibt. Sie konnte sich jedoch trotzdem als schonend herausstellen. (Ergebnis Abb. 3.24).

Über die unterschiedliche Wirkung von Behandlungen auf die Wirksamkeit von Knoblauch berichten Beiträge in der Literatur; z.B. Song und Milner 1999 stellten bei einer mehrstufigen Studie fest, dass eine Behandlung von Knoblauch mit unterschiedlichen Verfahren, wie durch konventionelles Erhitzen und Mikrowellen, zu einer signifikanten Abnahme der Bioaktivität und der Wirkung als Antikarzinogen des Knoblauchs führte sowie eine massive Abnahme der Alliinase-Aktivität von bis zu 90 % für je 10 Sekunden Erhitzung durch Mikrowellen bewirkte. In der vorliegenden Arbeit wurde durch ionisierende Bestrahlung von 6 kGy die totale Hemmung der Alliinaseaktivität in frischen Knoblauchproben erreicht, hingegen eine kaum nachspürbare Desaktivierung der Alliinase bei den Pulver- und Granulatproben.

Auch O’Gara et al. 2000 berichteten über die antimikrobielle Wirkung von Diallyldisulfonate aus Knoblauchpulver sowie aus Knoblauchöl und die darin enthaltenen Sulfuratome wie Allicin (6 µg/ml) als Antibakterium gegen die chronische Helicobakter Pylori- Krankheit. Über die von Knoblauchpulver offenbarte Reduktion der Bindung zwischen 7,12-dimethylbenz[a] anthracene-, als induzierten Mammary Tumoren (DMBA) und DNA (DMBA-DNA), haben Liu et al. 1992 berichtet.

Wie ultraviolette Strahlung und Erhitzen bzw. Lagerung den Knoblauch und seine antimikrobielle Wirksamkeit mindert bzw. unterdrückt, wird in Studien wie bei Al-wali und Saloom et al. 2007 berichtet (Antimikrobielle Aktivität wird bei 100 °C für 30 min. total ausgeschaltet).

Auf der anderen Seite sind viele Arbeiten über die sensorischen sowie hochwertigen Stoffänderungen wie Vitamine veröffentlicht worden, wie z.B. bei Croci et al. 1994, die durch Lagern von bestrahlten und unbestrahlten Zwiebeln (*Allium cepa L*) über 300 Tage eine deutliche Abnahme der Karbohydrate sowie Ascorbinsäure in den unbestrahlten Proben feststellen konnten. Es offenbarte sich jedoch keine relevante Beeinträchtigung der sensorischen Eigenschaften bei Osvaldo et al. 1994.

Einige Untersuchungen über den Einfluss von Bestrahlung auf die Antioxidationspotenz sowie die sensorischen Eigenschaften in Knoblauchpulver wurden durchgeführt, z.B. bei Eiss Mi 1983, wobei gezeigt werden konnte, dass selbst bei 30 kGy keine Änderung in der Antioxidationspotenz zu spüren war. Es wurde aber eine sensorische Änderung bei 10 kGy nach sechs Monaten Lagerung, wie z.B. leichte Verdunkelung, nachgewiesen, die jedoch bei 3,0 bis 4,5 kGy nicht auftrat. Hierzu wurden Grenzwerte je nach Gut bestimmt und entsprechend von der *International Atomic Energy Agency* (IAEA) für den Weltmarkt angeordnet.

So dürfte beispielsweise Knoblauchpulver nicht über 10 kGy bestrahlt werden. Für Zwiebeln oder Knoblauch als Speicherorgane sowie Kartoffeln werden zur Keimungshemmung lediglich 0,05-0,15 kGy benötigt (WHO 1994, Diel 1995) (Tab. 4.2. sowie Tab.1.1 in der Einleitung).

<b>TAB.4.2</b> DOSIS-GRENZWERTE (T.D) FÜR AROMA-ÄNDERUNG IN TROCKENEN GEWÜRZEN NACH ///FARKAS, 1988//	
Grenzwert für sensorische Änderung (kGy)	Produkte mit Grenzwert für die diese Dosis
5 < T.D. < 10	Kardamom, Chili, Koriander, Kreuzkümmel, griechisches Heu, Ingwer, Knoblauchpulver, Zitronenschale, Majoran, Senfsamen, Orangenschale, Paprika, weißer Pfeffer, Gelbwurz
> 10	Basilikum, Kümmel, Cayennepfeffer, Selleriesamen, Zimt, Curry, Dill, Majoran, Senfsamen, Muskatnuss, Zwiebelpulver, Paprika, schwarzer Pfeffer, weißer Pfeffer, roter Pfeffer, Salbei, Thymian, Gelbwurz
> 15	Jamaikapfeffer, Nelken, Paprika, Wacholderbeeren, schwarzer Pfeffer

Während zahlreiche Untersuchungen die Hemmung der pharmazeutischen Wirkung von Knoblauch bzw. seinen verfügbaren Formen (Öl, Saft, Pulver, Tinktur, usw.),

behandeln, die durch Bestrahlung oder durch Erhitzen verursacht werden könnten, ließ sich eine der vorliegenden Arbeit vergleichbare Untersuchung über den Einfluss von ionisierender Strahlung auf den CS-Gehalt in der Literatur nicht ausfindig machen.

Knoblauch als Pharmakon oder als Genussmittel verfügt über unterschiedliche Komponenten, die im Zusammenspiel und abhängig von der Darreichungsform unterschiedlich wirken können. Insofern gewinnen Untersuchungen unterschiedlicher Perspektiven immer ihre Bedeutung und ermöglichen somit auch ihre eigenen Schlüsse. Am Beispiel der vorliegenden Untersuchung über CS-Bestimmung durch FIA ließ sich eine neue Nachweismethode für bestrahlten frischen Knoblauch entdecken.

#### **4.2.1.3 Wirkung der Bestrahlung auf Makromoleküle (DNA und Protein)**

Die zugrunde liegenden Erkenntnisse über Veränderungen, **die durch Bestrahlung** erzielt wurden, sind in der Literatur je nach Studienziel häufig beschrieben worden. Hierzu werden in Kürze die Veränderungen in Proteinen und DNA anlässlich ihrer Bedeutsamkeit für die vorliegende Arbeit erläutert.

##### **4.2.1.3.1 Wirkung auf DNA**

Alle DNA-Veränderungen, die durch Bestrahlung hervorgerufen werden, können theoretisch nach der folgenden in der Literatur beschriebenen Formel berechnet werden:

$$X \text{ chemische Veränderung} = 10^{-7} * G * D * M$$

wobei M: Molekularmasse, D: Dosis in kGy, G: Zahl aller chemischen Veränderungen pro 100 e.V (oder pro Joule) absorbierte Energie bedeutet.

Bei pflanzlichen Geweben wie Knoblauch oder Zwiebeln sollte die DNA einer Zelle eine Molmasse von etwa  $10^{12}$  haben, während sie in tierischen Zellen wie bei Fleisch mit etwa  $10^9$  und bei Bakterien wesentlich geringer ist. Bei einer angenommenen Molmasse von  $10^9$  und einer Dosis von 10 kGy kommt es maximal zu 4000 Veränderungen in der DNA einer Zelle. Sie können bestehen aus:

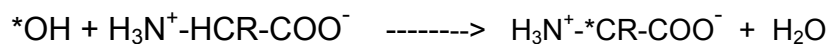
Basenmutationen, partieller Denaturierung, Vernetzung der DNA-Stränge und Strangbrüchen. Jede einzelne Veränderung, insbesondere aber die Doppel- und Einzelstrangbrüche, können zum Funktionsverlust oder Tod einer Zelle führen.

#### 4.2.1.3.2 Wirkung auf Proteine

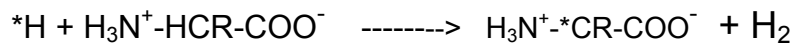
Die erfassten Strahlenwirkungen bei Cysteinsulfoxidgehalt als schwefelhaltiger Aminosäure in den untersuchten Proben bemessen sich chemisch nach den folgenden zugrunde liegenden Reaktionen.

Die Radiolyseprodukte des Wassers reagieren mit den Aminosäuren im Wesentlichen auf drei Wegen:

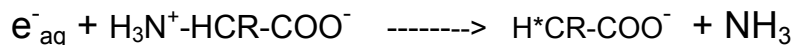
H-Abstraktion unter Bildung von Wasser:



H- Abstraktion unter Bildung elementaren Wasserstoffes:



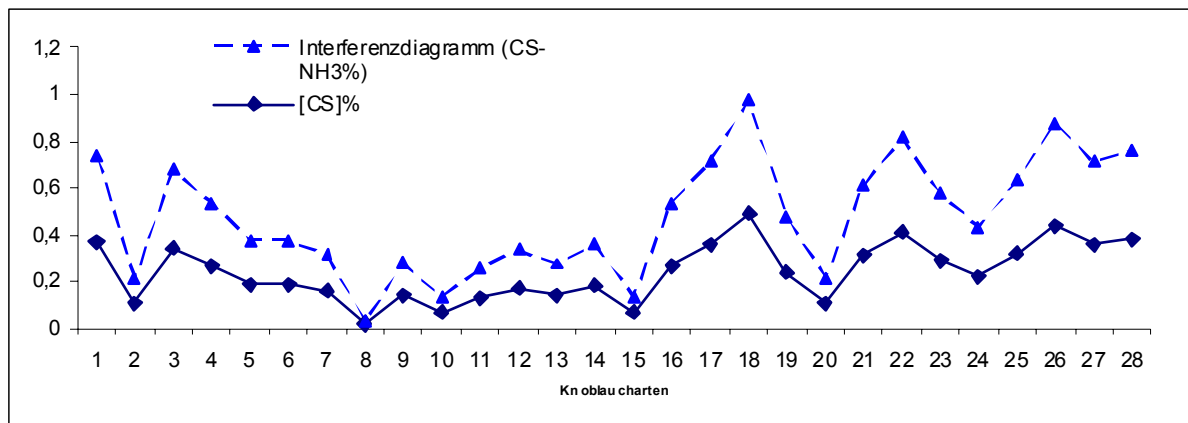
Reduktive Desaminisierung:



Die verfolgten Strahlungseffekte in dieser Arbeit beschränken sich neben den sensorischen Beobachtungen auf die Veränderung des gesamten Gehalts der Cysteinsulfoxide sowie des NH<sub>3</sub>-Gehalts, zumal das NH<sub>3</sub> nicht nur als Radiolyse-Produkt vorliegt, wie die Reaktion oben zeigt, sondern auch als Genuine im Zellplasma der untersuchten Pflanzenteile.

Um die Strahlungseffekte in diesem Zusammenhang zu verstehen, wurde zunächst eine Korrelation zwischen dem vorhandenen NH<sub>3</sub> (Genuine) und Cysteinsulfoxiden (CS) in einigen Proben (28 Knoblauchart aus Tab.3.10 siehe Ergebnisse) in ihrem Verhältnis zueinander grafisch verdeutlicht.





**Abb. 4.6** Grafische Darstellung der Abhängigkeit zwischen Genuinen  $\text{NH}_3$ - und CS-Gehalt in 28 verschiedenen Knoblaucharten.

Aus der Grafik ist zu sehen, dass der Gehalt an  $\text{NH}_3$  in 28 Proben aus unterschiedlichen Knoblaucharten jeweils parallel läuft. Das bedeutet, dass das Interferenzdiagramm, welches durch Abstrahieren des  $\text{NH}_3$ -Gehalts aus dem CS-Gehalt zustande kam, in seinem Verlauf fast gleich bleibt, als ob es sich hier um die gleiche Menge an  $\text{NH}_3$  (Genuine) bei den jeweiligen Proben handelte. Daraus lässt sich auf ein proportionales Verhältnis zwischen dem CS- und  $\text{NH}_3$ -Gehalt schließen. Bei einer Bestrahlung von Protein bzw. Aminosäuren in einem Gut kommt es oft, je nach Dosis, zu einer Defragmentierung und Änderungen sowohl in grobem Maßstab, wie der Änderung der Sekundär- sowie Tertiärstruktur, als auch auf der Ebene der Peptide oder der einzelnen Aminosäuren, wie z.B. in der obigen Reaktion gezeigt (Diehl 1995).

Aromatische sowie sulfidhaltige Aminosäuren sind meistens für eine Bestrahlung besonders empfindlich, und diese Empfindlichkeit ließ sich für die verwendeten Strahlendosen bei den untersuchten Proben unter anderen Studien erweisen, wie in den kommenden Absätzen beschrieben.

Alle untersuchten Probenvarietäten zeigten Strahleneffekte, insbesondere Proben aus frischem Knoblauch sowie Chips (Abb. 3.23 Ergebnisse). Der grafische Verlauf der Strahleneffekte mit zunehmender Strahlendosis hat sich auch im Vergleich durch das oben (Abb.4.6) erklärte Verhältnis zwischen  $\text{NH}_3$  und CS bestätigt. Das bedeutet, dass bei steigendem CS-Gehalt  $\text{NH}_3$  parallel anfällt, und umgekehrt, bei Abnahme der CS nach Bestrahlung auch das  $\text{NH}_3$  abnahm.

Die durch Bestrahlung entstehende Veränderung des CS-Gehalts wurde in der Literatur nicht als zu hoch bewertet. Man hat sich, wie in den vorhergehenden Absätzen beschrieben, oft auf die sensorische Veränderung und die Änderung der pharmazeutischen oder schonende Wirkung beschränkt. Gyawali R. et al. 2006 hingegen konnten an getrockneten Zwiebeln durch Gaschromatographie, GC-MS-Kopplung und Gamma-Strahleffekten bei 35 flüchtigen Stoffen mit größtenteils S-haltigen Komponenten (84,43 %) zeigen, dass eine Abnahme des S-Komponentengehalts von 12- 25% bei 1- 5 kGy und lediglich etwa 6 % bei Dosis 10 und 20 kGy erfassbar war. Hingegen ist bei ihm eine Zunahme der gesamten volatilen Klassenstoffe von 31 auf 24 % jeweils verzeichnet.

Währenddessen wurde bei Farkas 1985 von einer Zunahme der S-Komponenten von etwa 3 %, von 15,25 % auf 18%, bei 7,5 und 10 kGy berichtet sowie auch nach Variyar et al. 1998 in Zwiebelpulver Gleiches der Fall war. Farkas 1985 und Variyar et al., 1998 berichteten ebenfalls, dass sie erst bei 7,5 – 10 kGy eine Änderung bei volatilen Komponenten nachspüren konnten. Bei Arnault et al. 2000 wurden S-Komponenten in Zwiebelpulver wie Propyl Thiosulfonate und Demethyl Thiophene als wichtige Stufen des Aromas beschrieben und eine Zunahme von bis zu 23,48 % festgestellt.

Mit den oben besprochenen Arbeiten lässt sich das Verhalten der festgestellten Verläufe des hier untersuchten CS-Gehalts in Knoblauchvarietäten recht gut vergleichbar machen. Denn einerseits waren die Strahleneffekte gleich bei der ersten Strahlendosis von 1 kGy erfassbar. Andererseits ist die proportionale Zunahme der CS bei einem Maximum von 26 % und einem  $\text{NH}_3$ -Gehalt von 24% bei 3 kGy im Granulat bestätigt worden und ähnelt somit den Befunden bei Arnault 2000. Ebenso ähnelt die beobachtete Schwankung bei Proben aus Chips und frischem Knoblauch den erzielten Ergebnissen bei Gyawali R. et al. 2006, und zwar bezüglich der gesamten Abnahme der CS, ausgehend von der Kontrollprobe, sowie bezüglich des unterschiedlichen Verhaltens des CS-Gehalts innerhalb des Strahlungsbereiches. Wie bei Frischproben ist jeweils zunächst eine Abnahme von 47 bzw. 52 % CS bei 1 bzw. 1,5 kGy gemessen und mit weiter erhöhter Dosis hingegen eine geringere Abnahme als zuvor erzielt worden, also 32 % bei 3,5 kGy. Bei 6 kGy wurde wiederum ein linearer Abfall des CS bis etwa 70 % als höchste verwendete Strahlendosis erreicht.

Nach der aufgeführten Diskussion der Strahleneffekte auf Aminosäuren bzw. den Inhalt einer Materie wie Knoblauchzwiebeln mit Blick auf bestimmte Komponenten steht fest, dass eine Freisetzung bzw. Degenerierung in einer Weise dazu beiträgt, den Gehalt an CS bzw. an  $\text{NH}_3$  je nach Strahlendosis zu fördern. Diese Weisen können sehr unterschiedlich sein. Am wichtigsten ist die Fragmentierung oder Änderung der Konfigurierung eines Proteins wie in den erzielten Ergebnissen in dieser Arbeit unter Abb. 3.24 (Indiz ist die Degradierung der Aktivität, s. Ergebnisse), was direkt oder indirekt zu einer Erhöhung der S-haltigen Ausbeute in der Probe führt. Bekannt ist für den Knoblauch, dass Cysteinsulfoxide in verschiedenen Formen in Zellen der Knoblauchpflanze deponiert sind, die entweder frei in der Zelle schweben oder frei gemacht werden können. Ein Beispiel ist die Nachbildung von Cysteinsulfoxiden aus den bekannten Gamma Glutanyl-Derivaten, die durch Bestrahlung unter bestimmten Bedingungen gefördert oder gehemmt werden kann.

### **Fazit**

Ein neues System und eine neue Methode zur Erfassung von Strahleneffekten in Knoblauch in verschiedenen Varietäten (Pulver, Granulat, frisch, Chips) bezüglich des CS-Gehalts, des  $\text{NH}_3$ -Gehalts sowie auch über die Kombination mit der Hemmung der Enzymaktivität und DNA Comet-Assay-Test als Sicherung der spezifischen Nachweisbarkeit der Bestrahlung, insbesondere für Proben aus frischem Knoblauch, wurden hier erstmalig angewandt. Ebenso konnte die Methode für den Strahlennachweis bei S-haltigen Lebensmitteln umgesetzt werden.

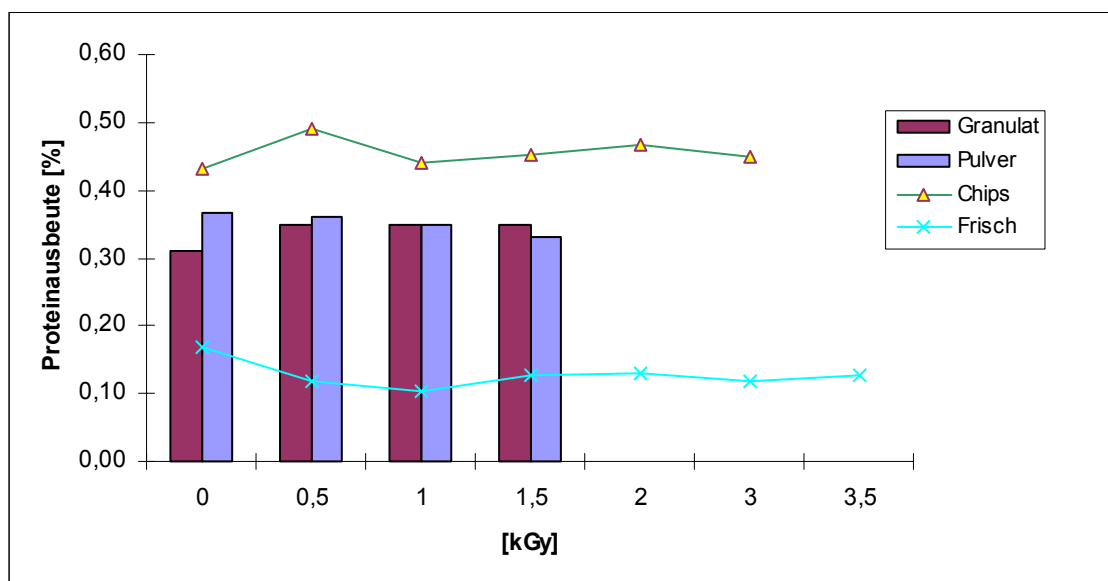
Das FIA-System zeichnet sich aus durch Geschwindigkeit, Einfachheit und Umweltfreundlichkeit der Analyse (lediglich wässrige Lösungen, nicht toxisch wie bei organischen Lösungsmitteln, die unverzichtbar sind in anderen Analysenanlagen) und kann bei relativ kleinen Strahlendosen ab 1 kGy eine Bestrahlung nachspüren.

Bestrahlter Knoblauch erwies eine maximale Zunahme von 26 % CS und 24%  $\text{NH}_3$  bei 3 kGy in Granulat, hingegen 70 %, maximale Abnahme CS und  $\text{NH}_3$  bei 6 kGy frisch und 61% CS in Chips.

#### 4.2.2 Vergleich der spezifischen Aktivität der Alliinase mit dem Proteingehalt unter Strahlungseinfluss sowie mit der Lagerungszeit

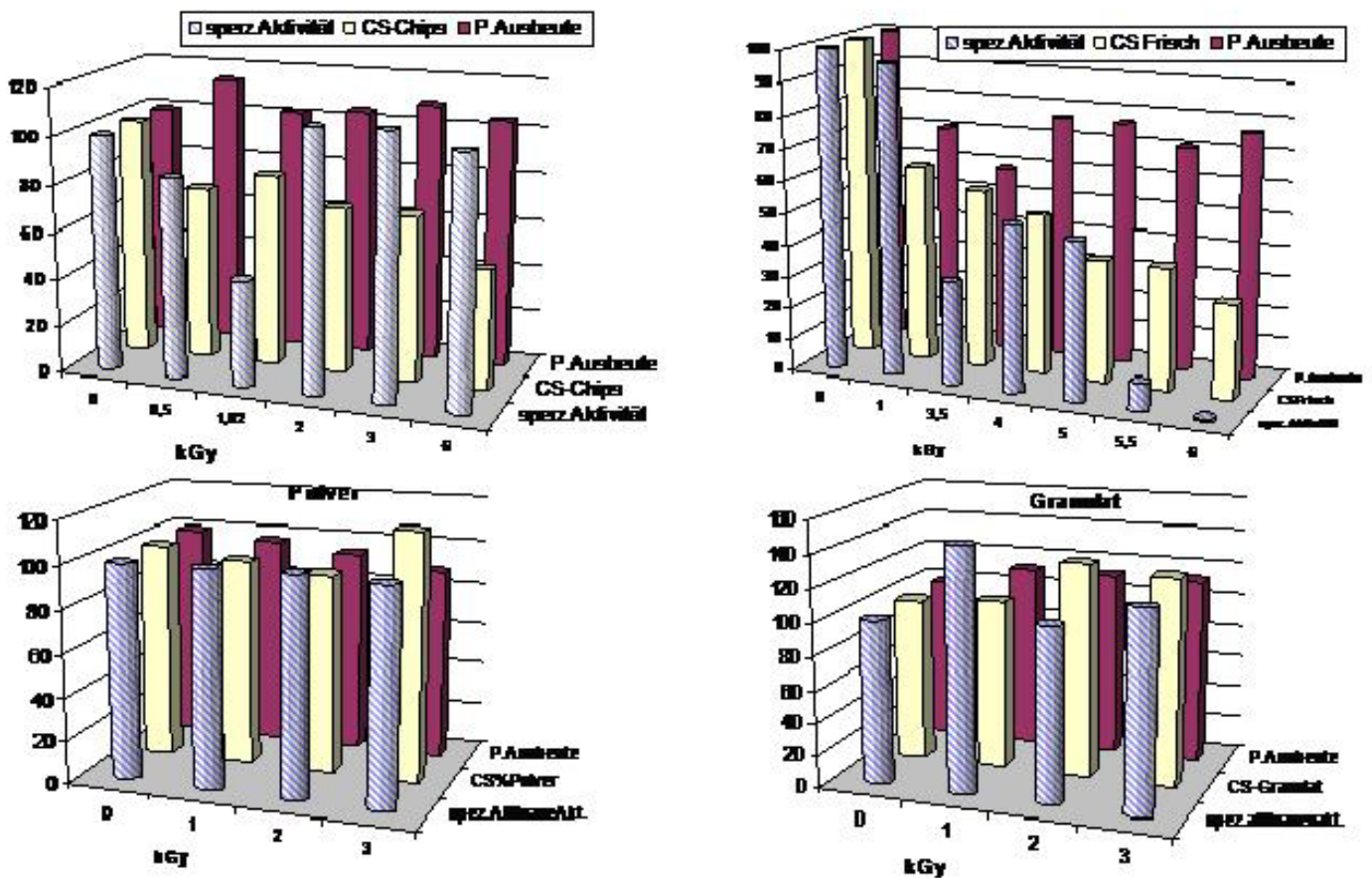
Bei den vier untersuchten Knoblauchvarietäten wurde festgestellt, dass Proben aus frischem Knoblauch die höchste und schnellste Veränderung der Alliinaseaktivität gezeigt haben. An nächster Stelle stehen Chips und Granulat, gefolgt von Pulver, bei dem kaum eine Veränderung der Aktivität gemessen werden konnte.

Um zu zeigen, in welchem Verhältnis der Proteingehalt und die Aktivität der Alliinase unter Strahleneinfluss zueinander stehen, ist zunächst eine Vergleichsdarstellung des Proteingehalts in den vier Varietäten gegen die steigende Strahlendosis in Grafik 4.7 abgebildet. Dabei lässt sich herausstellen, dass der Proteingehalt zwar in den unterschiedlichen Varietäten bei Chips mit etwa 0,43 g pro 100 g am höchsten liegt. Bei frischem Knoblauch jedoch ist er am geringsten und liegt bei 0,17 g/100 g Pflanzenmaterial für die unbestrahlten Proben, während Granulat und Pulver jeweils im mittleren Bereich dazwischen, bei 0,31, 0,37 % (bezogen auf die Materialeinwaage), lagen. Wenn man diese bei unbestrahltem Zustand mit deren Verlauf bei steigenden Strahlendosen vergleicht, stellt man lediglich eine geringfügige Änderung fest.



**Abb. 4.7** Änderung des Gesamtproteingehalts in den Knoblauchvarietäten (Frisch Granulat, Pulver, Chips) mit zunehmenden Strahlendosen

Um die festgestellte Veränderung der Alliinaseaktivität mit dem Verlauf des Proteingehalts zu veranschaulichen, sind die vier untersuchten Varietäten mit ihrer spezifischen Alliinaseaktivität und dem Verlauf des CS-Gehalts ebenso in jeder Ausführung gegen den Strahleneinfluss auf 100 (Kontrolle 0 kGy) normiert und verglichen dargestellt.



**Abb. 4.8** Vergleich der Proteinausbeute mit der spez. Aktivität der Alliinase und dem CS-Gehalt bei steigender Strahlendosis in Knoblauch Chips, Pulver, frisch, Granulat, jeweils diagonal nach unten rechts betrachtet [Z-Achse stellt die Reihe in die Tiefe gehend spez. Akt., CS, Proteinausbeute als tiefste dar].

Aus der Darstellung ist für frische Proben ersichtlich (oben rechts), dass die spezifische Aktivität, welche in den gestreiften Zylindern in den vorderen Reihen der jeweiligen Grafik präsentiert ist, mit der jeweiligen Proteinausbeute korreliert. Denn der Vergleich mit dem Ausgangswert zeigt (0kGy) im Laufe des Abfallens des CS-Gehalts ebenso einen Abfall der spezifischen Aktivität und geht wiederum bis 3,5 kGy mit Abfall der Proteinausbeute einher, wobei Letztere mit steigenden Dosen in

die Gegenrichtung wieder ansteigt. Dieses Verhalten der drei beschriebenen Parameter kann so erklärt werden, dass die durch Bestrahlung aufgenommene Energie in einer so wasserreichen Materie wie den frischen Knoblauchzwiebeln (etwa 70 % Wasser) in der Lage war, einige Schädigungen so einzurichten, dass einerseits der Zugang von Alliinase zu den Cysteinsulfoxiden intrazellulär begünstigt wird und demnach mit steigender Strahlendosis ein Abfall des CS-Gehalts veranlasst wurde. Andererseits kann eine direkte Abspaltung der S-haltigen Komponenten verursacht worden sein, zumal S-Komponenten besonders strahlungsempfindlich sind (Gyawali R 2006). Die Schwankung der Proteinausbeute kann durch die Änderung der Entfaltung der Proteine zustande kommen, welche sich mehr oder weniger günstig auf die Interaktion mit den Kupfer-Ionen auswirkt, die als Basisprinzip bei der Lowry Proteinbestimmungsmethode fungieren.

Bei den anderen Varietäten (Pulver, Granulat, Chips) bleibt die Proteinausbeute, verglichen mit den gemessenen Aktivitäten, jeweils relativ stabil. Es offenbart sich bei den verwendeten Strahlendosen (1-3 kGy) und den Proben mit geringerem Wassergehalt von etwa 4 - 6,3 bzw. 7,6 % kein aggressiver Einfluss auf den Proteingehalt, sondern es wird mit großer Wahrscheinlichkeit, je nach Wassergehalt, die Freisetzung einiger deponierter Peptide oder proteinbindender Cysteinsulfoxide begünstigt, wie bei Pulver und Granulat zu vermuten ist, nicht jedoch bei Chips (Wassergehalt 7,2%). Diese Beobachtung kann als bedeutsames Ergebnis für die Optimierung der Ausbeute von Cysteinsulfoxiden aus Knoblauch genutzt werden, analog zur bekannten Förderung der Ausbeute bei bestimmten Bestrahlungen u. a. am Beispiel Orangensaft.

Um nun die folgende Frage zu beantworten, wie spezifisch die beobachteten Veränderungen der Alliinaseaktivität in der vorliegenden Arbeit sind, wurden hier einige Fakten zusammengestellt. Beim frischen Knoblauch wurde eine Steigung von -16 notiert; dies kann bei einer Lagerung nicht auftreten. Zahlreiche Arbeiten berichten über Stabilität der Alliinase (Gahdermarzi et al. 1999, Waley 1985, Krest 2000) bei konventioneller Lagerung, jedoch selten bzw. nie über Strahleneinfluss. Selbst nach einer diesbezüglichen Recherche in bestrahlungsspezifischen Fachbibliotheken lässt sich eine solche nicht ausfindig machen. In der Arbeit von Krest 2000 wurde interessanterweise die gleiche Methode und Apparatur zur

Vermessung der Alliinaseaktivität verwendet, was natürlich für den Vergleich von einiger Bedeutung ist. Dabei wurde gezeigt, dass die Alliinase nach einer Lagerungszeit von 500 Tagen keine Abnahme der Aktivität verzeichnete. Dies bedeutet, dass eine Absenkung der Alliinaseaktivität nach ihrer Bestrahlung bei 6 kGy auf 0 und bei 1 kGy auf 75 % der Aktivität als Verlust verzeichnet wurde, wohingegen solches weder bei einer Lagerung passierte, noch bei einer Sonnenstrahlung zu erwarten ist. Somit ist die Aktivitätsänderung in diesem Zusammenhang als spezifische Änderung zu erklären.

Bei den anderen Varietäten hingegen wurde beim Pressen von Knoblauchpulver zwecks Tablettenherstellung ein Verlust der Aktivität von 15 % beobachtet, während sich jedoch bei Pulver, mit 0,5 kGy behandelt, keine Änderung zeigte. Jedoch wurde bei gleicher Strahlendosis eine Zunahme der Aktivität um 45% bei Granulat registriert und für Pulver bei 1 kGy 10% über dem Ausgangswert notiert. Chips verlieren nach der Bestrahlung mit 1 kGy 65 % ihrer Aktivität (s. Abb. 3.24, Kapitel Ergebnis).

Daraus folgt,

dass die beobachteten Strahlungsveränderungen bei den Knoblauchvarietäten doch spezifisch waren.

Knoblauchpulver kann als bestgeeignete Quelle der Alliinase gelten, da die Alliinaseaktivität sich kaum veränderte und ebenso sein Gehalt an CS stabil blieb. Insofern kann diesbezüglich problemlos mit 1, 2 und 3 kGy bestrahlt und besser haltbar gemacht werden, zumal mit keiner anderen Konservierungsmethode, unter Beibehaltung der sensorischen Parameter, Würmer oder mikrobielle Belastungen ausgeschlossen werden können. Bestrahlung mit höheren Dosen soll natürlich weiter untersucht werden, zumal die AEIA und die Codex Alimentarius Kommission (2003) bis 10 kGy für pulverisierte Produkte erlaubt. Seit dem 21.12.2000 ist die Bestrahlung von getrockneten aromatischen Kräutern und Gewürzen in Deutschland (wie in der gesamten EU) bis zu einer Gesamtdosis von 10 kGy erlaubt (AOAC 1990). Damit wurden die EG-Richtlinien 1999/2 und 3 in nationales Recht umgesetzt.

### **4.2.3 Eiklar-Bestrahlung**

Um einer Behandlung von Eiklar mit ionisierender Strahlung auf die Spur zu kommen und einen möglichen Wirkungsnachweis zu erschließen, wurden hierzu zwei Techniken entwickelt und in diesem Zusammenhang angewandt. Dabei wurde eine Auftrennungsmethode über die Kapillarelektrophorese mit unterschiedlichen Trennungsprinzipien entwickelt und verwendet. Ebenso wurde die MIR-ATR Spektroskopie als Schnell-Scanverfahren diesbezüglich eingesetzt.

Mit Hilfe der vorstehenden Techniken wurden zunächst vier unterschiedliche Varietäten von Eiklar zur Untersuchung herangezogen:

1-Eiklar-Pulver, 2-Eiklar flüssig, frisch, 3-Eiklar pasteurisiert, 4-Eiklar flüssig, gelagert in 4 °C. Alle Proben, wie in den entsprechenden Kapiteln ausführlich beschrieben, wurden bei etwa 4 °C in Plastiktütchen mit < 1 cm Dicke eingeschweißt, mit unterschiedlichen Dosen zwischen 0 und 10 kGy bestrahlt und nach Portionierung bis zur Analyse in -20 °C aufbewahrt. Nachfolgend werden die erzielten Ergebnisse je nach verwendeter Methode erörtert bzw. diskutiert.

#### **4.2.3.1 Kapillarelektrophorese und Eiklar**

#### **4.2.3.2 CE - Vorteile und Methodik**

Als relativ neue und schnelle Technik mit vielen Vorteilen gegenüber anderen analytischen Systemen, chromatographisch, wie u.a. HPLC oder die klassische Gelelektrophorese, hat man vorgesehen, diese Technik für den Nachweis von Bestrahlungen von Proteinen heranzuziehen. Neben dem Interesse an einem Nachweis von bestrahltem Eiklar an sich als Produkt wurde Eiklar in dieser Studie zunächst als einfaches Muster für seinen hohen Gehalt an Proteinen gewählt und mit Hilfe der CE untersucht.

Man kann mit Hilfe der CE neben Ausschluss vieler Umständlichkeiten wie Markierungen und Auflösungen von auf Gelen getrennten Banden und allen möglichen toxischen chemischen Lösungen, einfach mit kleinen Injektionsvolumina



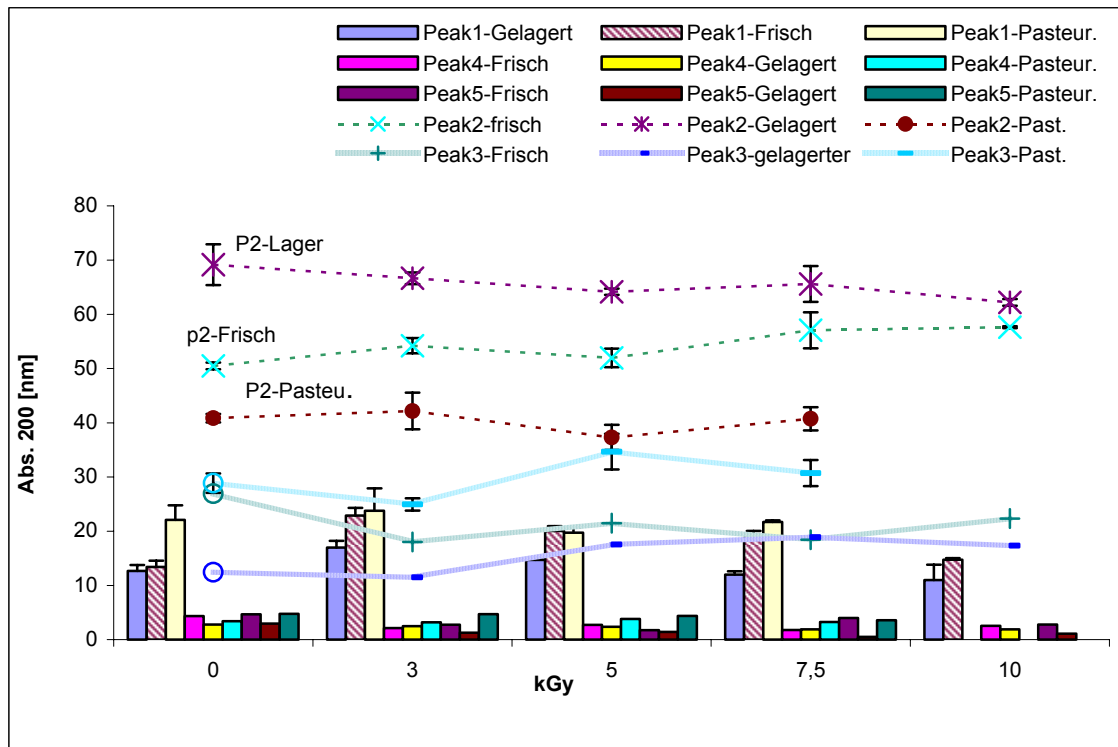
(20  $\mu\text{L}$ ) und wässrigen Puffern bei 10facher HPLC Empfindlichkeit arbeiten. Allein für Protein-Auftrennung bietet CE vielfältige Methoden. Angefangen mit CZE über CGE, CIEF über DSCE, MEKC, ist es ein vielfältiges analytisches System.

Alle diese Methoden erfolgen in einer Kapillare, die je nach Anwendung mit einem inneren Durchmesser zwischen 25 und 120  $\mu\text{m}$  und einer Länge bis 100 cm ausgewählt werden kann. Hier nun, im Rahmen dieser Arbeitszeit und der zur Verfügung gestellten Finanzen, wurden lediglich zwei Methoden für das Vorhaben erprobt, CZE und CGE.

Für die Verwendung der beiden Methoden wurden zunächst Soft- und Hardware des Geräts in Gang gebracht und langwierige Probleme (Art der Injektion, Runvoltage usw.) überwunden, etabliert und die verwendeten Auftrennungsmethoden der Eiklarproteine entwickelt bzw. die Laufbedingungen, wie im Kapitel „Material und Methoden“ erläutert, empirisch erzielt.

#### **4.2.3.3 Vergleich der CE getrennten Eiklar- Varietäten**

Mit Hilfe der CZE-Methode konnte man zwar auf die Spur der Strahlungsveränderungen bei den Varianten „flüssiges frisches und gelagertes Eiklar“ kommen, aber, insbesondere bei den letzten unidentifizierten Peaks (Peak 3, Peak 4, Abb.3.28-1 und 2) und Peak 1 bei flüssigem, frischem Eiklar mit 3 kGy (Abb.3.27), konnte kein spezifischer Nachweis über die Auftrennung der erwähnten Varianten erzielt werden. Dies lässt sich besser veranschaulichen, wenn man die drei vergleichbaren Elektropherogramme bzw. die ausgewerteten Peaks des flüssigen frischen, des gelagerten und des pasteurisierten Eiklars zusammen grafisch vergleicht.



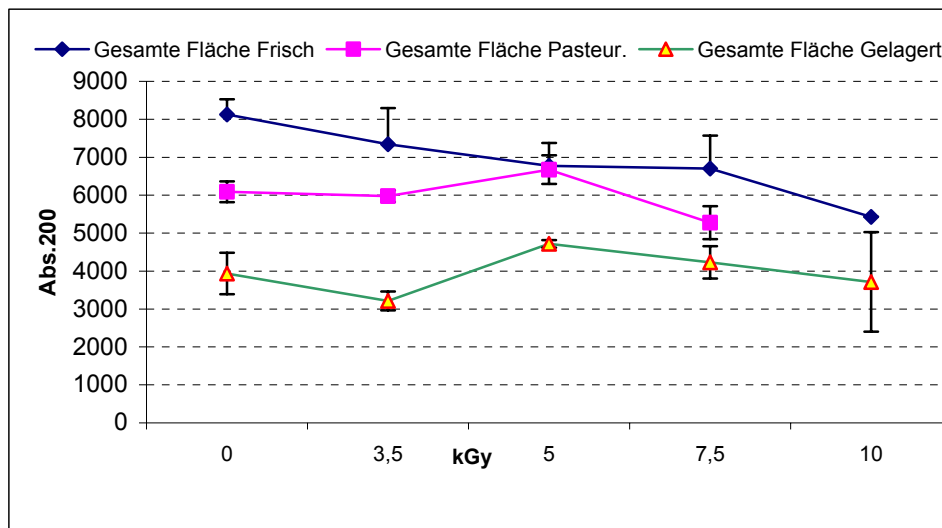
**Abb. 4.9** Änderungsvergleich der Peaks 1 bis 5 mit ansteigenden Strahlendosen in den Eiklarvarietäten. Die ersten drei Balken links repräsentieren Peak 1 aus gelagertem, frischem, pasteurisiertem Eiklar jeweils, gefolgt von den drei Balken des Peak 4 anschließend Balken des Peak 5 der jeweiligen Varietäten in derselben Reihenfolge.

Die Unterschiede in der UV-Absorption zwischen den einzelnen Peaks in den unterschiedlichen Varietäten des Eiklars sind hierzu in unterschiedlichen Darstellungstypen der jeweiligen Varietäten-Peaks gegen die Strahlendosis aufgetragen und dargestellt. So sind z.B. Peak-1 im ersten Balken (links), Peak-2 in punktierten Linien, Peak-3 in stetigen Linien, Peak-4 die nächsten drei Säulen (rechts), dann Peak-5 weiter rechts in positiver Richtung der X-Achse abgebildet. Dabei stellte sich heraus, dass es schon bei 0 kGy, also unbestrahlt, eine unterschiedliche UV-Absorption gibt.

Zunächst zu dem Unterschied zwischen dem pasteurisierten und dem gelagerten sowie dem frischen Eiklar: Die Abbildung zeigt bei 0 kGy, also unbestrahlt, dass Peak-1 (in Balken) bei den gelagerten Proben etwa 40% geringer ausfällt als bei den anderen Varianten. Während Peak-2 bei den pasteurisierten noch 30% unterhalb des gelagerten und 10% unterhalb des frischen Eiklars zu sehen ist, wobei auch Peak-3 (pasteurisiert) etwa 29% geringer ausfällt als der Rest, zeigten die frischen und die

gelagerten Proben dieselbe Absorption. Die Unterschiede bei steigender Strahlendosis werden im Ergebnis ausführlich beschrieben.

Die Unterschiede zu den bestrahlten Proben konnten jedoch nicht schlüssig genug gezeigt werden, denn die Änderung der UV-Absorption bei den bestrahlten Proben war sowohl nach Einzelppeakauswertung als auch nach gesamter Fläche nicht spezifisch genug, um sich von den anderen Varietäten unterscheiden zu können. Man konnte diesbezüglich zusätzlich, unter Berücksichtigung der Standardabweichung, wiederum die Überschneidung der Varietäten (pasteurisiert und frisch) in deren Darstellung für die Auswertung nach der gesamten Fläche der jeweiligen Elektropherogramme der Varietäten in Abb.4.10 entnehmen.



**Abb. 4.10** Vergleich der gesamten Flächenauswertung der Elektropherogramme von Eiklarvarietäten (Frisch, Gelagert, Pasteurisiert) mit steigenden Strahlendosen

### Schlussfolgerung

A - Die Lagerung und die Pasteurisierung haben unterschiedliche Wirkung auf die einzelnen Proteine des Eiklars. Man konnte über UV-detektierte CZE-Elektropherogramme diese Unterschiede ohne Isolierung und Reinigung bemerkbar machen, aber nicht als spezifischen Nachweis verzeichnen.

B - Mit CZE wurde auch über Mischungen nach möglicher Protein-Protein-Wechselwirkung gesucht, und man konnte recht gute Hinweise auf spezifische Nachweise für bestrahlte Proteine erhalten (Abb.3.32). Es sind jedoch weitere

Versuche für eine aussagekräftige Äußerung über die Spezifität der Bestrahlung in dieser Beziehung von Nöten.

C - Sehr interessante signifikante Ergebnisse konnten über CZE mit Laser induzierter Fluoreszenz-Detektion (LIF) erzielt werden: Es konnte eine Abnahme der Fluoreszenz bei mit 3 kGy bestrahltem flüssigem frischem Eiklar um 70 % des Ausgangswertes verzeichnet werden, was auch als ausschlaggebende neue Erkenntnis und Indiz gelten muss. Dies wurde jedoch bei pasteurisiertem und gelagertem Eiklar bisher nicht weiter untersucht.

#### **4.2.3.4 CGE Auftrennung:**

Hierzu konnte man nach der Proteinmasse die Proteine zunächst bei frischem flüssigem Eiklar auftrennen und einen neuen Peak mit der Molarmasse von Lysozym, sprich im Bereich von 15 bis 23 k Dal. entdecken. Der neue Peak nahm mit steigender Strahlendosis bis 100 % zu und war bei SDS deutlicher als bei Nativ-CGE.

#### **4.2.3.5 Bestrahlung von Eiern im Vergleich mit der Literatur**

Die hier erzielten Ergebnisse über die Kapillarelektrophorese sind von großer Bedeutung, da sie vielfältige Hinweise bzw. bedeutsame Indizien hinsichtlich der weiteren Orientierung für diesbezügliche Forschungsversuche gegeben haben, insbesondere die CZE-Analyse im Zusammenhang mit Protein-Protein-Wechselwirkung (Peak-3 verschwand) sowie mit dem Ergebnis einer durch laser-induzierten Fluoreszenz festgestellten Abnahme.

Nach hinreichender Literaturrecherche ließ sich bis dato keine vergleichbare Untersuchung über CE aufspüren.

Für den Nachweis von bestrahlten Eiern sind bereits, wie aus der Einleitung ersichtlich, Arbeiten in ausreichender Zahl veröffentlicht worden. Beginnend mit Fremdresten wie Mineralien bzw. Kalziten über Cellulose-Radikale aus der Schale des Eies bis hin zu deren Spuren in der Verpackung, die mit Hilfe der Elektronenspinresonanz-Spektroskopie (ESR) nachgewiesen werden, nämlich durch Nachvollziehen der strahleninduzierten Radikale (Helle N. et al. 1993). Ebenso werden Fettanteile aus dem Eigelb, nämlich über den GC-MS-Nachweis von 2-

Dodecylcyclobutanon oder bestimmte Kohlenwasserstoffe als Radiolyseprodukte betrachtet. Dies half jedoch selbstverständlich nicht im Falle des Eiklars an sich, da weder Fett noch Kalzite im Eiklar enthalten sind. Die Methode mit ESR ist einfach, und bis hinab zu Dosen von 100 Gy und geringer lässt sich die Bestrahlung nachweisen (Helle N. 1993).

Am Eiklar unmittelbar wurden auch ausreichend Methoden erprobt, die z.B. mikrobiologischer Art sind, nämlich darüber, wie reduzierte Gesamtkeimzahlen nach einer Bestrahlung festgestellt werden können. Dies sind aber wiederum Aspekte, die von vielen anderen Faktoren wie Lagerung und Temperatur stark beeinflusst werden können; somit bleiben solche Methoden nicht perfekt für einen Strahlungsnachweis geeignet (Alur MD 1991). Ebenso wurde in manchen Arbeiten behauptet, dass im Eiklar aus Tryptophan entstehende O-Tyrosine neue Radiolyseprodukte seien, die als Bestahlungsnachweise dienen können (Dizdaroglu and Simic 1980; Simic und de Graff 1981). Es ist jedoch in späteren Arbeiten doch O-Tyrosin über HPLC in unbestrahltem Eiklar gefunden worden (IAEA 1991, Kleeberg 2003). In dieser Arbeit bzw. Untersuchung am Eiklar direkt wurden die unterschiedlichen Verarbeitungsfaktoren und Behandlungen auch nicht berücksichtigt, und man konnte sie nicht als spezifische Nachweismethoden für Bestrahlung hinzuziehen. Einige umständliche Methoden, wie über anti-bestrahltes Ovalbumin hergestellte Monoklonale, wurden erprobt, wobei die gamma-induzierte Denaturierung über monoklonale Mausantikörper hergestellt und als Marker für die Identifizierung des Eiklars eingesetzt wurde (Masuda T. 2000). In unserer Studie jedoch wurde der Einfachheit halber in wässrigen freundlichen Puffersystemen die strahlungsinduzierte Veränderung angezeigt. Es ist zwar nicht spezifisch genug, aber die erzielten Hinweise sollten weiter erforscht werden, wobei Capillarelektrophorese und Flow injection analyser vielversprechend sind, um die entwickelte Fluoreszenz weiter zu beobachten.

Als Konsequenz aus den beobachteten Hinweisen auf Viskositätsänderung wurde in dieser Arbeit neben der CE-Methode ein weiterer Weg für einen Bestahlungsnachweis eingeschlagen, welcher in der Routinekontrolle eingesetzt werden kann, die MIR-ATR-Spektroskopie, die im folgenden Absatz diskutiert wird.

#### 4.2.3.6 MIR-ATR-Spektroskopie-Untersuchung für Eiklar

Es erscheint möglich, die pasteurisierten Proben durch Auswertung der MIR-Spektren von nicht behandelter Ware sowie von bestrahlten Proben mit Hilfe der ATR-Technik zu unterscheiden. Dies geht u.a. deutlich aus der Endauswertung mit der Hauptkomponentenanalyse in Abb. 9 hervor. Hierbei konnten sämtliche aufgenommenen Spektren in zwei Cluster eingeteilt werden. Ein Cluster wird durch die von den pasteurisierten Proben aufgenommenen Spektren gebildet. Der andere Cluster wird durch die Spektren gebildet, die von den unbehandelten und den mit 10 kGy bestrahlten Proben aufgenommen wurden.

Unterschiede bei der Filmbildungsgeschwindigkeit lassen sich wahrscheinlich durch eine Änderung der Eigenschaften der verschiedenen Inhaltsstoffe (Koaleszenz bzw. verminderte Solubilität) erklären (Margoshes 1990). Denn eine Filmbildung hängt mit dem Dispersionsgrad der Polymere und somit mit deren Verteilung in der Lösung zusammen.

Proteine als dominanter Bestandteil des Eiklars sind anfällig gegenüber thermischer Belastung. So könnten

- Deformationen der Proteinstrukturen,
- durch Hitze entstandene Aggregate, z.B. Ovalbumin-Aggregate (Nakamura et al. 1978),
- Zersetzungen der Proteine oder chemisch bedingte Härtungen (oxidativ oder durch eine andere Reaktion) bei einigen Aminosäuren oder Proteinen (Hank CR et al. 2001) aufgetreten sein.

Im Bereich der NH-Schwingungen bei 3600 bis 3200 sowie im Fingerprintbereich bei 1278 und 1252  $\text{cm}^{-1}$  sind erkennbare Unterschiede bei den pasteurisierten Proben im Vergleich zu den Kontrollproben zu erkennen.

Aus diesen Ergebnissen kann möglicherweise eine Standard-Methode für den Nachweis von pasteurisiertem Eiklar erarbeitet werden.

#### **Schlussfolgerung:**

Die unterschiedlichen Vorbehandlungen der Proben führen zu deutlich unterschiedlichen MIR-Spektren: Die Spektren der pasteurisierten Proben

unterscheiden sich von denen der unbehandelten und den mit 10 kGy bestrahlten Proben. Insbesondere im Bereich der NH- Schwingungen bei 3600 bis 3200  $\text{cm}^{-1}$  und im Fingerprintbereich bei 1390 sowie bei 1278 und 1252  $\text{cm}^{-1}$  sind Unterschiede erkennbar. Diese Unterschiede sind auch mit Hilfe einer Hauptkomponentenanalyse darstellbar.

Aus dieser Untersuchung ergab sich, dass mit Hilfe der MIR-ATR-Methode nicht ohne weiteres Unterschiede zwischen den bestrahlten und unbehandelten Eiklarproben nachgewiesen werden konnten.

(Eine Bestrahlung von Lebensmitteln wird bereits in vielen Ländern eingesetzt, z.B. bei Geflügel in den USA, Papayas in Südafrika, Froschschenkeln, Kartoffeln und Zwiebeln in China und Frankreich, Garnelen in den Niederlanden (Diehl JF. 1995).

#### **4.2.4 Bedeutung der Bestrahlung und gesetzliche Lage**

Als eine der neuen Konservierungsmethoden von Lebens- und Heilmitteln wurde der Bestrahlung in vielerlei Hinsichten (Abtötung von unerwünschten Mikroorganismen, Insekten, Krankheitserregern mit deren Übertragung von Infektionskrankheiten, Hemmung von vorzeitiger Reifung, Sprossung oder Keimung von Lebensmitteln) eingesetzt und über das Lebensmittel-, Bedarfsgegenstände- und Futtermittelgesetzbuch (LFGB) §8 in Deutschland und mit §13 LMBG mit den Ausnahmen nach §47a (Allgemeinverfügungen für Erzeugnisse aus anderen Mitgliedstaaten der EG) und Zulassung von Ausnahmen nach § 37 geregelt.

Demnach werden getrocknete aromatische Kräuter und Gewürze in der Lebensmittelstrahlungsverordnung mit einer maximalen durchschnittlich absorbierten Gesamtdosis von 10 Kilo Gray gekennzeichnet (mit ionisierenden Strahlen behandelt oder bestrahlt) und nach der Richtlinie von Februar 1999/2,3/EG europaweit sogar erlaubt, selbst wenn Teile dieser Bestrahlungen in weiteren verarbeiteten Produkten verwendet werden.

Seit dem 10. März 1997 gilt in der Bundesrepublik Deutschland eine „Allgemeinverfügung“ gemäß § 47a LMBG, nach der Gewürze gemäß Liste importiert werden dürfen, die

- in Frankreich rechtmäßig bestrahlt wurden,

- in einem Mitgliedstaat der EU oder Vertragsstaat des EWR legal in den Verkehr gebracht wurden,
- mittels Cobalt-60, Caesium-137, Elektronen mit bis 10 MeV Quantenenergie bestrahlt wurden,
- höchstens eine maximale durchschnittliche absorbierte Gesamtdosis von 10 kGy erhalten haben,
- für die gewerbliche Weiterverarbeitung bestimmt sind,
- in den Begleitdokumenten oder auf den Verpackungen insbesondere den Hinweis auf die Bestrahlung enthalten.

Währenddessen hat hier in Deutschland die Bestrahlung von Lebensmitteln in speziellen Anlagen mit ionisierenden Strahlen lediglich aus folgenden Quellen zu erfolgen:

- Gammastrahlen aus Radionukliden  $^{60}\text{Co}$  oder  $^{137}\text{Cs}$
- Röntgenstrahlen, die von Geräten erzeugt werden, die mit einer Nennenergie (maximale Quantenenergie) von fünf Megaelektronvolt oder darunter betrieben werden
- Elektronen, die von Geräten erzeugt werden, die mit einer Nennenergie (maximale Quantenenergie) von zehn Megaelektronvolt oder darunter betrieben werden.

In Europa werden Bestrahlungen durch die Richtlinien 1999/2 und 3 /EG des Europäischen Parlaments und des Rates vom 22. Februar geregelt und im Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften Nr. L 66 vom 13.03.1999, S. 16 bzw. 24, veröffentlicht.

#### **4.2.5 Bedenklichkeit der Bestrahlung und Kontrolle**

Die umfassenden Tierfütterungsversuche in zahlreichen Ländern lassen auf die gesundheitliche Unbedenklichkeit der Bestrahlungen schließen. Zudem war Deutschland mit 23 weiteren Staaten beteiligt, und es ergab sich demnach kein Hinweis auf ein gesundheitliches Risiko beim Verzehr bestrahlter Lebensmittel (Berichte von 1970-1982).



Im September 1997 wurden auf Vorschlag von Südafrika und den USA unter Beteiligung von WHO, FAO, und IAEO Sterilisierungen mit hohen Strahlendosen auf Risiko geprüft. Das Komitee kam zu dem Schluss: „*Die Lebensmittelbestrahlung an sich ist dermaßen sicher, dass die aktuellen Werte der Strahlendosis von sekundärer Bedeutung sind, solange die sensorische Qualität des Lebensmittels erhalten bleibt und die schädlichen Mikroorganismen zerstört werden. Dosen größer als 10 kGy*

- *führen nicht zu Veränderungen in der Zusammensetzung von Lebensmitteln, die unter toxikologischen Gesichtspunkten eine nachteilige Wirkung auf die menschliche Gesundheit haben können,*
- *können mögliche mikrobiologische Risiken für den Verbraucher wesentlich verringern,*
- *führen nicht zu Nährwertverlusten in einem Ausmaß, das eine nachteilige Wirkung auf den Ernährungsstatus von Einzelpersonen oder Bevölkerungsgruppen haben könnte“.*

Folglich sind auch Lebensmittel, die mit Strahlendosen oberhalb 10 kGy behandelt wurden, sicher und für den Verzehr geeignet, wenn sie unter Einhaltung „guter Herstellungspraxis /GMP/“ erzeugt wurden (Berichte der 5. Deutschen Tagung zur Lebensmittelbestrahlung 1999 sowie die Bestätigung des aktuellen Berichts der EU Commission 23. April 2003).

Durch die Lebensmittelkontrolleure in Städten oder Kreisen wird illegale Bestrahlung oder deren mangelhafte Kennzeichnung beanstandet und dem BVL über die durchgeführten Bestrahlungen, insbesondere über Gruppen und Mengen der behandelten Erzeugnisse sowie die verabreichten Dosen, berichtet. Das BVL wertet die Länderdaten aus und berichtet jährlich der EU-Kommission wieder über die Kontrollen und deren verwendete Nachweismethoden. Die EU-Kommission fasst wiederum die Berichte der Mitgliedstaaten zusammen und veröffentlicht sie im Internet (Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL 2008).

#### **4.2.6 Wirtschaftlichkeit der Bestrahlung**

Die Gesamtmenge weltweit an bestrahlten Lebensmitteln wird auf etwa 200.000 t jährlich geschätzt, davon etwa 50.000 t Gewürze und trockenes Gemüse. In Frankreich, Belgien und den Niederlanden werden 20.000 t Zwiebeln, Knoblauch und Kartoffeln bestrahlt so wie in den EU-Nachbarländern. Gewürze und

Trockenzwiebeln werden in den USA allein auf 25.000 t geschätzt, auch in Ungarn fast die Hälfte davon, in Japan etwa 25.000 t Kartoffeln, in Südafrika 25 t jährlich strahlensterilisierte Produkte, für das Militär, als Freizeitbedarf oder für immunerkrankte Patienten hergestellt. Nicht nur Lebensmittel landen in der Bestrahlung, sondern auch andere Produkte für andere Zwecke, wie bei der Sterilisierung von medizinischen Artikeln in Lohnbestrahlungsanlagen.

Eine Berechnung für Kosten pro Kubikmeter, bei einer Dichte von etwa 0,5 t/m<sup>3</sup> kalkuliert, wurde durchgeführt. Folglich ergaben sich Bestrahlungskosten von etwa 0,60 DM/kg (etwa die Hälfte in Euro). Bei den geringeren Strahlendosen, wie sie für Lebensmittel in Frage kommen, sind entsprechend niedrigere Kosten zu erwarten: für Geflügel etwa 0,10 - 0,20 DM/kg, für Gewürze etwa 0,20-0,30 DM/kg. Die Vielfalt der Anwendung von Bestrahlungen in den Nachbarstaaten zeigt, dass eine wirtschaftliche Nutzung des Verfahrens möglich ist.

## 5 Zusammenfassung

Moderne vaskuläre Erkrankungen wie Arteriosklerose und Bluthochdruck, metabolische Erkrankungen wie Diabetes mellitus und Asthma – diese und andere weit verbreitete Leiden werden wohl als scheinbar unausweichliches, oft lebensbedrohliches Übel dieser Zeit in die Menschheitsgeschichte eingehen.

Es handelt sich hierbei jedoch nicht um eine unvermeidbare Gegebenheit. Denn eine ausgewogene Ernährung und der Einsatz von Naturstoffen vermeiden häufig die Notwendigkeit diverser chemischer Medikation und das Auftreten damit verbundener Nebenwirkungen.

Daher konkurrieren in den letzten Jahren Pharma- und Nahrungsindustrie, um bestmöglich auf die Wünsche der Konsumenten zu reagieren. Insofern erlangen Naturstoffe über die Nahrungsbranche neue Begrifflichkeiten, wie z.B. functional food oder innovative food bzw. GVO-food usw.

Auf der anderen Seite sensibilisiert sich die Pharmaindustrie und bietet Pharmaka, die sich auf möglichst chemiefreie Zusätze, nämlich pflanzliche oder tierische Rohextrakte, beschränken. Denn hinreichende pharmakologische und biochemische Untersuchungen halten in ihren Erkenntnissen die Rohextrakte in einem Pharmakon für effektivere bzw. wirksamere Mittel als jene präparierten bzw. zusammengesetzten Inhaltstoffe wie Nutrienten oder Arzneistoffe.

**Knoblauch** als Träger von wertvollen Naturstoffen und **Eiklar** als gesunder Proteinspender, sowohl in purer Form als auch als Inhaltsstoff eines Präparates, stehen mit ihren hochwertigen Bestandteilen im Fokus der vorliegenden Arbeit.

Hierzu wurden Vertreter der Gattung **Knoblauch** (*Allium sativum*), eines seit Jahrtausenden bekannten Heilmittels der Volksmedizin, auf ihre schwefelhaltigen Verbindungen (Thiosulfonate) als Vorstufen der heilenden Wirkstoffe (Allylsulfuren wie Allicin, Ajoen sowie Allixin) untersucht. Außerdem wurden die Auswirkungen der Konservierung durch ionisierende Strahlung geprüft.

Um an diese Stoffe heranzukommen, wurde in den letzten Jahren ein Wettrennen im Rahmen der Instrumentellen Analytik veranstaltet. Das schnellste und umweltfreundlichste Verfahren überhaupt nennt sich Biosensor. Demgemäß wird in dieser Arbeit ein Biosensor entwickelt, welcher zum ersten Mal über ein fluoreszenzspezifisch empfindliches Analyser-Messsystem (FIA-Biosensors ) mit einer hinreichenden Empfindlichkeit bis zu einer **Nachweisgrenze von  $0,9 \mu\text{M NH}_3 \pm 2 \%$**  arbeitet. Damit wurde eine Scanmöglichkeit zum Aufspüren der gesamten Vorstufe (S-Alk(en) yl-L-Cysteinsulfoxide) als Hinweis auf die pharmazeutische Wertigkeit einer cysteinsulfoxidhaltigen Pflanze erreicht. Diese Vorstufen ließen sich kürzlich ebenso in Pilzen nachweisen.

Zur Entwicklung des FIA-Biosensors wurden die bei einer Knoblauchzerquetschung ausgelösten biochemischen Vorgänge simuliert und in einer Apparatur technisch umgesetzt. Es handelt sich hierbei um die enzymatische Umsetzung (C-S-Lyase) der

nicht-proteinogenen Aminosäuren bzw. ihrer Vorstufen (Cysteinsulfoxide, vertreten durch Alliin, Isoalliin, Propiin, Methiin) in dem stark riechenden und reizenden Stoff *Cysteinium* (*cystein*) sowie um andere Produkte wie *Pyruvat* und **Ammoniak**. Das Ammoniak wird unter der Wirkung der in der Vacuola vorhandenen Alliinase [EC 4.4.1.4] in einem Verhältnis 1:1 zum jeweiligen Cysteinsulfoxid freigesetzt. Deshalb wird Ammoniak als Schlüssel für das Aufspüren von Cysteinsulfoxiden im FIA-Biosensors verwendet.

Diese enzymatische Reaktion wurde dem Biosensor dank eines **Puffersystems** ermöglicht, dessen optimiertes alkalisches Medium (pH 10,5) das frei gesetzte Ammoniak in ein detektierbares fluoreszierendes Derivat überführt. Der eigens dafür entwickelte **Enzymreaktor** schuf die Voraussetzung dafür, das 1:10-verdünnte Enzym auf einem Substrat bzw. Träger, nämlich dem Glycoprotein (Concanavalin-Agarose/Con-A), immobilisieren und optimieren zu können. Die Anordnung erfolgte in einem **Förderungssystem** (FIA). Innerhalb der 3- bis 4-minütigen Messung konnte man die gesamten Cysteinsulfoxide in wässrigem (**40 µl** als Probenvolumen) Extrakt aus der Pflanze bestimmen, und dies ohne langwierige Umständlichkeiten wie Vor-Derivatisierungsschritte und Inkubationen, auf die bei dem hierzu eingesetzten HPLC oder vergleichbaren Analysesystemen zurückgegriffen wird. Durch die weitere Optimierung und Ankupplung an einen Autosampler konnte man Dutzende oder sogar Hunderte von Proben in der Arbeitsgruppe in unschlagbarer Zeit auf den gesamten Gehalt von Cysteinsulfoxiden (CS) analysieren und in eine chemotaxonomische Datenbank zuverlässig einordnen.

Der CS-Gehalt der untersuchten inventarisierten Proben (mit alphanumerischer Bezeichnung versehen) für die Datenbank befand sich im Bereich 0,06 - 3,66 % CS (bezogen auf das untersuchte Pflanzenmaterialgewicht), wo offensichtlich, um den üblichen bekannten Durchschnitt von 0,50 - 1,25 % CS, viele Arten und einige Hybriden der Gattung *Allium* liegen.

Neben der Möglichkeit der Enzymaktivitäts- sowie Alliinase- Spezifitätsbestimmung konnte mit dem FIA-Biosensors zum ersten Mal, dank der vorliegenden Arbeit, der Nachweis von ionisierender Strahlungsänderung (Beta Strahlung 5-10 MeV) auf CS nachvollzogen werden. Schwefelhaltige Proteine wie CS gelten als sehr empfindlich gegenüber Strahlung. Insofern war es möglich, insbesondere in den unverarbeiteten Varianten des Knoblauchs (nämlich normalen frischen Knoblauchzehen), ein aussagekräftiges Ergebnis ab 1 kGy mit FIA-Biosensors zu erzielen, wobei mit 5 kGy und 3,5 kGy jeweils 50 % und 70% CS-Verlust notiert werden konnten.

Die Strahlungsdosen sind jedoch bei frischem Knoblauch lediglich so weit eingesetzt, dass die CS-Trend- und Umfangs-Änderungen nachvollzogen werden können. Die anderen untersuchten Varietäten (Pulver, Chips, Granulat) mit niedrigem Wassergehalt (7-15% Wasser) wurden bis 10 kGy bestrahlt, da als Grenzdosis der Europäischen Richtlinien 1999/2 und 3/EG nach einer guten Herstellungspraxis (GMP) ohne gesundheitliche Bedenklichkeit bis zu diesem Wert bestrahlt werden darf. Diese Proben erfuhren einen nur geringfügigen (unsignifikanten) CS-Verlust bei den jeweiligen verwendeten Strahlendosen, einschließlich des Maximums von 10 kGy. Dahingegen war eine positive Strahlungswirkung bzw. eine Zunahme bis 26 % CS in Granulat zu notieren; dies geschah durch die Freisetzung von deponierten gebundenen Cysteinsulfoxiden. Eine bekannte Form dafür sind die an der Aminogruppe substituierten  $\gamma$ -Glutamyl-Derivate. Pharmatechnologisch gesehen,

könnte dies eine neue Perspektive für die weitere Nutzung der Bestrahlung zur Förderung der Ausbeute an CS als Arzneistoff bedeuten, analog jener, die zur Förderung der Ausbeute in der Safftherstellung eingesetzt wird.

Die Bestrahlung hat ebenso Einfluss auf Makromoleküle wie die DNA einer Zelle und Proteine. Deshalb wurde hierzu ein genotoxisches Messverfahren optimiert, der sogenannte Comet-Assay, und zur Bestätigung der strahlungsinduzierten Fragmente in den DNA-Zellkernen des Knoblauchs eingesetzt. Dabei konnte man die bestrahlten von den unbestrahlten Proben ab 1 kGy signifikant ( $P > 0.05$ ) unterscheiden, jedoch keine nennenswerte Abhängigkeit des Schadens von zunehmenden Strahlendosen erschließen. Ebenso wurde eine signifikante Reduktion der Alliinaseaktivität bei frischen Knoblauchzehen spektroskopisch nahezu bis zur totalen Inaktivierung des Enzyms bei 10 kGy festgestellt.

Das andere Subjekt war das **Eiklar** als gesunder Proteinspender, getrennt von Eigelb als Quelle der Fette und deren Cholesterolen bzw. Cholesterin-Derivaten und den damit verbundenen bekannten Gefahren. Hierzu wurden auch vier Varietäten des Eiklars zur Untersuchung herangezogen, nämlich flüssig (frisch, gelagert, pasteurisiert) und trocken (Granulat, Pulver). Eiklar lässt sich unter anderem sowohl als Supplement für Muskelaufbau als auch in vielen Nahrungsmitteln und kosmetischen Produkten und Präparaten einbetten und verarbeiten, entweder als Eiklar insgesamt oder nach Isolierung eines seiner Bestandteile. Voraussetzung ist, dass das Eiklar in intakter Form und u.a. lagerfähig vorliegt. Hierfür wird international u.a. durch unterschiedliche Bestrahlungen je nach Varietät konserviert. Die Eiklarvarietäten wurden in dieser Arbeit mit zwei Techniken auf strahlungsinduzierte Veränderungen untersucht, um einen möglichen spezifischen Unterschied herausfinden zu können und damit eine Pflichtkennzeichnung bzw. die Kontrolle eines Eiklar beinhaltenden Produkts zu bewirken. Hierfür wurden zwei Techniken eingesetzt.

1) die Kapillarelektrophorese (CE). 2) die MIR-ATR Spektroskopie.

**1) Zwei CE** Protein-Auftrennungsmethoden wurden hierfür entwickelt, optimiert mit einer **Nachweisgrenze von 100 ng/ml**, die **Bestimmungsgrenze von 0,5µg/ml** (Lyz.) definiert und verwendet.

Die eine Auftrennung erfolgt nach Ladungsverhältnissen der Analyten, sprich mit Kapillaronenelektrophorese (CZE), und die andere nach der Masse der Analyten, sprich mit Kapillargelelektrophorese (CGE), worunter wiederum nativ und SDS denaturiert (SDS-CGE) aufgetrennt werden.

Mit CZE konnte man unter UV-Detektion einige signifikante Strahlungsänderungen bei flüssigem Eiklar feststellen. Insbesondere verzeichnete man die Anfälligkeit von Lysozym (MW: 14,3), wobei eine 70prozentige Abnahme der Absorption bei 3 kGy notiert wurde. Ebenso zeigten andere undefinierte Proteine, die größere Migrationszeiten als Ovalbumin und Ovomocoid haben (über 76 k Dalton), eine ähnlich bedeutsame Abnahme in ihrer UV-Absorption. Zu verzeichnen ist auch eine relativ proportionale Abhängigkeit der Änderungen bei der Abnahme der UV-Absorption mit ansteigenden Strahlendosen.

Die UV-detektierten CZE-Elektropherogramme verhalfen dazu, unterschiedliche Wirkung auf die unterschiedlichen Eiklarproteine in deren Absorption ohne Isolierung und Reinigung bemerkbar zu machen. Während gelagertes Eiklar sich schon von

bestrahltem und pasteurisiertem sowie unbestrahltem unterschied, konnten die letzten drei untereinander keine signifikanten Unterschiede liefern. Mit CZE wurde über Mischungen nach möglichen **Protein-Protein-Wechselwirkungen** gesucht, und man konnte recht gut einen Hinweis (Peakausfall) auf den spezifischen Nachweis für bestrahlte Proteine erhalten (Abb.3.32). Es sind jedoch weitere Versuche notwendig, um eine aussagekräftige Äußerung über die Spezifität der Bestrahlung in dieser Beziehung wagen zu können.

Eine signifikante Unterscheidung des bestrahlten flüssigen, frischen Eiklars konnte über **CZE-LIF** (mit Laser induzierte Fluoreszenz-Detektion; LIF) erzielt werden: Es wurde nämlich eine Abnahme der Fluoreszenz bei 3 kGy um 70% des Ausgangswertes verzeichnet, welche auch als ausschlaggebende neue Erkenntnis und Indiz gelten kann. Dies wurde bei pasteurisiertem und gelagertem Eiklar jedoch nicht weiter untersucht.

Hingegen konnte man bei den trockenen Eiklarvarianten kaum eine Änderung notieren, noch nicht einmal bei der höchsten verwendeten Strahlendosis von 10 kGy. Dies ist ein Indiz dafür, dass erwünschte Effekte wie die Minderung der mikrobiellen Last und die daraus resultierende verbesserte Haltbarkeit bei trockenen Eiklarvarietäten weniger Änderung der Proteine bewirkt und Bestrahlungen mit höheren Dosen problemlos eingesetzt werden können.

Mit Hilfe der **CGE**-Auftrennung konnte man nach der Proteinmasse die Eiklarproteine zunächst bei frischem, flüssigem Eiklar auftrennen und einen neuen Peak mit der Molarmasse entdecken, die über jenem von Lysozym lag, sprich im Bereich von 15 bis 23 kDalt, bei mit 3 kGy bestrahlten Proben. Der neue Peak nahm mit steigender Strahlendosis insbesondere bei 3; 4 kGy bis zu 100% seines Werts bei 1 kGy zu, und war bei SDS deutlicher als bei Nativ-CGE zu erfassen.

**2) MIR-ATR-Methode** Die unterschiedlichen Vorbehandlungen der Proben führen zu deutlich unterschiedlichen MIR-Spektren: Die Spektren der pasteurisierten Proben unterschieden sich von denen der unbehandelten und den mit 10 kGy bestrahlten Proben. Insbesondere im Bereich der NH-Schwingungen bei 3600 bis 3200  $\text{cm}^{-1}$  und im Fingerprintbereich bei 1390 sowie bei 1278 und 1252  $\text{cm}^{-1}$  sind Unterschiede erkennbar. Diese Differenzen sind auch mit Hilfe einer Hauptkomponentenanalyse darstellbar.

Aus dieser Untersuchung ergab sich, dass mit Hilfe der MIR-ATR-Methode nicht ohne weiteres Unterschiede zwischen den bestrahlten und unbehandelten Eiklarproben nachgewiesen werden konnten.

Eine Bestrahlung von Lebensmitteln wird bereits in vielen Ländern eingesetzt, z.B. bei Geflügel in den USA, Papayas in Südafrika, Froschschenkeln, Kartoffeln und Zwiebeln in China und Frankreich, Garnelen in den Niederlanden.

## 6 Literaturverzeichnis

Adam, W. (1980) Thermische Erzeugung elektronisch angeregter Moleküle. *Chemie in unserer Zeit* **2**: 44-55.

Alegret, S., Alonso, J., Bartoli, J. and Martinez-Fabregas, E. (1989) *Analyst* **114**: 1443-1447.

Alur, M.D., Venugobal, V., Nerjar, D.P. et al. (1991) *Journal of Food Science* **56**: 332-334,351.

Al-Waili, N.S., Saloom, K.Y. et al. (2007) Effects of Heating, Storage and Ultraviolet Exposure on Antimicrobial Activity of Garlic Juice. *J. Med. Food. Mar.* **10 (1)**: 208-12.

Ankri, S. and Mirelman, D. (1999) Antimicrobial Properties of Allicin from Garlic. *Microbes and Infection* **1**: 125-129.

Anon. (1991) Information über Lebensmittelbestrahlung. Eine Serie von Informationsblättern der Internationalen Gruppe Lebensmittelbestrahlung. ICGFI\_Sekretariat (Hrsg.), Vienna, übersetzt von Saupe, S., Ehlermann, D.A.E. Bundesforschungsanstalt für Ernährung, Karlsruhe (1994).

AOAC, (1990) Official Methods of Analysis, 15th ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC.

Arnault, I., Mondy, N., Cadous, F., Auger, J. (2000) Possible Interest of Various Sample Transfer Techniques for Fast Gas Chromatography-Mass Spectrometric Analysis of True Onion Volatiles. *J. Chromatogr. A* **896**: 117–124.

Ball, H.R. and Gardner, F.A. (1968) Physical and Functional Properties of Gamma Irradiated Liquid Eggwhite. *Poultry Science* **47 (4)**:1481-1487.

BGS BETA-GAMA-SERVICE GmbH Produktbestrahlung, Heft: Strahlensterilisation Bruchsal.

Block, E., Gulati, H., Putman, D., Sha, D., et al. (1997) *Allium* Chemistry: Synthesis of 1-[Alk(en)ylsulfanyl]propyl Alk(en)yl Disulfides (Cepaenes), Antithrombotic Flavorants from Homogenates of Onion (*Allium cepa*). *J. Agric. Food Chem.* **45**: 4414-4422.

Bisswanger, H. (1994) Enzymkinetik, Theorie und Methoden VCH, Weinheim: 237-239.

Bradford, M.M. (1976) A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.

Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit:

[http://www.bvl.bund.de/cIn\\_007/nn\\_1004750/DE/01\\_\\_Lebensmittel/01\\_\\_Sicherheit\\_\\_Kontrollen/sicherheit\\_\\_kontrollen\\_\\_node.html\\_\\_nnn=true](http://www.bvl.bund.de/cIn_007/nn_1004750/DE/01__Lebensmittel/01__Sicherheit__Kontrollen/sicherheit__kontrollen__node.html__nnn=true).

- Cavagnaro, P.F., Camargo, A. et al. (2007) Effect of Cooking on Garlic (*Allium sativum* L.) Antiplatelet Activity and Thiosulfinates Content. *J. Agric. Food Chem.*, 55 (4), 1280 - 1288.
- Charlson, M., McFerren, M. (2007) *Arch. Intern. Med.* 167: 325-326.
- Christopher, D., Gardner, L.D., Lawson et al. (2007) Effect of Raw Garlic Commercial Garlic Supplements on Plasma Lipid Concentrations in Adults with Moderate Hypercholesterolemia. *Arch. Intern. Med.*: **167**: 346-353.
- Clausen, U., Weißtöner (1973): Angewandte Fluoreszenz. *Chemie in unserer Zeit* **5**: 141-147.
- Center of Food Safety and Applied Nutrition, FDA (Jul 2000), in: <http://www.cfsan.fda.gov/~dms/fsiupd13html20>
- Cerda, H., Johanson, K.J., Hofsten, B.V. (1993) Identification of Irradiated Food by Microelectrophoresis of DNA from Single Cells. in: Leonardi, M., Belliardo, J.J. and Raffi, J.J. (Eds.), *Recent Advances of New Methods of Detection of Irradiated Food, Proceeding of a Workshop, Strasbourg Ancona, 24-26 Sept. 1991, Commission of the European Communities Luxembourg, Eur-14315*: pp. 401-405.
- Cerda, H. (1993) DNA Silver Staining after Electrophoresis in Agarose Gels. in: Delincee, H., Marchioni, E., Hasselman, C. (1992) *Change in DNA for the Detection of Irradiated Food, Proceeding of a Workshop, Strasbourg, 25-26 May, Commission of the European Communities Luxembourg, Eur-15012*: pp.5-6.
- Coolong, T.W., Randle, W.M. (2003) Sulfur and Nitrogen Availability Interact to Affect the Flavour Biosynthetic Pathway in Onion. *J. Am. Soc. Hort. Sci* 128 (**5**): 776-783.
- Croci, C.A., Banek, S.A., Curzio, O.A. (1995) Effect of Gamma-Irradiation and Extended Storage on Chemical Quality in Onion (*Allium cepa* L.). *Food Chemistry* **54** (**2**): 151-154.
- Deutsche Gesellschaft für Ernährung (1991) (Hrsg.) *Empfehlungen für die Nährstoffzufuhr*. 5.Aufl., Umschau Frankfurt.
- Diehl, J. F., Hasselmann, C., Cilcast, D. (1991) Sind bestrahlte Lebensmittel ohne Nährwert? *International. Z. für Lebensmittel Technol. und Verf. Tech. (ZFL)* **42**: 314 -323.
- Diehl, J.F. (1995) *Safety of Irradiated Food*. 2. Auflage, New York: Decker, M.
- Dizdaroglu, M., Gajewski, E., Simic, M.G., et al. (1983) Identification of Some OH-Radical-Induced Products of Lysozyme.
- Eder, H., Kiefer, J., Luggen-Hölscher, J., Rase, S. (1986) *Grundzüge der Strahlenkunde für Naturwissenschaftler und Veterinärmediziner*. Berlin und Hamburg: Parey Verlag, 9-36.
- Eiss, M.I. (1983) Irradiation of Spices and Herbs. *National Symposium on the Ionizing Energy Treatment of Foods; Sydney (Australia); Food Technol. Aust.* 5-6 Oct **36**: 362-66, 370.



- Elias, P.S., Cohen, A.J. (1983) Recent Advances in Food Irradiation. Elsevier, Amsterdam.
- Elias, P.S. (1992) Die gesundheitliche Unbedenklichkeit bestrahlter Lebensmittel. Mitteilungen über Ernährungsfragen. Bundesforschungsanstalt für Ernährung (Hrsg.), 8. Aufl., Karlsruhe.
- Ehlermann, D.A.E. (1998) Die Strahlungskonservierung von Lebensmitteln. Mitteilung über Ernährungsfragen Bundesforschungsanstalt für Ernährung (Hrsg.), 8. Aufl., Germany.
- Ehlermann, D.A.E. und Bauer, B. (1999) Der Karlsruher Elektronenbeschleuniger für die Bestrahlung von Lebensmitteln. in: Lebensmittelbestrahlung 5. Deutsche Tagung: Berichte der Bundesforschungsanstalt für Ernährung, Karlsruhe, BFE-R-99-01, pp.270-273.
- Engelhardt, H.W., Beck und Schmitt, T. (1994) Kapillarelektrophorese: Methoden und Möglichkeiten, Vieweg-Verlag, Braunschweig / Wiesbaden.
- European Commission, Statement of the Scientific Committee on Food on a Report on 2-Alkylcyclobutanone (expressed on 3 July 2002), SCF/CS/NF/IRR/26 ADD 3 Final.
- European Commission (24 April 2003) Health and Consumer Protection Directorate-General, Directorate C - Scientific Opinions, C2 - Management of Scientific Committees; Scientific Co-Operation and Networks, Scientific Committee on Food, SCF/CS/NF/IRR/24 Final.
- Fairbairn, D.W., Olive, P.L., O'Neill, K.L. (1995) The Comet Assay: A Comprehensive Review. *Mutat. Res.* **339**: 37-59.
- Farkas, J., (1985) Radiation Processing of Dry Food Ingredients. A Review. *Radiat. Phys. Chem.* **25**, 271–280.
- Faust, F., Kassie, F., Mersch-Sundermann, V. (2004) Lymphozyten und deren Verwendung, Biomonitoringstudien in der alkalischen Einzelzell-Gelelektrophorese (Comet Assay) für humane Möglichkeiten und Probleme. 45. Frühjahrstagung der Gesellschaft für Pharmakologie und Toxikologie, Mainz, 08.-11. März
- Fernandes-Band, B., Lazaro, F., Luque de Castro, M.D. and Valcarcel, M., (1990) *Anal. chim. Acta* **229**: 177-182.
- FDA's Center for Food Safety and Applied Nutrition (2004) SAFE FOOD **888**: 723-3366.
- Fritsch, R.M. und Friesen, N. (2002) Chapter 1. Evolution, Domestication and Taxonomy. in: Rabinowitch, H.D. und Currah, L., *Allium* crop science: Recent Advances, CABI Publishing Wallingford, New York.
- Fritsche, R.M., Keusgen, M. (2006) Occurrence and Taxonomic Significance of Cystein Sulfoxides in Genus *Allium*. *Phytochemistry* **67**: 1127- 1135.
- Galle, H.J. (1988) Spektroskopische Methoden in der Biochemie 46-52. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York.

- Garcia Alvarez-Coque, M.C., Medina Hernandez, M.J., Villanueva Camanas, R.M. and Mongay Fernandes, C. (1989) *Anal. Biochem.* **178**: 1-7.
- Genisicke, F. (1988) Einführung in die Strahlenbiologie, Lehrbuch für die Medizinische Fachschulausbildung. 4. überarbeitete Aufl., Berlin: Verlag Volk und Gesundheit, 20-24.
- Gisin, M. and Thomas, C. (1986): *Industrial Process Control by Flow Injection Analysis. Anal. Chem. Acta* **190**: 165.
- Grzimek, B.(1942) *Das Eierbuch*. 5. Aufl., Verlag F. Pfenningstorff, Berlin.
- Gyawalia, R., Seo H.Y., Leeb J.U., Songc, H.P., Kimc, D.H., Byunc, M.W., Kima, K.S. (2006): Effect of G-Irradiation on Volatile Compounds of Dried Welsh Onion (*Allium fistulosum* L.): *Radiation Physics and Chemistry* **75**: 322–328.
- Hall, E.A.H (1995) *Biosensoren*. Springerverlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- Hirsch, K. et al. (2000) Effect of Purified Allicin, the Major Ingredient of Freshly Crushed Garlic On Cancer Cell Proliferation. *Nutr. Cancer* **38**: 245-254.
- Hanelt, P. (1994) Die taxonomische Gliederung der Gattung *Allium* und ihre Kultur-und Nutzpflanzen. *Drogenreport* **7**: 17-25.
- Hank, C.R., Kunkel, M.E., Dawson, P.L., Acton, J.C., Wardlaw, F.B. (2001) The Effect of Shell Egg Pasteurization on the Protein Quality of Albumen. *Poult Sci. Jun.* **80 (6)**: 821-4.
- Hegi, G. (1939) *Illustrierte Flora von Mittel-Europa*, 2.Band, 2.Teil, 2.Auflage, J.F. Lehmanns Verlag, München. 268-269.
- Helle, N., Knopfe, C., Mischke, J., Gebhardt, G., Bögl, K.W., Schreiber, G.A. (1993) ESR and HPLC Studies of the Detection of Gamma Irradiation of Eggs: *Z. Lebensm. Unters. Forsch. Nov;* **197 (5)**: 440-3.
- Herman, A., Szymanski (1964) *Infraredband Handbuch*. Edited by Chairman, Chemistry Department *Canisius College*, Plenum Press/New York.
- Heyer, R., Koswig, S., Mörsel, J-Th. (1991) Strahleninduzierte Lipidänderungen unter besonderer Berücksichtigung von Geflügel. *Grundlagen Anwendungen; Kontrolle. Bundesgesundheitsamt (Hrsg.), Berlin, Soz/Ep-Heft* **02/1991**: 66-128.
- Ichikawa, M., Ryu, K., Yoshida, J., Ide, N. et al. (2003) Identification of Six Phenylpropanoids from Garlic Skin as Major Antioxidants. *J. Agric. Food Chem.* **51**: 7313-7317.
- Jansen, H., Müller, B. und Knobloch, K. (1989) Characterization of an Alliin Lyase Preparation from Garlic (*Allium sativum*), *Planta Med.*, **55**: 434-439.
- Jansen, H., Frei, R.W., Brinkman, U.A.Th. (1985) *J. Chromatogr.* **325**: 255-259.
- Joint FAO/WHO Food Standards Programme (2002) Statement of the WHO Representative to the Codex Committee on Food Additives and Contaminants, ALINORM 03/12, para 79, Rome.

- Keusgen, M. (1999) Biosensorische Methoden zur quantitativen Bestimmung von Cysteinsulfoxiden, Shaker Verlag Aachen (ISBN 3-8265-6262-3).
- Kleeberg, K.K., Müller, A., Simat, T.J., Steinhart, H. (2003) Suitability of Tryptophan Radiation Products as Markers for the Detection of Gamma-Irradiated Protein Rich Food. *Adv. Exp. Med. Biol.* **527**: 677-85.
- Koch, H.P. und Lawson, L.D. (1996) *Garlic: The Science and Therapeutic Application of Allium sativum L. and related Species*, Williams & Wilkins, Baltimore.
- Koch, H.P., Hahn, G. (1988): Knoblauch - Grundlagen der therapeutischen Anwendung von *Allium sativum L.*, Urban & Schwarzenberg, Donauwörth.
- Krest, I. und Keusgen, M. (1999) Quality of Herbal Remedies from *Allium sativum*: Differences between Alliinase from Garlic Powder and Fresh Garlic. *Planta Medica* **65**: 139-143.
- Krest, I. und Keusgen, M. (1999) Stabilization and Pharmaceutical Use of Alliinase. *Pharmazie*, **54**: 289-293.
- Kuhn, R. & Hoffstetter-Kuhn, S. (1993) *Capillary Electrophoresis, Principles and Practice*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- Küttner, E.B., Hilgenfeld, R. & Weiss M.S. (2002) Purification, Characterization and Crystallization of Alliinase from Garlic, *Arch. Biochem. Biophys.* **402**: 192-200.
- Küttner, E.B., Hilgenfeld, R. & Weiss M.S. (2002): The Active Principle of Garlic at Atomic Resolution. *J. Biol. Chem.* **277**: 46402-46407.
- Lacy, N., Christian, G.D. and Ruzicka, J. (1990) *Anal. Chem.* **62**: 1482-1490.
- Lenton, K.J., Therriault, H., Fulop, T., Payette, H., Wagner JR. (1999) Glutathione and Ascorbate are Negatively Correlated with Oxidative DNA Damage in Human Lymphocytes. *Carcinogenesis* **20 (4)**: 607-613.
- Liu, J., Lin, R.I., Milner, J.A. (1992) Inhibition of 7,12-Dimethylbenz[a]anthracene-Induced Mammary Tumors and DNA Adducts by Garlic Powder: *Carcinogenesis*. Oct **13 (10)**: 1847-51.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J. et al. (1951) Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *J. Biol. Chem.* **1913**: 265-279.
- Ma, C.Y., Harwalkar, V.R., Poste, L.M. and Sahasrabudhe, M.R. (1993) Effect of Gamma Irradiation on the Physicochemical and Functional Properties of Frozen Liquid Egg Products. *Food Research International* **26**: 247-254.
- Margoshes, B.A. (1990) Correlation of Protein Sulfhydryls with Strength of Heat-formed Egg White Gels. *J. of Food Sci.* **55**: 1753.
- Masuda, T., Koseki, S.Y., Yasumoto, K., Kitabatake, N. (2000) Characterization of Anti-Irradiation-Denaturated Ovalbumin Monoclonal Antibodies. Immunochemical and Structural Analysis of Irradiation-Denaturated Ovalbumin. *J. Agric. Food Chem.* **48**: 2670-2674.

McKelvey-Martin, V.J., Green, M.H.L., Schmezer, P., Pool-Zobel, B.L., De Méo, M.P., Collins, A. (1993) The Single Cell Geoelectrophoresis (Comet Assay). A European Review. *Mutat. Res.* **288**: 47-63.

McLaughlin, W.L., Humphreys, J.C., Levine, H., Miller, A., Radak, B.B. and Rrativanich, N. (1979) The Gamma Rays and Electrons at High Dose Rates. *Radiat. Phys.Chem.* **14**, 551-574, Annual Book of ASTM Standards, vol. 12.02.2000, pp 721-725.

Merritt, C. Jr., Vajdi, M., Angelini, P. (1985) A Quantitative Comparison of the Yields of Radiolysis Products in Various Meats and their Relationship to Precursors. *Journal of the American Oil Chemists' Society JAOCS* **62**: 708-713.

Mersch-Sundermann, V., Lu, W.Q. (2002): Drinking Water Produced by Chlorination of Polluted Raw Water in Wuhan, P.R.China, Induced Micronuclei in Vivo (rats) and in Vitro (human HepG2 cells) and Caused DNA Migration in Single Cell Gel Electrophoresis (Comet Assay). *Gemeinsame Konferenz der International Society of Environmental Medicine (ISEM) und der Gesellschaft für Hygiene und Umweltmedizin, Greifswald*, 25.-27. Sept.

Michahelles, E. (1974) Über neue Wirkstoffe aus Knoblauch (*Allium sativum* L.) und Küchenzwiebel (*Allium cepa* L.) Augsburg.

Mikla, P., Keusgen, M. (2000): Immobilization of Alliinase on Porous Aluminum Oxide, *Biotechnol. Bioeng.* Aug 5, **69 (3)**: 344-8.

Moller, P., Loft, S. (2002) Oxidative DNA Damage in Human White Blood Cells in Dietary Antioxidant Intervention Studies. *Am. J. Clin. Nutr.* **76 (2)**: 303-310.

Moore, W.J., Hummel, D.O. (1986) *Physikalische Chemie*. 4. Auflage, de Gruyter

Möller, J. (1987) *Flow Injection Analysis: Grundlagen und Anwendung*. in: *Analytiker Taschenbuch Bd. 7*. Springer-Verlag, Berlin.

Müller, A., Zürn (1994) Biosensoren für Enzymhemmtests. *Chemie in Labor und Biotechnik* **7**: 350-353.

Nakamura, R., Sugiyama, H., Sato, Y.(1978) Factors Contributing to Heat-Induced Aggregation of Ovalbumin. *Agric.Biol.Chem.* **42**: 819.

Naumer, H.und Heller, W. in: *Untersuchungsmethoden in der Chemie*. ISBN 3-13-681403-7 pp 156-159. Georg Thieme Verlag Stuttgart

Nawar, W.W. (1977) Radiation Chemistry of Lipid. in: *Radiation Chemistry of Major Food Components*, Elias, P.S., Cohen, A.J.(Hrsg), Amsterdam: Elsevier.

Nawar W. (1986) Volatiles from Food Irradiation. *Food Reviews Intern* **2 (1)**: 45-78

Nock, L.P. und Mazelis, M. (1986) The C-S Lyases of Higher Plants: Preparation and Properties of Homogeneous Alliin Lyase from Garlic (*Allium sativum*), *Arch. Biochem. Biophys.* **249**: 27-33.

O'Gara, E.A., Hill, D.J., and Maslin, D.J. (May 2000), Activities of Garlic Oil, Garlic Powder, and their Diallyl Constituents against *Helicobacter Pylori*. *Applied and Environmental Microbiology* p. 2269–2273.

Oswaldo, A., Cuzio, A.N.A., Urioste M. (1994) Sensory Quality of Irradiated Onion and Garlic Bulbs. *Journal of Food Processing and Preservation* **18 (2)**: 149–158.

Östling, O., Johanson, K.J. (1984) Microelectrophoretic Study of Radiation-Induced DNA Damages in Individual Mammalian Cells. *Biochem Biophys. Res. Commun* **123**: 291-298.

Pharmacia (1995) *Affinity Chromatography, Principles and Methods* pp. 32-34.

Piza, N., Miro, M., Estela, J.M., Cerda, V. (2004) Automated Enzymatic Assays in a Renewable Fashion Using the Multisyringe Flow Injection Scheme with Soluble Enzymes, *Anal. Chem.* Feb **76 (3)**: 773-80.

Piyakis, K., Sacher, E., Dominique, A., und Lhoest, J. B. (1995) Multitechnique Analysis of Outermost Layers of the Teflon PFA Surface. *Appl. Surf. Science*, **84**: 227-235.

Rabinkov, A., Zhu, X., Grafi, G., Galili, G. und Mirelman, D. (1994) Alliin Lyase (Alliinase) from Garlic (*Allium sativum*), Biochemical Characterization and cDNA Cloning, *Appl. Biochem. Biotechnol.* **48**: 149-171.

Robinson, D.S. (1972 ) Egg White Glycoproteins and the Physical Properties of Egg White. in: *Egg Fragmentation and Production*. (Ed.): Freeman & P.E. Lake. Brit. Poultry Science Ltd., Edinburgh.

Riso, P., Santangelo, A., Porrini, M. (1999) The Comet Assay for the Evaluation of Cell Resistance to Oxidative Stress. *Nutrition Research* **19 (3)**: 325-333.

Rauch, W. (1987) *Eier*. Verlag AID, Bonn S. 886

Roth, M. (1971) *Anal. Chem.* **43 (7)**: 880-882.

Ruzicka, J. and Hansen, E.H. (1975) *Flow Injection Analysis, Part I: A New Concept of Fast Continuous Flow Analysis*. *Anal. Chem. Acta* **106**: 207-224.

Ruzicka, J. (1986): *Anal. Chim. Acta* **165**: 155.

Ruzicka, J. and Hansen E.H. (1981) *Flow Injection Analysis*. First Edition John Wiley & Sons, Inc. New York.

Ruzicka, J. and Hansen E.H. (1987) *Flow Injection Analysis*. John Wiley & Sons, Inc. New York.

Sanderson DCW, Carmichael, L.A. Naylor, J.D. (1995) Photostimulated Luminescence and Thermoluminescence Techniques for the Detection of Irradiated Food. *Food Sci. Technol. Today* **9 (3)**: 150-154.

Sato, Y., Umento, Y. and Kume, T. (1969) The Effect of Gamma Irradiation on Egg White Proteins, Preliminary Report. *Food Irradiation (Shokuhin-Shosha)* **4 (1)**: 42-46.

Scheller, F., Schubert, D., Pfeiffer, D. (1992) Biosensoren, Spektrum der Wissenschaft **9**: 99-115.

Scherz, H. (1974): Some Theoretical Considerations on the Chemical Mechanism of the Radiation Induced Depolymerization of High Molecular Carbohydrates. in: Improvement of Food Quality by Irradiation. IAEA, Vienna 39-50.

Schmidt, W. (1994) Optische Spektroskopie. pp. 205. VCH-Verlag, Weinheim.

Schrader, B. (1995) Infrared and Raman Spectroscopy, VCH New York .

Schöninger, M.J. (2000) Chemo- und Biosensorik. Skript.

Schreiber, G.A. (1993) Thermoluminescence Analysis to Detect Irradiated Fruit and Vegetables - An Intercomparison Study. Sozep-Hefte (No. 3), ISBN 3-89254-160-4, Bundesgesundheitsamt, Berlin.

Schulman, S.G. (1985) Molecular Luminescence Spectroscopy, Methods and Application: Part 1 pp. 2-7. John Wiley & Sons, Inc. New York.

Sendl, A. (1995) *Allium sativum* ursinum: Part 1. Chemistry, Analysis, History, Botany. in: Phytomedicine **1**: 323-339.

Shuts, M., Updike, S., und Garber, C. (1979) Trans. Continuous in Vivo Glucose Analysis Based on Immobilized Enzyme Bonded to Teflon Membrane, Trans. Am. Soc. Artif. Intern. Organs **25**: 114-115.

Simic, M.G. and de Graff, E. (1981) Radiation Chemistry. Principles for Commercial Food Applications. Food Development, November: **(66)** 54-62.

Simons, S.S. and Johnson, D.F. (1978) J. Org. Chem. **43**: 2886-2891.

Skoog, D.A., Leary, J.J., Douglas, A. (1992) Principles of Instrumental Analysis 414.

Song, K., Milner, J.A. (1999) Heating Garlic Inhibits its Ability to Suppress 7,12-Dimethylbenz(a)anthracene-induced DNA Adduct Formation in Rat Mammary Tissue. **129 (3)**: 657-61.

Stoll, A., Seebeck, E. (1947) Über Alliin, die genuine Muttersubstanz des Knoblauchöls: Experientia **3**: 114-115.

Stoll, A., Seebeck, E. (1948) Über Alliin, die genuine Muttersubstanz des Knoblauchöls. 1. Mitteilung über *Allium*-Substanzen. Helv. Chim. Acta **31**: 189-210.

Sternson, L.A., Stobaugh, J.F. and Repta, A.J. (1985) Anal. Biochem. **144**: 233-246.

Stobaugh, J.F., Repta, A.J., Sternson, L.A. and Garren, K.W. (1983) Anal. Biochem. **135**: 495-504.

Storsberg, J., et al., Tannous, F. (2004) Chemical Characterization of Interspecific Hybrids between *Allium cepa* L. and *Allium kermesinum*. Rchb.: J. Agric. Food Chem. **52**: 5499-5505.

Stroppe, H. (1987) Physik. 9. Aufl. Leipzig: Fachbuchverlag Leipzig

Mersch-Sundermann, V., Lu, W.Q. (2002): Drinking Water Produced by Chlorination of Polluted Raw Water in Wuhan, P.R.China, Induced Micronuclei in Vivo (Rats) and in Vitro (Human HepG2 Cells) and Caused DNA Migration in Single Cell Gel Electrophoresis (Comet Assay). Gemeinsame Konferenz der International Society of Environmental Medicine (ISEM) und der Gesellschaft für Hygiene und Umweltmedizin, Greifswald, 25-27.

Thevenot, D.R., Toth, K., Durst, R.A., Wilson, G.S. (1999) Electrochemical Biosensors: Recommended Definitions and Classification. Pure and Applied Chemistry **71 (12)**: 2333-2348.

The Unscrambler 8.0, Camo Process AS, ([www.camo.com](http://www.camo.com)) Norway (1986 –2003).

Vacarcel, M. and Luque de Castro, M.D. (1991) Trend Anal. Chem. **10**: 114-121.

Variyar, P.S., Bandyopadhyay, C., Thomus, P., (1998) Effect of G-Irradiation on the Volatile Oil Constituent of Some Indian Spices. Food Res. Int. **31 (2)**: 105–109.

Vectorlabs Concanavalin A (Con A) Isolated from Canavalia Ensiformis (Jack Bean) Seeds. <http://www.vectorlabs.com/products.asp?catID=211&locID=168>.

Von Sonntag, C. (1980) Free Radical Reaction of Carbohydrates as Studied by Radiation Techniques. Adv Carbohydr. Chem. Biochem. **37**: 7-77.

Von Sonntag, C. (1989) The Chemical Basis of Radiation Biology. Taylor and Francis, London.

Uhlig, H. (1991) Enzyme arbeiten für uns: Technische Enzyme und ihre Anwendung pp.198. Carl Hanser Verlag, München, Wien.

Unal, R., Fleming, H.P., McFeeters, R.F., Thompson, R.L., Breidt, F. Jr, Giesbrecht FG (2001) Novel Quantitative Assays for Estimating the Antimicrobial Activity of Fresh Garlic Juice. J. Food Prot. Feb; **64 (2)**: 189-94.

Urbain, W. (1986): Food Irradiation. Orlando, Akademic Press 1986.

Wang, H., Wang, Z., Zhang, X., and Yuanying, N.I. (2007) Modified Method for Rapid Quantitation of S-Alk(en)yl-L-Cysteine Sulfoxide in Yellow Onions (*Allium cepa* L.): J. Agric. Food Chem. **55**: 5429–5435.

Wong, Y.C. and Herald, T.J. (1995) A Comparison Study of Thermal and Irradiated Pasteurisation on Functional, Physical and Microbiological Properties of Liquid Egg White During Refrigerated Storage. IFT Annual Meeting 1995 USA p. 268 later in: Poult. Sci. 1996 Jun; **75 (6)**: 803-8.

Weltgesundheitsorganisation (WHO Genva 1988) Food Irradiation as Technique for Preserving and Improving the Safety of Food. Übersetzt beim Bundesgesundheitsamt (Hrsg.), Berlin, SozEp-Heft 01/ (1991) Lebensmittelbestrahlung – eine Technik zur Erhaltung und Verbesserung der Sicherheit von Lebensmitteln.

Weltgesundheitsorganisation (WHO 1994) Safety and Nutritional Adequacy of Irradiated Food. Genf 1994.

Weltgesundheitsorganisation (WHO1981) Wholesomeness of Irradiated Food. Report of a Joint IAEA/FAO/WHO Expert Committee, Geneva, Tech. Rep. Series 659

Wertheim, T. (1844) Untersuchungen des Knoblauchöls. Ann. Chem. Pharm. **51**: 289-315.

Wu, X., Kassie, F., Mersch-Sundermann, V. (2005) The Role of Reactive Oxygen Species (ROS), Production on Diallyl Disulfide (DADS), Induced Apoptosis and Cell Cycle Arrest in Human A549 Lung Carcinoma cells. Mutation Research **579**, 115-124.

[www.ipk-gatersleben.de](http://www.ipk-gatersleben.de) Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung  
Corrensstraße 3, D-06466 Gatersleben.

[www.bafz.de/baz99\\_d/bazfrmd.htm](http://www.bafz.de/baz99_d/bazfrmd.htm) Bundesanstalt für Züchtungsforschung an  
Kulturpflanzen (BAZ)/IPA Neuer Weg 22-23, D06484 Guedlingburg. Dr.J.Storsberg.

[www.roche.de/diagnostics](http://www.roche.de/diagnostics).

FDA's Center for Food Safety and Applied Nutrition: **888** SAFEFood 723-3366.

Ziegler, S.J., Sticher, O. (1989) HPLC of S-alk(en)yl-L-Cysteine Derivates in Garlic Including Quatitative Determination of (+)S-allyl-L-Cysteine Sulfoxide(Allin). Planta Med. **55**: 372-378.