Institut für Lebensmittelchemie
Universität Hohenheim
Fachgebiet: Lebensmittelchemie

Prof. Dr. W. Schwack

**ISOLIERUNG UND AUFKLÄRUNG STICKSTOFFHALTIGER
INHALTSSTOFFE
IN APFEL- UND TOMATENFRUCHT-KUTIKELN**

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

Fakultät Naturwissenschaften
Universität Hohenheim

von

Lada Neumann

aus Moskau

2004

Die vorliegende Arbeit wurde am 22. November von der Fakultät Naturwissenschaften der Universität Hohenheim als „Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften“ angenommen.

Tag der mündlichen Prüfung: 17. Dezember 2004

Dekan:	Prof. Dr. Bosch
Berichterstatter, 1. Prüfer:	Prof. Dr. Schwack
Mitberichterstatter, 2. Prüfer:	PD Dr. Haas
3. Prüfer:	Prof. Dr. Isengard

Berichte aus der Chemie

Lada Neumann

**Isolierung und Aufklärung stickstoffhaltiger
Inhaltsstoffe
in Apfel- und Tomatenfrucht-Kutikeln**

D 100 (Diss. Universität Hohenheim)

Shaker Verlag
Aachen 2005

Bibliografische Information der Deutschen Bibliothek

Die Deutsche Bibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

Zugl.: Hohenheim, Univ., Diss., 2004

Copyright Shaker Verlag 2005

Alle Rechte, auch das des auszugsweisen Nachdruckes, der auszugsweisen oder vollständigen Wiedergabe, der Speicherung in Datenverarbeitungsanlagen und der Übersetzung, vorbehalten.

Printed in Germany.

ISBN 3-8322-4041-1

ISSN 0945-070X

Shaker Verlag GmbH • Postfach 101818 • 52018 Aachen

Telefon: 02407 / 95 96 - 0 • Telefax: 02407 / 95 96 - 9

Internet: www.shaker.de • eMail: info@shaker.de

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Schwack am Institut für Lebensmittelchemie der Universität Hohenheim in der Zeit von August 1999 bis Dezember 2002 durchgeführt.

Ganz besonders danke ich Herrn Professor Schwack für die interessante Aufgabenstellung, die intensive Betreuung, die vielen Diskussionen und Anregungen sowie für das harmonische und vertrauensvolle Arbeitsverhältnis.

Herrn Professor Vieths vom Paul-Ehrlich-Institut, Abteilung Allergologie danke ich für die Unterstützung bei der Durchführung der Elektrophorese und des Western-Blots sowie Herrn A. Conti von National Research Council in Turin für die Proteinsequenzierung.

Herrn Professor Wurster vom Institut für Physik und Meteorologie danke ich für die durchgeführten rasterelektronenmikroskopischen Untersuchungen.

Für die Aufnahme der FR/IR-Spektren danke ich Herrn A. Piry von der Firma Bruker Optik GmbH.

Der Graduiertenförderung des Landes Baden-Württemberg danke ich für die finanzielle Unterstützung, die mir in Form eines Promotionsstipendiums zuteil wurde.

ABKÜRZUNGEN

AS	Aminosäure
ASE	Accelerated Solvent Extraktion
BF ₃ /MeOH	methanolische Bortrifluorid Lösung
BSA	Rinderserumalbumin (Bovin Serum Albumin)
D	Depolymerisierung
Da	Dalton
DC	Dünnschichtchromatographie
D/H	Depolymerisierung/Hydrolyse
EA	Elementaranalyse
FT/IR	Fourier transforme Infrarotspektrometrie
GPC	Präparative Gelchromatographie
H	Hydrolyse
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie (High performance liquid chromatography)
IF	Isoelektrische Fokussierung
n	Anzahl der Wiederholungen
NC	Nitrocellulose
NP-SC	Präparative Normalphasen-Säulenchromatographie
ns LTP	nicht spezifische Lipid-Transfer-Proteine
OPA	orto-Phtaldialdehyd
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PVDF	Polyvinylidendifluorid
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
UV/VIS	Ultravioletter/Sichtbarer (Visible) Bereich des elektromagnetischen Spektrums
VK	Variationskoeffizient

INHALTSVERZEICHNIS

A	EINLEITUNG.....	9
1	DIE PFLANZLICHE CUTICULA	9
1.1	Aufbau der pflanzlichen Cuticula	9
1.1.1	Cutin	11
1.1.2	Cutan	12
1.1.3	Wachs	12
1.1.4	Stickstoff-Verbindungen	14
1.2	Zielsetzung	15
B	ERGEBNISSE	18
2	ELEMENTARANALYSE VON STICKSTOFF UND SCHWEFEL IN FRUCHTKUTIKELN.....	18
2.1	Isolierung von Fruchtkutikeln	18
2.2	Probenvorbereitung und Analytik	20
2.2.1	Stickstoff- und Schwefelgehalte in Apfelfruchtkutikeln	20
2.2.1.1	Enzymatisch isolierte Apfelkutikeln	20
2.2.1.2	Mechanisch isolierte Apfelkutikeln.....	21
2.2.2	Stickstoff- und Schwefelgehalte in Tomatenfruchtkutikeln.....	23
2.2.2.1	Enzymatisch isolierte Tomatenkutikeln	23
2.2.2.2	Mechanisch isolierte Tomatenkutikeln.....	24
2.3	Resümee	25
3	CUTICULA-AUFSCHLUSS.....	28
3.1	Protein-Hydrolyse	28
3.1.1	Apfelkutikeln	28
3.1.2	Tomatenkutikeln	32

3.2	Cutin-Depolymerisierung.....	35
3.2.1	Apfelkutikeln.....	35
3.2.2	Tomatenkutikeln.....	39
3.3	Resümee und Diskussion	42
4	LOKALISIERUNG DER KUTIKULAREN PROTEINE	47
4.1	Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen.....	47
4.2	FT/IR-Spektroskopie	49
4.2.1	Voruntersuchungen.....	50
4.2.2	FT/IR-mikroskopische Untersuchungen der Fruchtkutikeln.....	51
5	ISOLIERUNG KUTIKULARER PROTEINE	58
5.1	Extraktionsmethoden	58
5.2	Reinigung und quantitative Bestimmung der Proteine	60
5.2.1	Gel-Chromatographie	60
5.2.2	Ultrafiltration.....	62
5.3	Proteinbestimmung.....	62
6	CHARAKTERISIERUNG DER EXTRAHIERTEN PROTEINE	63
6.1	Molekulargewichtsbestimmung.....	63
6.2	Immunoblotting (Western-Blot)	66
6.3	N-terminale Aminosäuresequenzanalyse	67
6.4	Resümee.....	73
C	ZUSAMMENFASSUNG	74
D	EXPERIMENTELLER TEIL	78
7	ALLGEMEINES.....	78
7.1.1	Präparative Normalphasen-Säulenchromatographie (NP-SC).....	78
7.1.2	Präparative Gelchromatographie (GPC).....	78
7.1.3	Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC). Aminosäuren nach Derivatisierung mit ortho-Phthaldialdehyd (OPA).....	79

7.1.4	UV/VIS-Spektroskopie.....	80
7.1.5	Elementaranalyse (EA).....	80
7.1.6	Elektrophorese	80
7.1.7	Isoelektrische Fokussierung (IF)	81
7.1.8	Accelerated Solvent Extraktion (ASE).....	81
7.1.8.1	Methode 1	81
7.1.8.2	Methode 2	81
7.1.9	Hochauflösende Rasterelektronenmikroskopie	81
7.1.10	FT/IR-Mikroskop	82
7.1.11	Mikrotom.....	82
7.1.12	Proteinsequencer	82
7.1.13	Gefriermühle.....	82
7.1.14	Gefriertrocknungsanlagen	82
7.1.15	Ultrafiltrationsapparatur	83
7.1.16	Sonstige Apparaturen.....	83
7.2	Materialien.....	83
7.2.1	Reagenzien	83
7.3	Puffer und sonstige Lösungen.....	85
8	ISOLIERUNG DER APFEL- UND TOMATENFRUCHTKUTIKELN	86
8.1	Enzymatische Isolierung.....	86
8.2	Mechanische Isolierung.....	87
8.3	Stickstoff-/Schwefelbestimmung nativer Apfel- und Tomatenkutikeln	87
9	AUFSCHLUSSMETHODEN.....	88
9.1	Saure Hydrolyse (6 N Salzsäure).....	88
9.2	Depolymerisierung mit BF ₃ /MeOH	89
10	HERSTELLUNG DER PROBENSCHNITTE FÜR	91
10.1	Rasterelektronenmikroskopie	91
10.2	FT/IR-Mikroskopie	91
11	PROTEINEXTRAKTION	91

11.1	Extraktion mit Chloroform/Methanol.....	91
11.2	Extraktion mit Isopropanol/Wasser/Thioglycerin	92
11.3	Extraktion mit PBS-Puffer	92
11.4	Extraktion mit Tris-Puffer.....	92
11.4.1	Vorbereitung der Proben für die Gel Chromatographie.....	93
12	PROTEINANALYTIK.....	93
12.1	SDS-PAGE	93
12.1.1	Lämmli-Verfahren	94
12.1.2	Tricine-SDS-PAGE nach Schägger und von Jagow	95
12.1.2.1	Coomassiefärbung.....	95
12.1.2.2	Silberfärbung.....	96
13	SEMIDRY-BLOTTING VON PROTEIN.....	97
13.1	Semidry-Blotting auf PVDF-Membranen.....	97
13.2	Semidry-Blotting auf NC-Membranen	98
14	IMMUNOBLOT	98
14.1	Durchführung der Standardarbeitsschritte	99
15	PROTEINBESTIMMUNG NACH BRADFORD	100
E	LITERATURVERZEICHNIS.....	102