

Aufarbeitung von Filtrerrückständen bei  
der Bierherstellung zur Gewinnung  
einer innovativen pharmazeutischen  
Substanz

C. Zeppelzauer, K. Kühne

Berichte aus Energie- und Umweltforschung

**26/2007**

## **Impressum:**

Eigentümer, Herausgeber und Medieninhaber:  
Bundesministerium für Verkehr, Innovation und Technologie  
Radetzkystraße 2, 1030 Wien

Verantwortung und Koordination:  
Abteilung für Energie- und Umwelttechnologien  
Leiter: DI Michael Paula

Liste sowie Bestellmöglichkeit aller Berichte dieser Reihe unter <http://www.nachhaltigwirtschaften.at>

# Aufarbeitung von Filtrerrückständen bei der Bierherstellung zur Gewinnung einer innovativen pharmazeutischen Substanz

DI Claus Zeppelzauer  
Life Science Project Management

Klaus Kühne, Mag. Daniela Ettenauer,  
Mag. Martina Poglitsch  
Melbrosin International Produktions und  
Vertriebs GmbH & Co KG

Univ. Prof. Dr. Alois Jungbauer, DI Verena Beck,  
DI Alfred Zöchling  
Institut für Angewandte Mikrobiologie  
Universität für Bodenkultur Wien

Wien, Dezember 2005

**Ein Projektbericht im Rahmen der Programmlinie**



Impulsprogramm Nachhaltig Wirtschaften

Im Auftrag des Bundesministeriums für Verkehr, Innovation und Technologie



## Vorwort

Der vorliegende Bericht dokumentiert die Ergebnisse eines Projekts aus der Programmlinie FABRIK DER ZUKUNFT. Sie wurde im Jahr 2000 vom Bundesministerium für Verkehr, Innovation und Technologie im Rahmen des Impulsprogramms Nachhaltig Wirtschaften als mehrjährige Forschungs- und Technologieinitiative gestartet. Mit der Programmlinie FABRIK DER ZUKUNFT sollen durch Forschung und Technologieentwicklung innovative Technologiesprünge mit hohem Marktpotential initiiert und realisiert werden.

Dank des überdurchschnittlichen Engagements und der großen Kooperationsbereitschaft der beteiligten Forschungseinrichtungen und Betriebe konnten bereits richtungsweisende und auch international anerkannte Ergebnisse erzielt werden. Die Qualität der erarbeiteten Ergebnisse liegt über den hohen Erwartungen und ist eine gute Grundlage für erfolgreiche Umsetzungsstrategien. Anfragen bezüglich internationaler Kooperationen bestätigen die in FABRIK DER ZUKUNFT verfolgte Strategie.

Ein wichtiges Anliegen des Programms ist es, die Projektergebnisse – seien es Grundlagenarbeiten, Konzepte oder Technologieentwicklungen – erfolgreich umzusetzen und zu verbreiten. Dies soll nach Möglichkeit durch konkrete Demonstrationsprojekte unterstützt werden. Deshalb ist es auch ein spezielles Anliegen die aktuellen Ergebnisse der interessierten Fachöffentlichkeit zugänglich zu machen, was durch die Homepage [www.FABRIKderZukunft.at](http://www.FABRIKderZukunft.at) und die Schriftenreihe gewährleistet wird.

Dipl. Ing. Michael Paula  
Leiter der Abt. Energie- und Umwelttechnologien  
Bundesministerium für Verkehr, Innovation und Technologie



## Inhaltsverzeichnis

Kurzfassung (1 Seite).....	6
Abstract (1 Page).....	7
Kurzfassung (5 Seiten).....	8
Abstract (5 Pages).....	13
1 Einleitung.....	17
1.1 Beschreibung.....	17
1.2 Einführung.....	17
1.3 Programmlinie Fabrik der Zukunft.....	19
2 Rückblick:.....	20
2.1 Projektphasen.....	20
2.2 Beschreibung der wichtigsten Arbeitspakete.....	22
2.3 Änderungen entsprechend dem ursprünglichen Plan.....	23
2.4 Ergebnisse.....	24
2.4.1 Konzentrierungsverfahren im Labor.....	24
2.4.2 Konzentrierungsverfahren im Pilotmaßstab.....	26
2.4.3 Trocknungsversuche.....	28
2.4.4 Bestimmung der Polyphenole und ARP.....	29
2.4.5 Analyse der Inhaltsstoffe.....	29
2.4.6 Lipidtransferprotein.....	30
2.4.7 Bestimmung der östrogenen Aktivität.....	31
2.4.8 Untersuchungen zur pharmakologischen Aktivität der Substanz.....	33
2.4.9 Einreichung Verfahrenspatent.....	34
2.5 Aufgetretene Schwierigkeiten bei der Projektarbeit.....	34
2.5.1 Analyse der Inhaltsstoffe.....	34
2.5.2 Aufkonzentrierung der Substanz.....	35
2.5.3 Östrogene Aktivität.....	35
3 Schlussfolgerungen zu den Projektergebnissen.....	35
4 Literaturverzeichnis.....	37
5 Abbildungs-, Tabellen- und Formelverzeichnis.....	39
6 Materialliste.....	40





## **Kurzfassung (1 Seite)**

### **Aufarbeitung von Filtrerrückständen bei der Bierherstellung zur Gewinnung einer innovativen pharmazeutischen Substanz**

Bier enthält eine Reihe von pharmakologisch interessanten Wirkstoffen, die in geringen Konzentrationen anfallen. Dies sind insbesondere polyzyklische Verbindungen, deren Wirkung auf Transaktivierung der Steroidhormonrezeptoren und Interaktion mit Enzymen des Steroidstoffwechsels beruht. Diese Substanzen werden bei einem neuartigen Verfahren der Filterung mit einem Ionenaustauscher vom Bier zum Zwecke der Vermeidung von Kältetrib stark angereichert. Die anfallende Lösung muss im Normalfall entsorgt werden.

Das Ziel des Projektes war die Entwicklung eines Verfahrens zur Herstellung einer pharmakologisch aktiven Produktes aus diesen Filtrerrückständen und eine optimale Aufarbeitung von Abfallsubstanzen. Das entwickelte Konzept und die Technik für die Verwertung und Aufarbeitung von wertvollen Abfallprodukten wurde nach bestimmten technischen Adaptierungen, einem Screening der Inhaltsstoffe und Tests auf deren pharmakologische Aktivität für andere Betriebe der Lebensmittel- oder Naturstoffindustrie angewendet. Die Neuheit ist die gewinnbringende Verwertung des wertvollen Abfallproduktes.

Durch selektive Anreicherung und Konzentrierung des Filtrerrückstandes gelang es, die Inhaltstoffe anzureichern und eine Substanz mit antioxidativer Wirkung zu erhalten. Zum Vergleich wurden unterschiedliche Natursubstanzen auf gleiche Art und Weise aufgearbeitet und Aktivitätstests unterzogen.

Die Analyse der Inhaltstoffe des aufkonzentrierten Filtrerrückstands ergab, dass ein Lebensmittelallergen, das Lipidtransferprotein, angereichert wurde. Die Entfernung des Allergens aus der Substanz war zwar möglich, jedoch zeit- und kostenintensiv. Der Filtrerrückstand konnte dadurch nicht als Ausgangsbasis für ein Verzehrprodukt verwendet werden.

Das Aufbereitungsverfahren wurde in weiterer Folge auf andere natürliche Substanzen verlegt, deren Aktivitäten in ungewohnter Weise sehr hoch waren.

Die im Rahmen des Projektes durchgeführten Arbeiten bildeten die Basis für die Gründung des Christian Doppler Labors für Rezeptor Biotechnologie, das sich der Isolierung, Dedektion und Aufklärung der Struktur-Funktionsbeziehungen dieser natürlichen Substanzen widmet.

## **Abstract (1 Page)**

### **Processing of filter residues of the beer - brewing process for the production of an innovative pharmaceutical substance**

Beer contains a set of pharmacological interesting substances, which appear only in low concentrations. These are in particular polycyclic connections. Their effects are based on the transactation of the steroid-hormone-receptors and interaction with enzymes of the steroid metabolism.

With a new procedure of the filtering from beer these substances are strongly enriched. The purpose behind is to avoid the appearance of "cold-trub". Under normal conditions, these liquids have to be disposed.

The objective of this project was the development of a procedure for the production of a pharmacological active product out of residues of ion-exchangers.

The developed concept of this project and the technology for the utilization and processing of valuable waste products has been applied after certain technical adaptations, screening of the contents of the starting material and tests of their pharmacological activity for other enterprises of the food or natural substance industry.

By an selective enrichment and concentration of this residues, we were able to win a substance with a high antioxidative activity. Different other natural substances have been processed in the same way. Afterwards their activity has been compared with the activity of the residues.

The analysis of ingredients of the concentrate has shown, that a special food allergen, the lipid transfer protein, has been enriched in high amounts. It was possible to eliminate this allergen, but it was time-consuming and cost-intensive. The existence of this allergen is the reason, why that the substance is not qualified for being used as a food supplement.

The procedure has been adopted for other natural substances with very good results concerning their biological activity.

This work established the basis for the foundation of the Christian Doppler Laboratory for Receptor Biotechnology.

This laboratory investigates the isolation, dedection and structure function relationship of natural substances.

## **Kurzfassung (5 Seiten)**

### **Aufarbeitung von Filtrerrückständen bei der Bierherstellung zur Gewinnung einer innovativen pharmazeutischen Substanz**

Die neueste Technik bei der Filtration von Bier ist der Einsatz von Ionenaustauschern. Das Regenerat enthält in konzentrierter Form hochpotente Substanzen (Vitamine und Mineralstoffe aus der Hefe, Hopfenrückstände und andere Proteinverbindungen), die im Normalfall entsorgt werden müssen.

Ziel des Projektes war die gewinnbringende Verwertung dieses wertvollen Abfallproduktes, die Analyse der Inhaltstoffe und Definition einer Leitsubstanz, die Charakterisierung der biologischen Aktivitäten, die Herstellung eines Verzehrproduktes und die Erlangung eines Verfahrenspatentes für die Aufarbeitung.

Nach einer technischen Adaptierung soll dieses Konzept der Aufarbeitung in anderen Bereichen der Lebensmittel- und Naturstoffindustrie angewendet.

#### **Ausgangssituation**

Bier enthält eine Reihe von pharmakologisch interessanten Werkstoffen, die in geringen Konzentrationen anfallen. Dies sind insbesondere polyzyklische Verbindungen, deren Wirkung auf Transaktivierung der Steroidhormonrezeptoren und Interaktion mit Enzymen des Steroidstoffwechsels beruht. Diese Substanzen werden bei einem neuartigen Verfahren der Filterung von Bier zum Zwecke der Vermeidung von Kälte trub stark angereichert. Dies konnte in Vorversuchen eindeutig festgestellt werden.

Die hormonelle Wirkung von Bier und Hopfen ist seit langem bekannt. Isoflavone und 8-Naringenylprenin werden dafür verantwortlich gemacht obwohl es noch eine Reihe anderer hormoneller Substanzen im Bier vorhanden sind, deren chemische Struktur noch nicht aufgeklärt ist. Die Isoflavone stammen von der Gerste, 8-Naringenylprenin vom Hopfen. Wie in anderen Pflanzen kommen die Polyphenole auch an Zucker gebunden vor. In welchem Ausmaß diese Konjugate durch den Brauprozess gespalten werden ist noch völlig ungeklärt. Entscheidend ist, dass nur die freie Form hormonelle Wirkung besitzt

#### **Zur Entstehung der Biertrübung**

Die Polyphenole des Braumalzes, die zu etwa 80-85% den Würzekochprozess überdauern, zeigen erst in den anschließenden Phasen der Würze- und Bierbereitung, unterstützt durch Oxidationsvorgänge, eine stärkere Reaktion. Von 17 in der Würze aufgefundenen Flavonoiden konnten im Bier keine Nachweise erbracht werden, während 9 Flavonoide wohl im Bier, nicht jedoch in der Würze nachweisbar sind. Zu den wichtigsten Vorstufen der Biertrübung gehören Anthocyanogene und Catechine.

In der Regel hat die Biertrübung folgende Zusammensetzung:

Teilchengröße	5-50x10 <sup>-5</sup> mm
Protein	45-65%
Polyphenol	30-45%
Kohlehydrate	2-4%
Mineralstoffe	1-2%

Die Bildung der nichtbiologischen Biertrübung wird bereits bei einer Konzentration von einigen ml/l von folgenden polyphenolartigen Stoffen beeinflusst:

Pyrocatechin, Pyrogallol, Phloroglucin, Gallussäure, Chlorogensäure, Kaffesäure u.a.

Quercetin soll am befähigsten sein, eine irreversible Biertrübung zu bilden. Die polyphenolartigen Stoffe mit einigen freien Hydroxylgruppen bilden einen Komplex mit einem verhältnismäßig hohen Eiweißanteil, während der stark kondensierte Polyphenoltyp eine relativ geringe Anzahl freier Hydroxylgruppen besitzt.

### **Zielsetzung**

Ziel des Projektes war die Entwicklung eines Verfahrens zur Herstellung einer pharmakologisch aktiven Produktes aus diesen Filtrerrückständen. Die Ziele der Teilarbeiten waren

- (1) Chemische Charakterisierung der Inhaltsstoffe mit reversed phase HPLC, Kapillarelektrochromatographie und Massenspektrometrie.
- (2) Biologische Charakterisierung des Filtrerrückstandes mit entsprechenden in-vitro Tests um die transaktivierende Wirkung auf Steroidhormonrezeptoren (Interaktion mit Steroidbiosynthese) und canceroprotektive Wirkung quantifizieren zu können.
- (3) Toxikologische und mikrobiologische Untersuchungen und Bestimmungen des allergenen Potentials.
- (4) Entwicklung eines Konzentrierungsverfahrens im Labormaßstab und Scale up dieses Verfahrens.
- (5) Trocknung des Regenerates im Labormaßstab (Dünnschichttrocknung, Vakuumtrocknung bzw. Vakuumverdampfung, Lyophilisation)
- (6) Aufbau einer Inprozeß- und Qualitätskontrolle.
- (7) Ökonomische Untersuchungen

Durch selektive Anreicherung und Konzentrierung des Filtrerrückstandes sollte eine hochpotente, pharmakologisch wirksame Substanz gewonnen werden. Diese bildet die Basis für die Herstellung eines Verzehrproduktes oder eines pharmazeutischen Präparates mit einem sehr breiten Wirkungsspektrum wie zum Beispiel bei Akne, in den Wechseljahren oder bei Magen-Darm-Beschwerden.

### **Methodische Vorgehensweise und Technik**

Diese Klasse der Naturstoffe wird am besten mit HPLC und/oder Kapillarelektrochromatographie (CEC) aufgetrennt. Zum eindeutigen Nachweis ist Massenspektroskopie notwendig. Die CEC erlaubt auf Grund ihrer höheren Trennleistung eine gleichzeitige Auftrennung der freien polyphenolischen Verbindungen und der Konjugate. Die

ältere Methode GC-MS ist nicht geeignet, weil während der Derivatisierungsreaktion, die im sauren Milieu verläuft, die Konjugate teilweise gespalten werden. Dies führt zu unrichtigen Ergebnissen an Gehalt an freien Polyphenolen.

Um diese interessanten Substanzen gewinnen zu können, müsste man Hopfenextrakte oder Malz weiter verarbeiten. Dies wäre aber nicht wirtschaftlich weil die interessanten Substanzen in zu geringer Konzentration vorkommen.

Eine neue Art der Bierstabilisierung stellt eine kostengünstige Variante dar um diese wertvollen Substanzen gewinnen zu können. Bei dieser Art der Bierstabilisierung wird das fertige Bier vor der Lagerung über ein Ionenaustauscherbett gepumpt. Dieser Ionentauscher besteht aus ca. 300 µm großen Agarosepartikeln, die diese Substanzen adsorbieren, die für den Kälte trub verantwortlich sind. Zusätzlich haben wir festgestellt dass auch die Substanzen, die für die hormonelle Wirkung verantwortlich sind adsorbiert werden. Diese können dann aus dem Regenerat gewonnen werden. Das Verfahren hat den Vorteil, ein "Abfallprodukt" als Ausgangsmaterial zur Herstellung einer Werts substanz verwendet wird. Das "Abfallprodukt" Regenerat muss nur weiterverarbeitet werden. Dieses Regenerat müsste sonst entsorgt werden. Da Bier hygienisch einwandfrei, dem Lebensmittelkodex entsprechend, hergestellt werden muss, eignet sich das Regenerat für die Herstellung eines Nahrungsmittelergänzungsmittels oder Arzneimittels.

Weitere technologische Vorteile des Verfahrens sind:

- Ausgangsmaterial "Regenerat" liegt in flüssiger Form vor und muss nicht weiter verarbeitet werden.
- Das Regenerat fällt in großen Mengen an.
- Das Regenerat liegt in einer hoch konzentrierten Salzlösung vor und ist stabil.

## **Ergebnisse**

Die selektive zwanzigfache Anreicherung der Inhaltsstoffe im Labormaßstab mittels Ultrafiltrationsanlage weist reproduzierbare, gute Ergebnisse auf. Die Ultrafiltration wurde mit unterschiedlichen Ausschlussgrößen durchgeführt, wobei sich eine Membran mit einer Ausschlussgröße von 1000 kD als zielführend erwiesen hat. Bei Membranen mit einer geringeren Ausschlussgröße verlängerte sich die Prozesszeit ohne ein messbar besseres Ergebnis zu erzielen. Es gelingt, nahezu alle in der Ausgangsprobe enthaltenen Polyphenole anzureichern.

Untersuchungen mittels Elektrophorese haben gezeigt, dass das Proteinmuster der Ausgangsprobe erhalten bleibt und die für das Projekt bedeutenden Substanzen angereichert werden.

Der Gehalt an Polyphenolen in dem flüssigen Konzentrat beträgt >10mg/ml. Dieser Gehalt entspricht dem Gehalt eines neuartigen, Polyphenol-angereicherten Gesundheitsgetränkes der Firma MasterFoods, welches jedoch nur in England auf dem Markt ist.

Versuche bei denen der Maßstab vergrößert wurde, wurden positiv mit reproduzierbaren Ergebnissen durchgeführt. Als schwierig zu beherrschen erwiesen sich die Filterstandzeiten.

Durch die Vielfalt der Inhaltsstoffe sind die Untersuchungen zur chemischen Natur und deren eventuelle Bedeutung als Wertstoff durchgeführt worden. Im Rahmen des Projektes wurden nur wenige Einzelsubstanzen charakterisiert.

Eine charakterisierte Substanz ist das Lipidtransferprotein, welches ein Lebensmittelallergen ist.

Bei der biologischen Charakterisierung konnte in einem Hefetestsystem keine östrogene Aktivität nachgewiesen werden. Die Ergebnisse lagen in allen Proben unter der Nachweisgrenze des Tests. Die Nachweisgrenze wurde als Blindwert plus die dreifache Standardabweichung des Blindwertes berechnet. Aus diesem Ergebnis kann man schließen, dass die analysierten Bierproben keine Substanzen enthalten, die im Hefetestsystem die Transaktivierung der  $\beta$ -Galactosidase bewirken können. In früheren Versuchen wurde schwache östrogene Aktivität in Bier festgestellt.

Die derzeitigen Daten lassen auf einen anderen Wirkungsmechanismus schließen, der in Zukunft im Christian Doppler Labor für Rezeptorbiotechnologie untersucht wird.

Die Neuheit ist die gewinnbringende Verwertung des wertvollen Abfallproduktes und die Etablierung eines Verfahrens, das in unterschiedlichen Bereichen der Naturstoffindustrie angewendet werden kann.

Durch die Charakterisierung und Weiterverarbeitung dieser Substanz wurde ein Produkt mit natürlichen Inhaltsstoffen gewonnen, das im Sektor Verzehrprodukte eingesetzt werden sollte. Die Analyse der Inhaltstoffe des aufkonzentrierten Filtrerrückstands ergab jedoch, dass ein Lebensmittelallergen, das Lipidtransferprotein, angereichert wurde.

Die Entfernung des Allergens aus der Substanz war zwar möglich, jedoch zeit- und kostenintensiv. Der Filtrerrückstand konnte dadurch nicht wie ursprünglich geplant, als Ausgangsbasis für ein Verzehrprodukt verwendet werden.

Das Aufarbeitsverfahren wurde in weiterer Folge auf andere natürliche Substanzen verlegt, deren Aktivitäten in ungewohnter Weise sehr hoch waren.

Die im Rahmen des Projektes durchgeführten Arbeiten bildeten die Basis für die Gründung des Christian Doppler Labors für Rezeptor Biotechnologie, das sich der Isolierung, Dedektion und Aufklärung der Struktur-Funktionsbeziehungen dieser natürlichen Substanzen widmet.

### **Status**

Das vorliegende Projekt ist beendet, die Arbeiten mit anderen, natürlichen Substanzen werden im Rahmen des Christian Doppler Labors für Rezeptorbiotechnologie weitergeführt.

Es gelang, eine Substanz zu isolieren und konzentrieren, in der jedoch ein Lebensmittelallergen nachgewiesen wurde, dessen Entfernung zwar möglich, jedoch nicht wirtschaftlich war.

Das entwickelte Verfahren wird auf andere Substanzen angewendet.

### **Schlussfolgerung**

Der generelle Nachteil eines Naturstoffes liegt in der Variabilität des Ausgangsmaterials. Die pharmakologische Wirkung wird nicht durch einen einzelnen definierten Wirkstoff wie bei einem konventionellen Pharmazeutikum erzeugt. Hinzu kommt, dass bei Anreicherungsverfahren auch Allergene angereichert werden können, die ein Knock-out-Kriterium für eventuelle Produkte darstellen.

Dennoch ist die Erforschung der Inhaltstoffe und Wechselwirkungen von Naturstoffen ein hoch interessantes Forschungsgebiet.

Ohne der Durchführung des vorliegenden Projektes wäre nicht die Basis für das Christian Doppler-Labor für Rezeptorbiotechnologie gelegt worden.

## **Abstract (5 Pages)**

### **Processing of filter residues of the beer - brewing process for the production of an innovative pharmaceutical substance**

The latest technology for the filtration of beer is the use of ion exchangers. The reclaim which must be disposed under normal conditions, contains high-potent substances (vitamins and minerals from the yeast, hops and other proteins) in concentrated form.

The main aim of this project was the profitable utilization of this valuable waste product, the analysis of the ingredients and the definition of a leading substance, the characterisation of the biological activities, the production of a food supplement and the acquisition of a process patent for the processing.

After a technical adaptation this concept can be used within other ranges of the food and natural substance industry.

#### **Starting position**

Beer contains a set of pharmacologically interesting substances, which appear only in low concentrations. These are in particular polycyclic connections. Their effects are based on the transactivation of the steroid-hormone-receptors and interaction with enzymes of the steroid metabolism.

With a new procedure of the filtering from beer these substances are strongly enriched. The purpose behind is to avoid the appearance of "cold-trub".

The hormonal effect of beer and hop is well known for a long period. Isoflavones and 8-Naringenylprenin are made responsible for this. Although there are still a high number of other hormonal substances in the beer present, whose chemical structure is not yet enlightened. The isoflavones come from the barley and 8-Naringenylprenin from the hops.

As in other plants the polyphenols occur also bound to sugars. In which extent this conjugates are split during the brewing process is still completely uncertain. But it is crucial that only the free form shows the hormonal effect.

#### **Origin of the beer turbidity**

The polyphenols of the barley, which come through the process of wort cooking to approximately 80-85%, show in the following phases of the brewing process, supported by oxidation procedures, a stronger reaction. No proofs could be made for 17 flavonoids found in the wort, but 9 flavonoids could be detected in the beer, not however in the wort. Anthocyanogens and catechins belong to the most important preliminary stages of beer turbidity.



Usually the beer turbidity has the following composition:

Particle size	5-50x10 <sup>-5</sup> mm
Proteins	45-65%
Polyphenols	30-45%
Carbohydrates	2-4%
Minerals	1-2%

The origin of non-biological beer turbidity is already affected by a concentration of some ml/l by the following materials, which act like polyphenols:

Pyrocatechin, pyrogallol, phloroglucin, gallus acid, chlorogene acid, coffee acid etc.

Quercetin is the most potent substance to cause irreversible beer turbidity. The

Polyphenol-like substances with some free hydroxyl groups form a complex with a relatively high protein portion, while the strongly condensed type of polyphenols possesses a relatively small number of free hydroxyl groups.

### **Objective**

The objective of this project was the development of a procedure for the production of a pharmacological active product out of residues of ion-exchangers.

The aims of the single sections have been

- (1) Chemical characterisation of the contents with reversed phase HPLC, capillary electrical chromatography (CEC) and mass spectrometry.
- (2) Biological characterisation of the residues of ion-exchangers with appropriate in-vitro tests to be able to quantify the transactivating effect on steroid-hormone-receptors (interaction with steroid-biosyntheses) and a possible cancer-protective effect.
- (3) Toxicological and microbiological investigations and determination of the allergic potential.
- (4) Development of a method for up-concentration in laboratory scale.
- (5) Structure of ipc's and quality control.
- (6) Economic investigations.

A high-potent, pharmacological effective substance could be won by selective enrichment and concentration of the residues of ion-exchangers. This is the basis for the production of a food supplement or a pharmaceutical preparation with a very wide range of indications, for example acne, in menopause or with stomach and intestine complaints.

### **Methodical proceeding and technology**

The best way to isolate this class of the natural substances is the use of HPLC and/or capillary electrical chromatography (CEC). The clear proof of these substances has to be done with mass spectroscopy. Due to its higher separative power the CEC permits a simultaneous isolating of the free polyphenolic connections and the conjugates. The older method of GC-MS is not suitable, because during the reaction of derivatisation, which runs in the sour environment, the conjugates could be split. The result of the content of free polyphenols is incorrect with this method.

In order to be able to win these interesting substances in a normal way, one would have to process hop extracts and the barley. Economically this would be not useful, because the interesting substances occur in the raw material in to small concentration.

A new kind of beer stabilization represents an economical interesting variant to be able to win these valuable substances. With this kind of beer stabilization the beer is pumped over an ion-exchanger before it is stored in a tank. This ion-exchanger consists of approx 300 µm large particles of agarose, which adsorb these for the "cold-trub" responsible substances. Additionally we have determined that the substances, which are responsible for the hormonal effect, are adsorbed also. These can be won then from the residues of ion-exchangers. The procedure has the big advantage, that as the raw material of this value substance a "waste product" is used. The "waste product" must be only processed. Otherwise it has to be disposed. Beer is hygienically perfect; it must be produced according to the Codex Alimentarius Austriacus. Therefore the residues of the ion-exchangers are suitable for the production of a food supplement or a pharmaceutical preparation.

Further technological advantages of the procedure are:

- The raw material is present in liquid form and must further be not processed.
- Residues of ion-exchangers are available in large quantities.
- Residues of ion-exchangers are highly concentrated salt solutions and are stable.

## **Results**

The selective enrichment of the ingredients by the mean of ultra filtration in laboratory scale has shown good results.

The ultra filtration was conducted with different exclusion sizes, whereby a diaphragm with an exclusion size of 1000 kD showed the best results. With diaphragms with a smaller exclusion size the process time increased without a measurably better result. Almost all polyphenols of the sample are enriched due to this process step.

Investigations by means of electrophoresis showed that the proteins remain stable within the sample and that the important substances (e.g. polyphenols) are enriched.

The content of polyphenols in the liquid concentrate is about >10mg/ml. This content corresponds to the content of a new, polyphenol-enriched health beverage of Master Foods. But this drink is only sold in Great Britain.

The scale up process of the filtration has been successful with reproducible results. But it was difficult to control the filter running time.

Due to the variety of the contents of the substance, investigations to chemical nature and their possible meaning have been accomplished. In the context of the project only a few single substances have been identified and characterised.

One of the characterized substances is the lipid transfer protein, which is a food allergen.

The biological characterisation by the means of a yeast strain test system showed no estrogenic activity. The results in all samples were under the detection limit of the test system. The detection limit was calculated as blank value plus the three-way standard deviation of the blank value. From this result we can conclude that the analyzed beer samples do not contain

substances, which can cause the Tran activation of the  $\beta$ -Galactosidase in the yeast test system. In earlier attempts a weak oestrogen activity in beer was determined.

The present data suggest, that another mechanism of action is responsible for a possible biological action.

A product with natural occurring contents materials has been won by the characterisation and subsequent treatment of this substance, which should be used in the sector of food supplements or, depending on the strength of the pharmacological activity as pharmaceutical preparation.

The result of the analysis of the ingredients was, that a food allergen – the lipid-transfer-protein - has been enriched.

It was possible to remove the allergen but it was time-consuming and cost-intensive. Due to this fact it was no more possible to use this substance as a food supplement.

The process has been adopted for other natural substances. The results concerning activity have shown interesting results. The biological activity was very intensive.

This work established the basis for the foundation of the Christian Doppler Laboratory for Receptor Biotechnology. In the future this laboratory will investigate the isolation, detection and structure function relationship of natural substances.

### **Project - status**

The work on this project is finished. The Christian Doppler Laboratory for Receptor Biotechnology will work with the results in the future.

It was possible to isolate a substance out of the filter residues and to concentrate this substance. The lipid-transfer-protein, a food allergen has been enriched in high amounts. It was possible to eliminate this protein, but it was not economically.

The process has been adopted and will be used for the isolation of other natural substances.

### **Conclusion**

The general disadvantage of a natural substance is in the variability of the raw material. The pharmacological effect is not caused by an individual defined active substance like in the conventional pharmaceutical industry. The effect is based on a great variety of substances.

By using different concentration processes, even food allergens could be enriched. In most cases this is a knock-out-criteria for a product.

Nevertheless the study of the different contents of natural materials and their interactions is interesting and important for the future.

Without the results of this project the starting basis for the Christian Doppler laboratory for receptor biotechnology would not have been put.

# **1 Einleitung**

## **1.1 Beschreibung**

Bier enthält eine Reihe von pharmakologisch interessanten Werkstoffen, die in geringen Konzentrationen anfallen. Dies sind insbesondere polyzyklische Verbindungen, deren Wirkung auf Transaktivierung der Steroidhormonrezeptoren und Interaktion mit Enzymen des Steroidstoffwechsels beruht. Diese Substanzen werden bei einem neuartigen Verfahren der Filterung von Bier zum Zwecke der Vermeidung von Kältetrub stark angereichert. Das Auftreten von Kühltrub stellt bei unsachgemäßer Lagerung von Bier ein qualitätsminderndes Problem dar.

Nach diesem Verfahrensschritt muss, je nach der Dimensionierung des Ionenaustauschers dieser regeneriert werden. Das Regenerat ist als Abfallprodukt zu behandeln.

Das im Rahmen des Projektes entwickelte Konzept und die Technik für die Verwertung und Aufarbeitung von wertvollen Abfallprodukten kann nach bestimmten technischen Adaptierungen, einem Screening der Inhaltsstoffe und Tests auf deren pharmakologische Aktivität für andere Betriebe der Lebensmittel- oder Naturstoffindustrie angewendet werden.

Ziel des Projektes war die Entwicklung eines Verfahrens zur Herstellung einer pharmakologisch aktiven Produktes aus den Filtrückständen. Die Ziele der Teilarbeiten waren

- (1) Chemische Charakterisierung der Inhaltsstoffe mit reversed phase HPLC, Kapillarelektrochromatographie (23,28) und Massenspektrometrie.
- (2) Biologische Charakterisierung des Filtrückstandes mit entsprechenden in-vitro- Tests um die transaktivierende Wirkung auf Steroidhormonrezeptoren (Interaktion mit Steroidbiosynthese) und canceroprotektive Wirkung quantifizieren zu können.
- (3) Toxikologische und mikrobiologische Untersuchungen und Bestimmungen des allergenen Potentials.
- (4) Entwicklung eines Konzentrierungsverfahrens im Labormaßstab.
- (5) Aufbau einer Inprozeß- und Qualitätskontrolle.
- (6) Ökonomische Untersuchungen

Durch selektive Anreicherung und Konzentrierung des Filtrückstandes sollte eine hochpotente, pharmakologisch wirksame Substanz gewonnen werden. Diese bildet die Basis für die Herstellung eines Verzehrproduktes oder eines pharmazeutischen Präparates mit einem sehr breiten Wirkungsspektrum wie zum Beispiel bei Akne, in den Wechseljahren oder bei Magen-Darm-Beschwerden (3-20).

## **1.2 Einführung**

Es gibt eine Reihe von Naturstoffen, welche die Steroidgenese beeinflussen sowie die Steroidrezeptoren aktivieren zu vermögen. Diese sind die Basis für natürliche Extrakte zur Behandlung oder Milderung vieler steroidhormonabhängigen Erkrankungen. Diese Präparate werden meist als Nahrungsergänzungsmittel eingesetzt. Ausgangsmaterialien für diese Präparate sind Soja, Rotklee und die Wurzel der Silbertraubenkerze (21).

Die hormonelle Wirkung von Bier und Hopfen ist seit langem bekannt (1). Isoflavone und 8-Naringenylprenin werden dafür verantwortlich gemacht obwohl es noch eine Reihe anderer hormoneller Substanzen im Bier vorhanden sind, deren chemisch Struktur noch nicht aufgeklärt ist (1). Die Isoflavone stammen von der Gerste, 8-Naringenylprenin vom Hopfen. Wie in anderen Pflanzen kommen die Polyphenole auch an Zucker gebunden vor. In welchem Ausmaß diese Konjugate durch den Brauprozess gespalten werden ist noch völlig ungeklärt. Entscheidend ist, dass nur die freie Form hormonelle Wirkung besitzt.

Diese Klasse der Naturstoffe wird am besten mit HPLC und/oder Kapillarelektrochromatographie (CEC) aufgetrennt (24). Zum eindeutigen Nachweis ist Massenspektroskopie notwendig. Die CEC erlaubt auf Grund ihrer höheren Trennleistung eine gleichzeitige Auftrennung der freien polyphenolischen Verbindungen und der Konjugate (25,26,27). Die ältere Methode GC-MS ist nicht geeignet, weil während der Derivatisierungsreaktion, die im sauren Milieu verläuft, die Konjugate teilweise gespalten werden. Dies führt zu unrichtigen Ergebnissen an Gehalt an freien Polyphenolen.

Um diese interessanten Substanzen gewinnen zu können, müsste man Hopfenextrakte oder Malz weiter verarbeiten. Dies wäre aber nicht wirtschaftlich weil die interessanten Substanzen in zu geringer Konzentration vorkommen.

Eine neue Art der Bierstabilisierung stellt eine kostengünstige Variante dar um diese wertvollen Substanzen gewinnen zu können. Bei dieser Art der Bierstabilisierung wird das fertige Bier vor der Lagerung über ein Ionenaustauscherbett gepumpt. Dieser Ionentauscher besteht aus ca. 300 µm großen Agarosepartikeln, die diese Substanzen adsorbieren, die für den Kältetraub verantwortlich sind. Zusätzlich haben wir festgestellt dass auch die Substanzen, die für die hormonelle Wirkung verantwortlich sind adsorbiert werden. Diese können dann aus dem Regenerat gewonnen werden. Das Verfahren hat den Vorteil, ein "Abfallprodukt" als Ausgangsmaterial zur Herstellung einer Wertsubstanz verwendet wird. Das "Abfallprodukt" Regenerat muss nur weiterverarbeitet werden. Dieses Regenerat müsste sonst entsorgt werden. Da Bier hygienisch einwandfrei, dem Lebensmittelkodex entsprechend, hergestellt werden muss, eignet sich das Regenerat für die Herstellung eines Nahrungsmittelergänzungsmittels oder Arzneimittels.

Weitere technologische Vorteile des Verfahrens sind:

- Ausgangsmaterial "Regenerat" liegt in flüssiger Form vor und muss nicht weiter verarbeitet werden.
- Das Regenerat fällt in großen Mengen an.
- Das Regenerat liegt in einer hoch konzentrierten Salzlösung vor und ist stabil.

Die Neuheit ist die gewinnbringende Verwertung des wertvollen Abfallproduktes.

Durch die Charakterisierung und Weiterverarbeitung dieser Substanz wird ein Produkt mit natürlichen Inhaltsstoffen gewonnen, das im Sektor Verzehrprodukte oder, abhängig von der Stärke der pharmakologischen Aktivität als pharmazeutisches Präparat eingesetzt werden kann.

Der generelle Nachteil eines Naturstoffes liegt in der Variabilität und der Variabilität des Ausgangsmaterials. Die pharmakologische Wirkung wird nicht durch einen einzelnen definierten Wirkstoff wie bei einem konventionellen Pharmazeutikum erzeugt.

Die Wirkung basiert auf einer Vielzahl von Substanzen. Dies bedingt einen viel höheren Aufwand zur Charakterisierung aber auch Inprozesskontrolle. Das Produktionsverfahren muss

sehr genau standardisiert werden und es müssen Strategien entwickelt werden, welche die saisonellen Schwankungen des Ausgangsmaterials auszugleichen vermögen

### **1.3 Programmlinie Fabrik der Zukunft**

Die Grundzutaten von Bier sind alle natürlichen Ursprungs. Anfallenden Abfallprodukte, wie z. B.: der Treberkuchen werden in der Schweinemast verwertet. Das anfallende Regenerat des Ionenaustauschers stellt eine Quelle natürlicher Rohstoffe dar, die in diesem Maß auf wirtschaftliche Weise nicht gewonnen werden können.

Die Aufgabenstellung dieses Projektes, die Entwicklung von Schlüsseltechnologien zur Nutzung eines Reststoffes und die Möglichkeit einer technischen Nutzung von Rohstoffen (in diesem Fall die Nutzung von pflanzlichen Wirkstoffen) entspricht der Zielsetzung der 2. Ausschreibung der „Fabrik der Zukunft“.

## 2 Rückblick:

### 2.1 Projektphasen

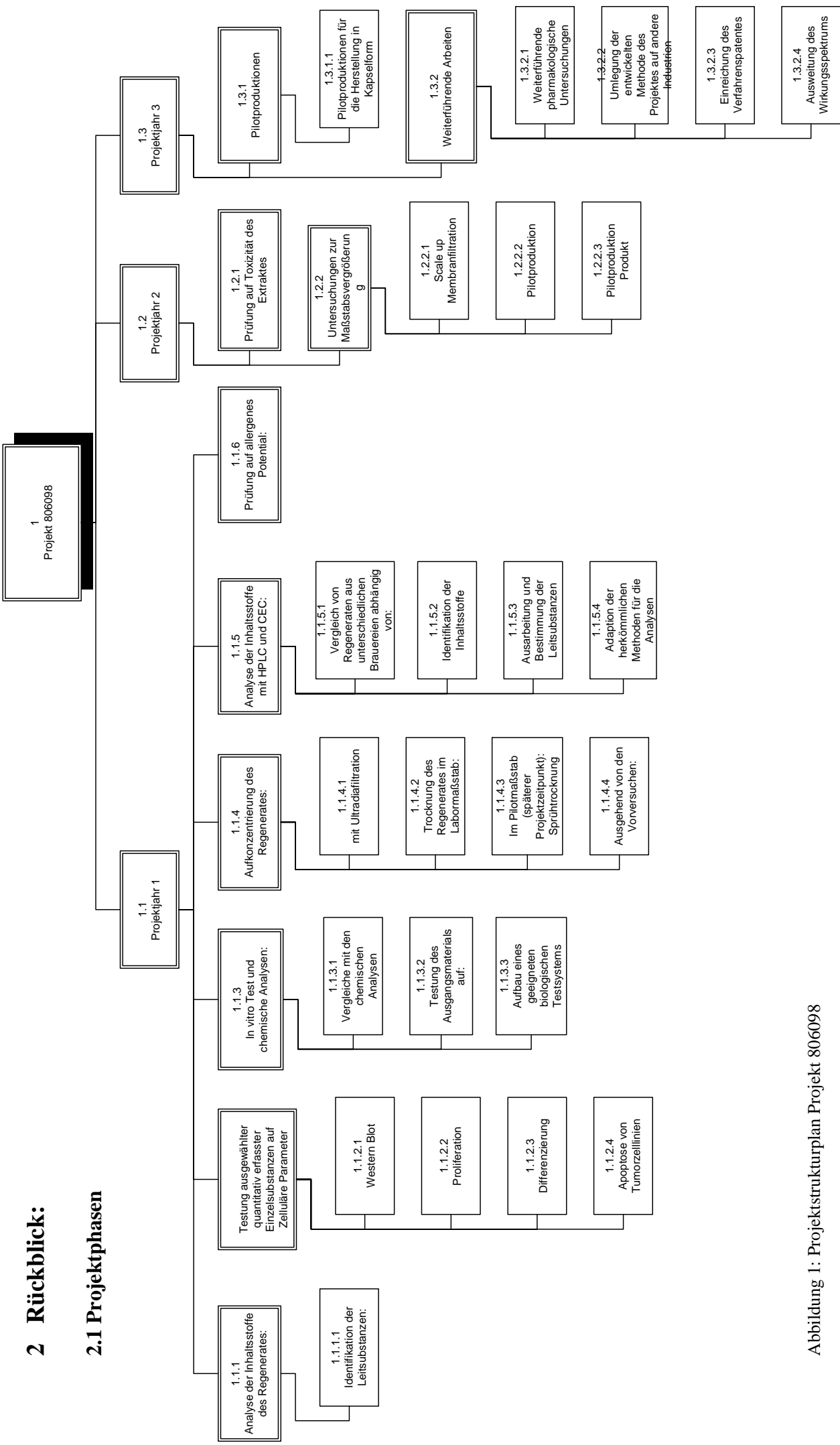


Abbildung 1: Projektstrukturplan Projekt 806098

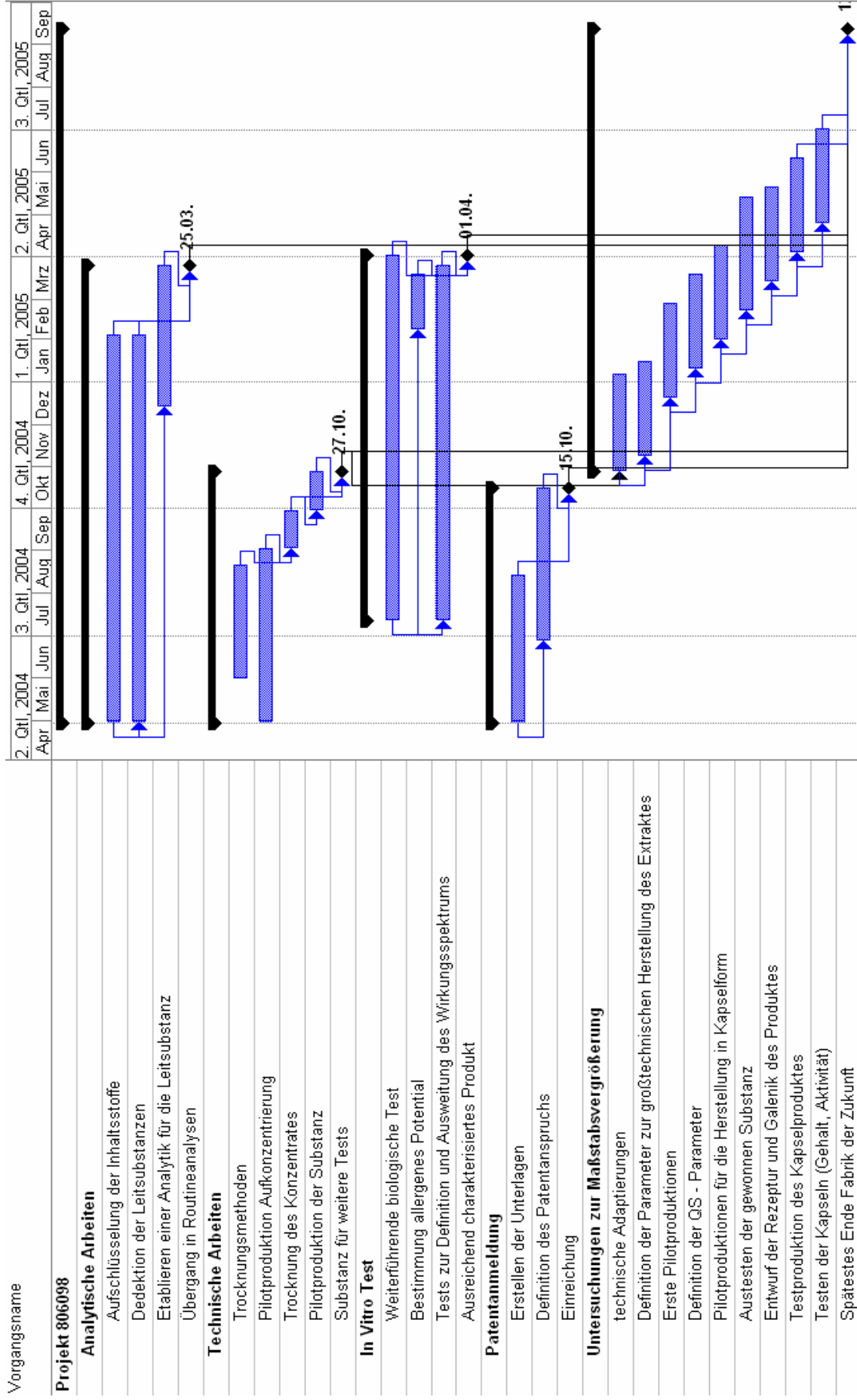


Tabelle 1: Arbeitsplan Projekt 806098, Stand April 2004



## 2.2 Beschreibung der wichtigsten Arbeitspakete

### (1) Analyse der Inhaltsstoffe

Für die Analyse der Inhaltsstoffe wurde sehr viel Zeit verwendet. Auf Grund der Vielzahl der Inhaltsstoffe wurden nur eine geringe Anzahl an Leitsubstanzen identifiziert. Zwei Gerstenproteine, dabei das Lipid-Transfer-Protein, ein Lebensmittelallergen konnte definitiv nachgewiesen werden, die jedoch keinen Einfluss auf die Wirkung des gewonnenen Konzentrates haben.

### (2) Vitaminanalytik

Die Annahme, dass sich in dem Regenerat bedeutende Mengen an Vitamin D befinden, hat sich nicht bestätigt. Eine intensive Literaturrecherche führte dazu, dass keine weiterführende Analytik für Vitamin D durchgeführt wurde.

### (3) Untersuchungen zum Wirkungsspektrum

Siehe Punkt 8

### (4) Verfahren zur Aufkonzentrierung

Die Auswahl und Test der Verfahren für das Aufkonzentrieren im Labormaßstab wurden durchgeführt. Mittels Ultramikrofiltration kann aus dem Regenerat eine zwanzigfach aufkonzentrierte Substanz gewonnen werden. Die Analyse der enthaltenen Polyphenole zeigt, dass diese Methode geeignet ist, um diese anzureichern.

### (5) Bestimmung der Toxizität

Durch das Fehlen von einer standardisierten Endsubstanz und des Vorhandenseins eines Lebensmittelallergens wurden diese Untersuchungen nicht durchgeführt.

### (6) Bestimmung des allergenen Potentials

Da ein Lebensmittelallergen vorhanden ist, wurde diese Untersuchung nicht durchgeführt. Es wurden Versuche gemacht um das Allergen zu entfernen, diese waren aber wirtschaftlich nicht sinnvoll.

### (7) Pharmazeutische Formgebung – Probenherstellung

Siehe Punkt 6. Die Zielsetzung ist, eine pulverförmige Substanz zu entwickeln, die das gleiche Wirkungsspektrum wie das Konzentrat aufweist.

### (8) In vitro Test und chemische Analysen

Das Regenerat und unterschiedliche Konzentrate wurden auf deren Wirkung auf die Steroidhormonrezeptoren getestet. Ebenso wurde das antioxidative Potential der Substanzen getestet.

(9) Untersuchungen zur Maßstabsvergrößerung

Es wurden Versuche im Technikum der Firma Millipore in Frankreich durchgeführt. Das Ergebnis war reproduzierbar, das Konzentrat hatte das gleiche Proteinmuster wie das der Laborversuche.

(10) Standardisierung nach Leitsubstanzen

Die Arbeiten am Konzentrat wurden eingestellt. Es sind >700 hochmolekulare Polyphenole im Regenerat bzw. Konzentrat vorhanden. Siehe Punkt 1.

### **2.3 Änderungen entsprechend dem ursprünglichen Plan**

Um die biologische Aktivität des Konzentrates zu testen wurde das Aufbereitungsverfahren auf andere Natursubstanzen angewendet, die im Vergleich zur ursprünglichen Ausgangssubstanz wesentlich aktiver waren.

Durch die Identifikation des Lipid-Transfer-Proteins und die Wirkung als Lebensmittelallergen wurde – obwohl ein Projektabbruch zur Diskussion stand - der Fokus vermehrt auf diese Substanzen gelegt. Da die Wirkungsmechanismen für natürliche Produkte, die vom Projektträger entwickelt und vertrieben werden sehr interessant ist, entwickelte sich daraus die Idee, im Rahmen eines CD Labors weitere Forschung zu betreiben.

Die Arbeiten im Rahmen des Projektes wurden Ende September beendet.

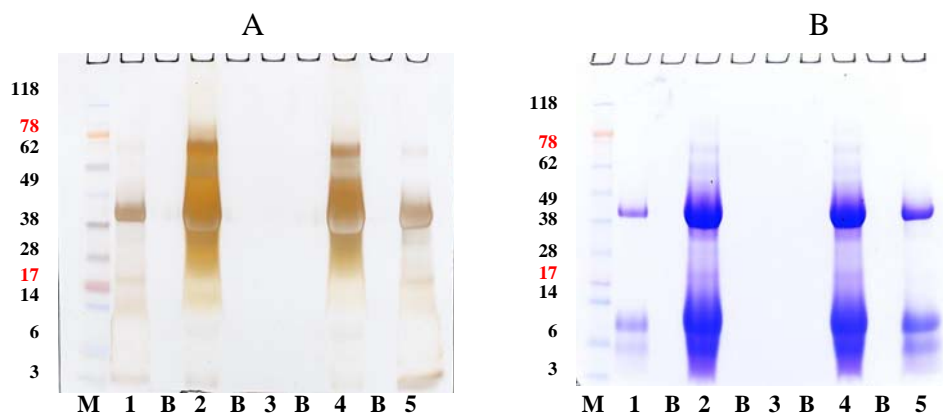
Am 2. 12. 2005 wurde offiziell das Christian Doppler Labor für Rezeptorbiotechnologie an der Universität für Bodenkultur (Muthgasse 18) feierlich eröffnet.

## 2.4 Ergebnisse

### 2.4.1 Konzentrierungsverfahren im Labor

Ausgehend von den Vorversuchen, bei denen die Proben zentrifugiert und anschließend 20-fach aufkonzentriert wurden, konnte mittel SDS-Gelelektrophorese gezeigt werden, dass das Proteinmuster im Konzentrat und in der Ausgangssubstanz gleich bleibt.

Die Elektrophoresen zeigen, dass die im Regenerat enthaltenen Proteine mit Ultrafiltration angereichert werden können (Abbildung 2). Weiter wurden mit Size exclusion HPLC (SEC-HPLC) und statischer Lichtstreuung die Größenverteilung der hochmolekularen Substanzen im Regenerat und im Vergleich im Bier untersucht.



- M** SeeBlue™ Plus 2 Pre-Stained Standard
- 1** Ausgangsmaterial
- 2** Retentate, 20-fach konzentriert
- 3** Filtrat
- 4** Regenerate konzentriert und zentrifugiert
- 5** Regenerate zentrifugiert und entsalzt
- B** **Puffer**

Abbildung 2: SDS-Elektrophorese von Regenerat, das mit Ultrafiltration aufkonzentriert wurde; (A) Silberfärbung, (B) Colloidale Coomassiefärbung

Die weiteren Versuche wurden mit einer Laborultrafiltrationsanlage von Millipore (Labscale TM TFF System) durchgeführt. Für den Konzentrierungsprozess wurden jeweils 3 Membranen vom Typ Pellicon XL mit einer Filtrationsfläche von 50cm<sup>2</sup> verwendet.

Zum Nachweis der Effektivität wurden mit Ausschlussgrößen von 3 kD, 5 kD und 10 kD gearbeitet. Während des Vorgangs des Aufkonzentrierens wurden die Parameter pH-Wert und Leitfähigkeit gemessen. Zur Vermeidung von Verstopfungen der Membranen wurde bei jedem Versuch eine geringe Durchflussrate und ein geringer Anfangsdruck (<10psi) eingestellt. Im Laufe des Prozesses stieg der Druck an der Membran auf >50psi. Um ein Platzen der Membranen zu verhindern musste zu diesem Zeitpunkt der Prozess unterbrochen werden und die Membranen regeneriert werden.

Zur Herstellung von 50ml Konzentrat wurden jeweils 1000ml Regenerat verwendet.

Nach Abschluss der Versuchsreihen zeigte sich, dass die Membran mit einer Größe von 5 kD und 3 kD die gleichen Ergebnisse liefern. Bei Membranen mit 3 kD verlängerte sich die Prozesszeit ohne ein messbar besseres Ergebnis zu erzielen.

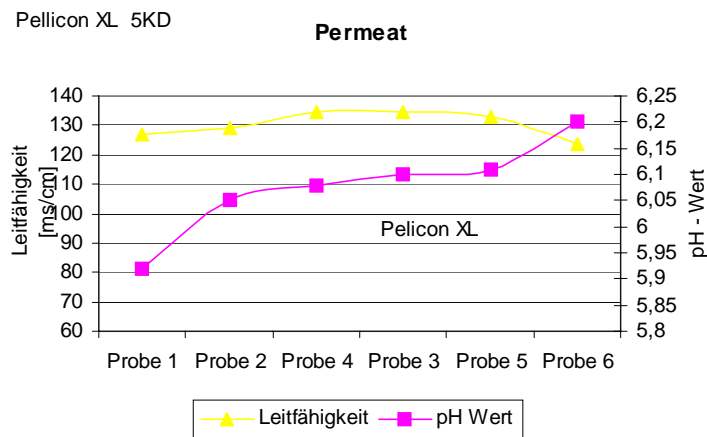


Abbildung 3: Verlauf der Leitfähigkeit und des pH-Wertes vom Permeat (5kD)

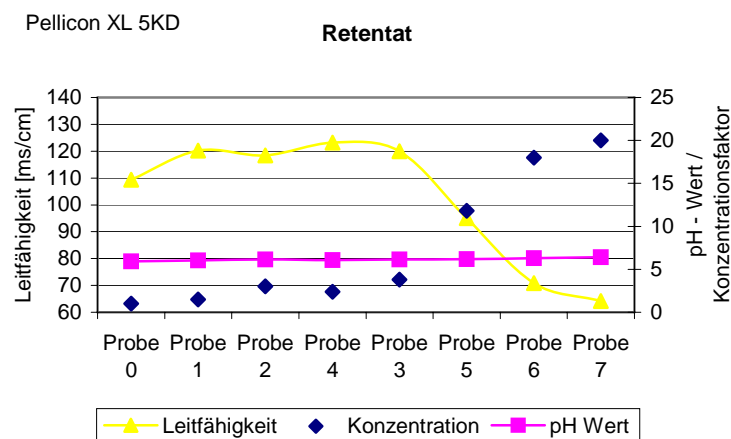


Abbildung 4: Verlauf der Leitfähigkeit und des pH-Wertes zur Konzentration (5kD)

Die Veränderungen des pH-Wertes bei Permeat und Retentat waren bei den Versuchen gering. Die Leitfähigkeit des Retentates verringerte sich mit steigender Konzentration.

## 2.4.2 Konzentrierungsverfahren im Pilotmaßstab

Die Versuche wurden im Juni 2004 im Technikum der Firma Millipore in Molsheim (FRA) durchgeführt.

### 2.4.2.1 Versuchsanordnung

Die Versuchsanordnung bestand aus einem Vorratstank, einem Membranhalter, einer Pumpe der Marke Quattro Flow Fluid Systems mit einer Siemens-Steuerung. Als Filter wurde ein Millipore Pellicon 2 Cassetten Filter mit einer Ausschlussgröße von 5K und einer Fläche von 0,5m<sup>2</sup> verwendet.



Abbildung 5: Versuchsanordnung (v.l.n.r. Pumpe, Vorratsbehälter, Filtervorrichtung)



Abbildung 6: Millipore Filterkassette Pellicon 2

### 2.4.2.2 Graphische Darstellung

Vor dem ersten Versuch wurde die *normalized water permeability* (NWP) für die Filterkassette bestimmt. *Normalized water permeability* (NWP) ist eine etablierte Methode, mit der die Reinheit einer Filterkassette nach der Reinigung bestimmt wird. Dabei wird die Passage von reinem Wasser durch die Membran unter definierten Druck und Temperaturbedingungen gemessen. Die Durchflussmenge (flux) von reinem Wasser durch die Membran wird in Liter pro Membranfläche pro Stunde gemessen. Die Durchflussmenge dividiert durch den Transmembrandruck (TMP) ergibt den NWP. Zur Bestimmung von Trends während des Prozesses (Verstopfung der Membran, Biofouling etc.) wird der NWP mit den vor dem Filtrationsprozess erhobenen NWP verglichen.

$$NWP = \frac{R * F}{A * \left\{ \left[ \frac{P_{in} + P_{out}}{2} \right] * P_p \right\}}$$

Formel 1: Normalized water permeabilität

- R = Permeatfluss in l/h
- P<sub>in</sub> = Eingangsdruck in *psi*
- P<sub>out</sub> = Retentat Ausgangsdruck in *psi*
- P<sub>p</sub> = Permeat Ausgangsdruck (wenn nicht 0) in *psi*
- T = Wassertemperatur in °C
- A = Gesamtfilterfläche in m<sup>2</sup>
- F = Temperaturkorrekturfaktor

	p in	p out	TMP	Filtratfluss ml/min	T	NWP
#1	0,8	0,3	0,55	185	22	41,88
#2	1,5	0,5	1	350	22	43,97
#3	2	1	1,5	550	22	46,068

Tabelle 2: Bestimmung der NWP

Bei den Versuchen wurden 100 Liter Ausgangsmaterial verwendet. Während des Konzentrierungsprozesses wurden folgende Parameter kontrolliert:

- Durchfluss in ml/min
- Pumpenfrequenz in Hz
- Eingangsdruck
- Ausgangsdruck
- Druckdifferenz
- Berechnet: Transmembrandruckdifferenz TMP

Keine Schaumbildung		Anfangsvolumme		25000	ml				
Zeitpunkt	Durchfluss	Zugabe	[Hz]	pH	P in	P out	delta p	TMP	
	ml/min								
3	230	11	24,19	7,50	2,6	1,6	1	2,1	
10	195		24,19		2,7	1,6	1,1	2,15	
20	170		24,19		2,8	1,6	1,2	2,2	
30	163		24,19		2,8	1,6	1,2	2,2	
63	115		10,79		2,7	1,6	1,1	2,15	
90	105		10,79		2,9	1,6	1,3	2,25	
120	34		10,04		2,8	0,5	2,3	1,65	
123	150		25,9		2,6	1,1	1,5	1,85	
130	110		25,9		2,6	1,1	1,5	1,85	
140	105		25,9		2,8	1,1	1,7	1,95	
150	100		25,9		2,8	1,1	1,7	1,95	
180	75		22,8		3	1,1	1,9	2,05	
210	45		17,13		3	0,9	2,1	1,95	
230	35		12		3,1	1	2,1	2,05	
240	25		9,1		3	1,1	1,9	2,05	
275	15		8		3,4	1,1	2,3	2,25	

Tabelle 3: Darstellung ausgewählter Parameter des Konzentrationsprozesses

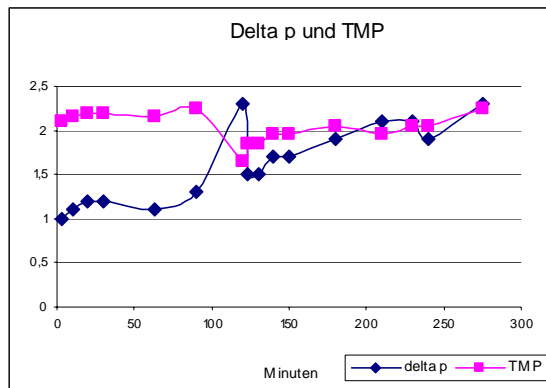


Abbildung 7: Anstieg des Drucks während des Prozesses

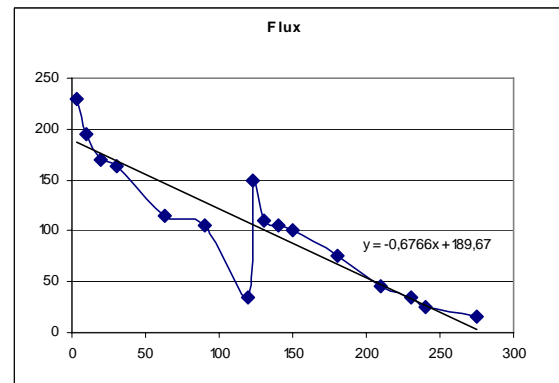


Abbildung 8: Ansinken der Durchflussraten, bedingt durch den Druckanstieg und dem Verstopfen der Membranen

Im Rahmen der Technikumsversuche war es möglich, ausgehend von 100 Liter Bierretentat 5 Liter Konzentrat (Konzentrationsfaktor 20) zu gewinnen.

Die Durchführung des Konzentrationsprozesses war möglich, durch die rasche Verstopfung der Filtermembran musste der Prozess laufend unterbrochen werden und die Membran gereinigt werden.

Mit dem Konzentrat wurden im Labor Trocknungsversuche durchgeführt.

### 2.4.3 Trocknungsversuche

Das Beste Ergebnis des Trocknungsversuches wurde mit einer Laborwirbelschichtanlage bei 40° C erreicht. Neben dem konzentrierten Bierretentat wurden andere Natursubstanzen und Extrakte auf diese Art behandelt, die im Rahmen des Christian Doppler Labors für Rezeptorbiotechnologie weiter untersucht werden.

#### **2.4.4 Bestimmung der Polyphenole und ARP**

Die gewonnenen Konzentrate, die Urproben und die Permeate wurden auf folgende Parameter untersucht:

- Polyphenol - Gehalt
- Catechin - Gehalt
- Antioxidatives Potential

Die Bestimmung der Gesamt-Polyphenole erfolgte photometrisch nach Folin-Ciocalteu (berechnet auf Gallussäure, in gallic acid euqivalentens (GAE) ausgedrückt). Die Catechine wurden photometrisch nach der Vanillin-Salzsäure-Methode berechnet.

Für die Bestimmung des antioxidativen Potentials wurde die Radikalfänger-methode mittels DPPH angewandt. Die DPPH-Methode gibt Aufschluss über die Fähigkeit der Probe als Radikalfänger zu agieren.

Dabei wird die entsprechende antioxidative bzw. Radikalfänger-Aktivität des Regenerates als Antiradical-Power ARP bestimmt. Die Antiradical-Power ARP wird definiert als reziproker Wert der Efficient Concentration  $EC_{50}$  ( $ARP = 1/EC_{50}$ ). Der Term  $EC_{50}$  stellt jene Menge dar, die notwendig ist, um die anfänglich vorliegende DPPH-Konzentration um die Hälfte (50%) zu reduzieren ausgedrückt in g (ml) Antioxidanz pro g DPPH. Demnach ist eine Substanz umso wirksamer hinsichtlich ihrer antioxidativen und Antiradikal-Wirkung, je kleiner der  $EC_{50}$ -Wert und je größer der ARP-Wert ist.

Der Gehalt an Gesamt-Polyphenolen im Konzentrat betrug durchschnittlich 11mg/ml. Im Permeat wurden <1mg/ml Polyphenole nachgewiesen. Zwischen Proben des Ionenaustauscher-Regenerates von alkoholfreiem Bier und „normalem“ Bier konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden.

Der Gehalt an Catechinen im Konzentrat lag bei 6mg/ml.

Sämtliche Werte der antioxidativen Aktivitäten zeigen eine deutliche Korrelation mit dem Gesamt-Polyphenolgehalt.

#### **2.4.5 Analyse der Inhaltstoffe**

In den Proben konnten das Gerstenprotein Protein Z und ein Lipidtransferprotein eindeutig nachgewiesen werden. Deren biologische Bedeutung ist allerdings gering.

Die Polyphenole des Braumalzes, die zu etwa 80-85% den Würzekochprozess bei der Bierherstellung überdauern, zeigen erst in den anschließenden Phasen der Würze- und Bierbereitung, unterstützt durch Oxidationsvorgänge, eine stärkere Reaktion. Die Literatursuche hat ergeben, dass von 17 in der Würze aufgefundenen Flavonoiden im Bier keine Nachweise erbracht werden konnten, während 9 Flavonoide wohl im Bier, nicht jedoch in der Würze nachweisbar sind. Zu den wichtigsten Vorstufen der Biertrübung gehören Anthocyanogene und Catechine.



In der Regel hat die Biertrübung folgende Zusammensetzung:

Teilchengröße	5-50x10 <sup>-5</sup> mm
Protein	45-65%
Polyphenol	30-45%
Kohlehydrate	2-4%
Mineralstoffe	1-2%

Tabelle 4: Zusammensetzung der Biertrübung

Die Bildung der nichtbiologischen Biertrübung wird bereits bei einer Konzentration von einigen ml/l von folgenden polyphenolartigen Stoffen beeinflusst:

Pyrocatechin, Pyrogallol, Phloroglucin, Gallussäure, Chlorogensäure, Kaffesäure u.a.

Quercetin soll am befähigsten sein, eine irreversible Biertrübung zu bilden. Die polyphenolartigen Stoffe mit einigen freien Hydroxylgruppen bilden einen Komplex mit einem verhältnismäßig hohen Eiweißanteil, während der stark kondensierte Polyphenoltyp eine relativ geringe Anzahl freier Hydroxylgruppen besitzt.

Es besteht die Annahme, dass durch den Einsatz des Ionenaustauschers die Substanzen Pyrocatechin, Pyrogallol, Phloroglucin, Gallussäure, Chlorogensäure, Kaffesäure u.a. aus dem Bier gefiltert werden. Das hergestellte Konzentrat wird auf das Vorhandensein dieser Substanzen untersucht.

## 2.4.6 Lipidtransferprotein

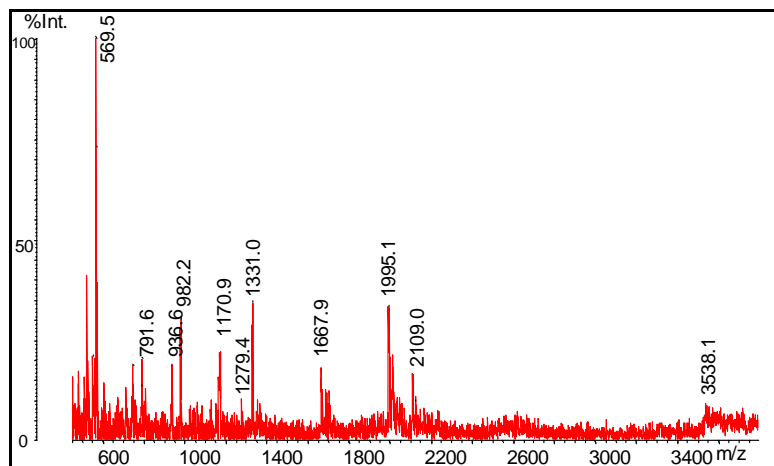


Abbildung 9: Identifikation des nonspecific lipid-transfer protein 1 precursors (LTP1)

### 2.4.6.1 Stabilität des Proteins

Das nsLTP ist ungewöhnlich stabil gegen Denaturierung, Hitze und Proteasen (29). Voraussichtlich hängt diese Stabilität mit den intakten Disulphid-Brücken zusammen. Nach einer Reduktion dürfte es instabil werden (30). Das nsLTP von Malz überlebt den Mälzerei- und Brauprozess, wird als 9 kDa großes Polypeptid gefunden und spielt bei der Schaumstabilität von Bier eine wesentliche Rolle. Das Bier nsLTP hat keine ersichtliche Sekundärstruktur und ist extensiv glycolisiert. Es wird angenommen, daß manche nsLTPs in Bier eine Lipidbindungsfunktion erhalten.

#### 2.4.6.2 Allergene Eigenschaften und biologische Funktion

Pflanzliche nonspecific lipid-transfer Proteine (nsLTP) sind in den intra- und extrazellulären Transport von Fettsäuren verantwortlich. Zwischen den 4 alpha Helices ist ein ausdehnbarer Hohlraum, der ein oder zwei Fett-Moleküle binden kann. In der Literatur wird über eine mögliche Wirkung als Abwehrprotein gegen bakterielle und Pilzinfektionen berichtet (31).

#### 2.4.7 Bestimmung der östrogenen Aktivität

Der Hefestamm 188R1 (*Saccharomyces cerevisiae*) wurde mit zwei Plasmiden transformiert: einerseits mit einem Expressionsplasmid (YE<sub>p</sub>E12; CUP1 Promotor) zur Expression des humanen Östrogenrezeptors  $\alpha$  (ER $\alpha$ ) und andererseits mit einem Reporterplasmid (YRpE2), das zwei Kopien des Vitellogenin-ERE und das iso-1-Cytochrome c (CYC 1) in Fusion mit dem lacZ-Gen enthält. Als Auxotrophiemarker zur Selektion der transformierten Hefe wurden Tryptophan (trp) für das Expressionsplasmid und Uracil (ura) für das Reporterplasmid verwendet. Für die Kultivierung der Hefe wurde das synthetische Gold-Medium ohne trp/ura verwendet.

##### 2.4.7.1 Testansätze

Für die Erstellung einer Standardkonzentrationsreihe wurden Verdünnungen einer 10 mM Stocklösung von 17 $\beta$ -Estradiol in DMSO verwendet. Zehn verschiedene Konzentrationsstufen im Bereich von  $10^{-7}$  bis  $10^{-5}$  mol l<sup>-1</sup> wurden in einer Menge von 5  $\mu$ l je Versuchsansatz eingesetzt. Von den Proben wurden Mengen von 50, 30 und 10  $\mu$ l eingesetzt. Der Rest auf 50  $\mu$ l wurde in allen Ansätzen mit DMSO ergänzt. Zu den Testansätzen wurden je 5  $\mu$ l 10 mM Kupfersulfatlösung zugegeben, um die Expression des Östrogenrezeptors zu induzieren. Als Blindwert diente DMSO. Alle Ansätze wurden in Doppelbestimmung durchgeführt. Die über Nacht bei 30°C geschüttelte Hefekultur wurde auf eine OD<sub>600</sub> von 0,4 verdünnt. Von dieser Hefesuspension wurden 4950  $\mu$ l den Testansätzen zugegeben und somit das Volumen auf 5000  $\mu$ l aufgefüllt. Die Testansätze wurden vier Stunden bei 30°C unter Schütteln inkubiert.

##### 2.4.7.2 Zellaufschluss

Nach der Inkubation wurden die Zellen durch Abzentrifugieren (5 min, 2500 rpm) geerntet. Die Pellets wurden zum Waschen in 1 ml lacZ-Puffer (100 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7,0, mit 10 mM KCl, 1 mM MgSO<sub>4</sub> und 50 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol) resuspendiert, in Eppendorf-Gefäße überführt und erneut zentrifugiert (10.000 rpm, 5 min). Nach Abziehen des Überstandes wurden 100  $\mu$ l lacZ-Puffer und Glaskugeln (Merck, 0,45  $\mu$ m Durchmesser) zugegeben. Die Ansätze wurden auf Eis gekühlt und 3 x 30 Sekunden mit je 15 Sekunden Pause gevortext.

Nach dem Aufschluss wurden die Proben abzentrifugiert (10 min, 10.000 rpm) und der klare Hefeextrakt für die weiteren Analysen verwendet.

### 2.4.7.3 $\beta$ -Galactosidase-Assay und Proteinbestimmung

Zu 2  $\mu$ l des klaren Überstandes der Proben wurden 250  $\mu$ l Substratlösung (ONPG-Lösung, 4 mg ONPG/ml lacZ-Puffer) zugegeben und bei 37°C ca. 10 Minuten bis zum Auftreten einer Gelbfärbung inkubiert. Die Farbreaktion wurde durch Zugabe von 100  $\mu$ l 1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Lösung gestoppt. Der Test wurde in Mikrotiterplatten in Doppelbestimmung durchgeführt. Die Platten wurden am Mehrkanalphotometer bei 405 nm gemessen.

Die Bestimmung des Gesamtproteins erfolgte mit dem Bio-Rad-Reagens zur Proteinbestimmung (Bio-Rad). Die Standardkurve wurde mit BSA erstellt. Zu 1  $\mu$ l Probe wurden 250  $\mu$ l Bio-Rad-Reagens zugegeben. Der Test wurde in Doppelbestimmung in Mikrotiterplatten durchgeführt. Die Platten wurden am Mehrkanalphotometer bei 570 nm gemessen.

Die spezifische Enzymaktivität wurde in Miller units ausgedrückt, die nach folgender Formel berechnet wurden (Formel 1).

$$\text{Miller units} = \frac{\text{OD}_{405}}{\text{Proteinmenge } [\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}]} * \frac{1}{\Delta t} * \frac{\text{Probenmenge Proteinassay } [\mu\text{l}]}{\text{Probenmenge } \beta\text{-Gal assay } [\mu\text{l}]} * 1000 \quad (1)$$

Formel 2: Spezifische Enzymaktivität

OD <sub>405</sub> .....	Messwert des $\beta$ -Galactosidase-Assay	[-]
$\Delta t$ .....	Inkubationszeit bei 37°C	[min]

### 2.4.7.4 Kurvenanpassung

Der Zusammenhang zwischen Miller units und der äquivalenten 17 $\beta$ -Estradiol-Konzentration ist in Formel 2 wiedergegeben. Die Ergebnisse der Standardkonzentrationsreihe wurden der Logistic-Dose-Response-Funktion (Abbildung 4) angepasst (Software: Table Curve 2D, Jandel Scientific).

$$Y = a + \frac{b}{1 + \left(\frac{c}{X}\right)^d}$$

Formel 3: Zusammenhang Miller units und äquivalenter 17 $\beta$ -Estradiol-Konzentration

X .....	17 $\beta$ -Estradiol-Konzentration im Testansatz
Y.....	Miller units
a.....	Basislinie
b.....	Plateau der Kurve (Efficiency)
c.....	Konzentration beim halbmaximalen Response (Potency)

d.....Übergangsbreite

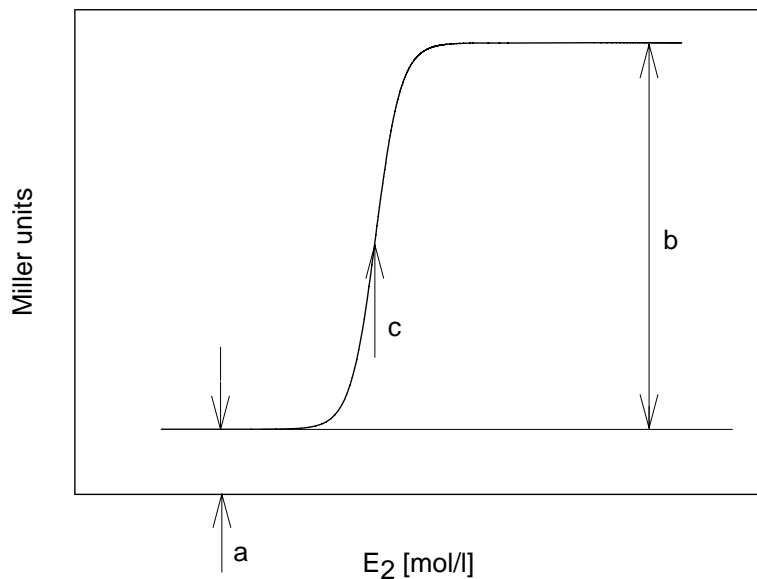


Abbildung 10: Schematische Darstellung der Logistic Dose Response Funktion

Mit Hilfe dieser Kalibrationskurve kann nun die östrogene Aktivität der Proben, berechnet als 17 $\beta$ -Estradiol-Äquivalente, bestimmt werden.

In keiner der Proben wurde östrogene Aktivität auf den Östrogenrezeptor alpha festgestellt. Die Ergebnisse lagen in allen Proben unter der Nachweisgrenze des Tests. Die Nachweisgrenze wurde als Blindwert plus die dreifache Standardabweichung des Blindwertes berechnet. Aus diesem Ergebnis kann man schließen, dass die Bierproben keine Substanzen enthalten, die im Hefetestsystem die Transaktivierung der  $\beta$ -Galactosidase bewirken können.

In früheren Versuchen wurde schwache östrogene Aktivität in Bier festgestellt. Diese Versuche wurden allerdings mit 100fach aufkonzentrierten Bierproben durchgeführt. Außerdem wurde die Aufkonzentrierung mittels Festphasenextraktion über C18-Säulchen durchgeführt, bei der es auch zu einer Anreicherung der hydrophoben Substanzen kommt. Eine stärkere Aufkonzentrierung der Proben wurde in diesem Fall nicht in Erwägung gezogen, da für die Verwertung einer eventuellen pharmakologisch aktiven Substanz eine zu geringe Konzentration dieser Substanz nicht mehr wirtschaftlich wäre.

## 2.4.8 Untersuchungen zur pharmakologischen Aktivität der Substanz

### 2.4.8.1 Testung der Extrakte auf Aktivität zur Aktivierung des Arylhydrocarbonrezeptors

Diese Tests wurden mit einem Hefetestsystem durchgeführt. Der Arylhydrocarbon-rezeptor ist im Genom integriert und das Hormonreponseelement auf einem Plasmid. Als Referenzsubstanz b-Naphtoflavon wurde gewählt. Eine Aktivität konnte nicht gefunden werden.

### 2.4.8.2 Vorbereitungen für in vivo Versuche zur Auffindung hormoneller Aktivität der Extrakte

Da vermutet wurde das die pharmakologisch aktiven Substanzen des Extraktes aus höhermolekularen Polyphenolen besteht, könnten die in-vitro Tests deshalb negativ

ausgefallen sein, weil die Substanzen von den Zellen nicht aufgenommen werden. Die in-vivo Test werden mit Ratten, den die Ovarien entfernt wurden, durchgeführt. Die Substanzen werden verfüttert und die Zunahme die Uterusgewichtes dient als Parameter zur Beurteilung der östrogenen Aktivität. Vom Uterusgewebe werden Proteinfractionen gewonnen und diese werden mittels Differentieller Gelelektrophorese untersucht. Derzeit wird der Effekt des Phytoöstrogens Genestein und Rotkleextrakte untersucht um feststellen zu können, ob es sich die Extrakte von diesen Produkten unterscheiden. Die in-vivo Versuche werden am Institut für Zoologie der TU Dresden (Prof. Vollmer) durchgeführt. Die DIGE am Department für Biotechnologie der Universität für Bodenkultur Wien.

Um die in-vitro Test besser absichern zu können wird an einem Ringversuch teilgenommen. Dieser Ringversuch wird im Rahmen des EU-Forschungsprojektes SWIFT-WFD inter-laboratory study durchgeführt. Er wird vom Department of Environmental Chemistry, IIQAB-CSIC in Barcelona, Spanien organisiert. Wir haben unsere Zellen und Protokolle zur Verfügung gestellt.

#### **2.4.9 Einreichung Verfahrenspatent**

Um einen breiten Schutz für die Herstellung dieser Substanz zu bekommen wurde in Zusammenarbeit mit einem Patentanwalt folgende Strategie (Kreuzlizenz Version) erarbeitet: Der Anspruch wird auf die Verfahrensschritte A (Konzentrierungsverfahren), B (Trocknung) und C (Analytik) für die Herstellung einer hochmolekularen Polyphenol-hältigen Substanz mit einem bestimmten antioxidativen Potential erhoben. Durch die weite Definition der einzelnen Verfahrensschritte wird zum Beispiel die Verwendung unterschiedlicher Methoden zum Konzentrieren (Ultrafiltration, Mikrofiltration etc.) und zum Trocknen (Lyophilisierung, Sprühtrocknung etc.) geschützt.

Entgegen des ursprünglichen Plans wurde kein Verfahrenspatent eingereicht, die Methode jedoch in unterschiedlicher Weise auf andere Ausgangssubstanzen erfolgreich angewendet.

Das Christian Doppler Labor für Rezeptorbiotechnologie arbeitet mit den dadurch gewonnenen Substanzen weiter.

### **2.5 Aufgetretene Schwierigkeiten bei der Projektarbeit**

#### **2.5.1 Analyse der Inhaltsstoffe**

Durch die Vielfalt der Inhaltsstoffe sind die Untersuchungen zur chemischen Natur und deren eventuelle Bedeutung als Wertstoff aufwendiger als geplant gewesen. .

Durch die vielen Inhaltsstoffe im hochmolekularen Bereich wurde keine definitive Leitsubstanz eindeutig identifiziert. Die Aufschlüsselung nimmt viel mehr Zeit in Anspruch als ursprünglich geplant. Viele Substanzen sind lediglich in Spuren vorhanden, wobei die technischen Grenzen für den Nachweis rasch erreicht werden.

##### **2.5.1.1 Das Lipid-Transfer-Protein**

Das Lipid-Transfer-Protein ist ein Lebensmittelallergen , das im Rahmen des Prozesses angereichert wurde. Das Vorhandensein des Allergens in der Substanz schließt eine Verwendung als Nahrungsergänzungsmittel aus.

### **2.5.2 Aufkonzentrierung der Substanz**

Im Rahmen des Projektes ist es gelungen, die Substanz in reproduzierbarer Form unter Beibehaltung des Proteinmusters mindestens um einen Faktor 20 zu konzentrieren. Ein rasches Verstopfen der Membranen bei der Filtration führte zu oftmaligen Unterbrechungen für die Reinigung. Durch die Verwendung von geringen Durchflussgeschwindigkeiten und Druckunterschieden auf den Membranseiten konnte das verhindert werden. Dadurch stieg der Zeitaufwand für das Aufkonzentrieren der Substanz enorm an. Die Herstellung von 50ml Konzentrat dauert im Durchschnitt 8 Stunden, ohne Reinigungszeit.

Bei den Scale-up Versuchen wurden ähnliche Erfahrungen gemacht.

### **2.5.3 Östrogene Aktivität**

Die Projektidee wurde durch die bekannte östrogene Wirkung von Bier angeregt. Vorversuche haben gezeigt, dass unterschiedliche Biersorten eine, wenn auch geringe östrogene Aktivität aufweisen.

Im Rahmen des Projektes wurden unterschiedliche Konzentrate aus dem Regenerat (von alkoholfreiem und „normalem“ Bier) getestet.

In keiner der Proben wurde östrogene Aktivität auf den Östrogenrezeptor alpha festgestellt. Die Ergebnisse lagen in allen Proben unter der Nachweisgrenze des Tests. In früheren Versuchen wurde schwache östrogene Aktivität in Bier festgestellt. Diese Versuche wurden allerdings mit 100fach aufkonzentrierten Bierproben durchgeführt. Außerdem wurde die Aufkonzentrierung mittels Festphasenextraktion über C18-Säulchen durchgeführt, bei der es auch zu einer Anreicherung der hydrophoben Substanzen kommt. Eine stärkere Aufkonzentrierung der Proben wurde in diesem Fall nicht in Erwägung gezogen, da für die Verwertung einer eventuellen pharmakologisch aktiven Substanz eine zu geringe Konzentration dieser Substanz nicht mehr wirtschaftlich wäre.

Der hohe Gehalt an Polyphenolen, deren positive Wirkung in vielen Publikationen beschrieben wird, lässt auf einen bisher noch nicht untersuchten/entschlüsselten Wirkungsmechanismus schließen.

## **3 Schlussfolgerungen zu den Projektergebnissen**

Die ursprüngliche Projektidee, einen Abfallstoff aus der Brauereiindustrie gewinnbringend zu verwerten ist nicht verwirklicht worden. Durch die Vielfalt an natürlichen Inhaltsstoffen war es nicht vorherzusehen, dass ein Allergen angereichert wird.

Die Umlegung des Verfahrens auf andere natürliche Substanzen, auch Pflanzenextrakte, hat ergeben, dass die Idee des Aufarbeitens prinzipiell funktioniert und die untersuchten Substanzen eine biologische Aktivität aufweisen, wie sie selten vorkommt. Das Interesse galt der Aufklärung der Stoffwechselwege und der Ursachenforschung zur Bestimmung der Aktivität.

Dieses Interesse führte dazu, dass Prof. Jungbauer und sein Team sich verstärkt mit der Rezeptorbiotechnologie auseinandersetzen. Das Resultat davon ist das Christian Doppler Labor für Rezeptorbiotechnologie.

Natürliche Pflanzenextrakte aus Rotklee sind eine wichtige Alternative zu herkömmlichen Therapien bei der Behandlung von menopausalen Beschwerden, in der Prävention von

hormonabhängigen Krebserkrankungen, Herz-Kreislaufkrankungen, und Osteoporose geworden. Auf Grund neuer gesetzlicher Regelungen in der EU können diese Pflanzenextrakte, die derzeit den Status von Nahrungsergänzungsmitteln haben, als Arzneimittel (Herbal Remedy) vertrieben werden. Im CD-Labor Rezeptorbiotechnologie liegt der Forschungsschwerpunkt auf den Östrogenrezeptoren  $\alpha$  und  $\beta$ , deren Isoformen, dem Progesteron-Rezeptor, dem Androgenrezeptor und dem Arylhydrocarbonrezeptor. Das Arbeitsprogramm ist auf ein breites Verständnis der hormonellen Wirkung von Polyphenolen, die als therapeutische Agenzien eingesetzt werden, um hormonbedingte Erkrankungen zu heilen, lindern oder zu verhindern, ausgerichtet.

Die Hauptaktivitäten des CD-Labors sind in der Zukunft:

1. Struktur-Funktionsbeziehung zwischen isolierten Substanzen aus Pflanzenextrakten und Steroidhormonrezeptoren.
2. Isolierung und Identifikation von Komponenten mittels chemischer Methoden und *in vitro* Tests.
3. Arbeiten zum Auffinden von Biomarkern, um vorhersagen zu können, ob Polyphenole metabolisiert werden können.
4. Steroidhormonrezeptoren als molekulare Maschine: der hormoninduzierte Transport eines Steroidhormonrezeptors durch die Nukleopore wird simuliert. Dies kann auch als Modell für den aktiven Transport eines Proteins durch eine Membran verstanden werden.

Das durch die Programm-Linie Fabrik der Zukunft geförderte Projekt bildete die Basis für diesen zukunftssträchtigen Forschungsbereich.

## 4 Literaturverzeichnis

- 1) A. Promberger, E. Dornsteiner, C. Frühwirth, E.R. Schmid, A. Jungbauer; Determination of Estrogenic Activity in Beer by Biological and Chemical Means; *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2001, 49, 633-640
- 2) Tobe H, Muraki Y, Kitamura K, Komiyama O, Sato Y, Sugioka T, Maruyama HB, Matsuda E, Nagai M; Bone resorption inhibitors from hop extract; *Biosci Biotechnol Biochem* 1997 Jan
- 3) Cauffield JS, Forbes HJ; Dietary supplements used in the treatment of depression, anxiety, and sleep disorders; *Lippincotts Prim Care Pract* 1999 May-June
- 4) W. Müller-Limmroth, W.Ehrenstein; Untersuchungen über die Wirkung von Seda-Kneipp auf den Schlaf schlafgestörter Menschen; *Med.Klin* 72 (1997), 1119-1125 (Nr. 25)
- 5) K. Yasukawa, M. Takeuchi, M. Takido; Humulon, a Bitter in the Hop, Inhibits Tumor Promotion by 12-O-Tetradecanoylphorbol-12-Acetate in Two-Stage Carcinogenesis in Mouse Skin; *Oncology* 1995, 52:156-158
- 6) M. Schmitz, M. Jäckel; Vergleichsstudie zur Untersuchung der Lebensqualität von Patienten mit exogenen Schlafstörungen (Vorübergehenden Ein- und Durchschlafstörungen) unter Therapie mit einem Hopfen-Baldrian-Präparat; *Wiener Medizinische Wochenschrift* Ausgabe Nr. 13 1998
- 7) Weber G, Adamczyk A, Freytag S.; Treatment of acne with a yeast preparation; *Fortschr Med* 1989 Sep
- 8) Kortekangas-Savolainen O, Lammintausta K, Kalimo K; Skin prick test reactions to brewer's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) in adult atopic dermatitis patients; *Allergy* 1993 Apr
- 9) J. Zempleni, D.M. Mock; Bioavailability of biotin given orally to humans in pharmacologic doses; *Am J Clin Nutr* 1999, 69:504-8
- 10) C Grana, M Chinol, C Robertson, C Mazzetta, M Bartolomei, C De Cicco, M Fiorenza, M Gatti, P Caliceti, G Paganelli; Pretargeted adjuvant radioimmunotherapy with Yttrium-90-biotin in malignant glioma patients: A pilot study; *British Journal of Cancer* (2002) 86, 207-212
- 11) Dabbagh O, Brismar J, Gascon GG, Ozand PT; The clinical spectrum of biotin-treatable encephalopathies in Saudi Arabia; *Brain Dev* 1994 Nov
- 12) Lischer ChJ, Koller U, Geyer H, Mulling Ch, Schulze J, Ossent P; Effect of therapeutic dietary biotin on the healing of uncomplicated sole ulcers in dairy cattle – a double blind controlled study; *Vet J* 2002 Jan
- 13) Zempleni J, Helm RM, Mock DM; In vivo biotin supplementation at a pharmacologic dose decreases proliferation rates of human peripheral blood mononuclear cells and cytokine release; *J Nutr* 2001 Jan
- 14) Mock DM, Quirck JG, Mock NI; Marginal biotin deficiency during normal pregnancy; *Am J Clin Nutr* 2002 Feb
- 15) Campbell JR, Greenough PR, Petrie L; The effects of dietary biotin supplementation on vertical fissures of the claw wall in beef cattle; *Can Vet J* 2000 Sep
- 16) Fritsche A, Mathis GA, Althaus FR; Pharmacologic effects of biotin on epidermal cells; *Schweiz Arch Tierheilkd* 1991
- 17) Mocki M; Skin manifestations of biotin deficiency; *Semin Dermatol* 1991 Dec



- 18) Floersheim GL; Treatment of brittle fingernails with biotin; Z Hautkr 1989 Jan
- 19) Pawlowski A, Konstanecki W.; Effect of biotin on hair roots and sebum excretion in women with diffuse alopecia; Pol Med J 1966
- 20) Schulpis KH, Karikas GA, Tjamouranis J, Regoutas S, Tsakiris S; Low serum biotinidase activity in children with valproic acid monotherapy; Epilepsia 2001 Oct
- 21) E.Dornstauder, E. Jisa, I. Unterrieder, L. Krenn, W. Kubelka, A. Jungbauer; Estrogenic activity of two standardized red clover extracts intended for large scale use in hormone replacement therapy. Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology 78 (2001) 67-75
- 22) Miller DD, Schricker BR, Rasmussen RR, Van Campen D.; An in vitro method for estimation of iron availability from meals. Am.J.Clin.Nutr. 1981 Oct; 34(10), 2248-56
- 23) Zou H, Huang X, Ye M, Luo Q. Monolithic stationary phases for liquid chromatography and capillary electrochromatography. J Chromatogr A 2002;954(1-2):5-32
- 24) Tegeler T, El Rassi Z. Capillary electrophoresis and electrochromatography of pesticides and metabolites. Electrophoresis 2001;22(19):4281-93
- 25) Kasicka V. Recent advances in capillary electrophoresis of peptides. Electrophoresis 2001;22(19):4139-62
- 26) Vanhoenacker G, Van den Bosch T, Rozing G, Sandra P. Recent applications of capillary electrochromatography. Electrophoresis 2001;22(19):4064-103
- 27) Bartle KD, Myers P. Theory of capillary electrochromatography. J Chromatogr A 2001 916(1-2):3-23
- 28) Smith NW, Carter-Finch AS. Electrochromatography. J Chromatogr A 2000 892(1-2):219-55
- 29) Lindorff-Larsen K, Winther JR., Carlsberg Laboratory, Department of Yeast Genetics, Gamle Carlsberg Vej 10, DK-2500, Copenhagen Valby, Denmark, Surprisingly high stability of barley lipid transfer protein, LTP1, towards denaturant, heat and proteases. FEBS Lett. 2001 Jan 19;488(3):145-8.
- 30) Lindorff-Larsen K, Lerche MH, Poulsen FM, Roepstorff P, Winther JR. Department of Yeast Genetics, Carlsberg Laboratory, Gamle Carlsberg Vej 10, DK-2500 Copenhagen Valby, Denmark, Barley lipid transfer protein, LTP1, contains a new type of lipid-like post-translational modification. J Biol Chem. 2001 Sep 7;276(36):33547-53.
- 31) Jones BL, Marinac LA.; Purification and partial characterization of a second cysteine proteinase inhibitor from ungerminated barley (*Hordeum vulgare* L.). J Agric Food Chem. 2000 Feb;48(2):257-64.

## 5 Abbildungs-, Tabellen- und Formelverzeichnis

Abbildung 1: Projektstrukturplan Projekt 806098 .....	20
Abbildung 2: SDS-Elektrophorese von Regenerat, das mit Ultrafiltration aufkonzentriert wurde; (A) Silberfärbung, (B) Colloidale Coomassiefärbung .....	24
Abbildung 3: Verlauf der Leitfähigkeit und des pH-Wertes vom Permeat (5kD) .....	25
Abbildung 4: Verlauf der Leitfähigkeit und des pH-Wertes zur Konzentration (5kD) .....	25
Abbildung 5: Versuchsanordnung (v.l.n.r. Pumpe, Vorratsbehälter, Filtervorrichtung).....	25
Abbildung 6: Millipore Filterkassette Pellicon 2.....	25
Abbildung 7: Anstieg des Drucks während des Prozesses.....	27
Abbildung 8: Ansinken der Durchflussraten, bedingt durch den Druckanstieg und dem Verstopfen der Membranen.....	27
Abbildung 9: Identifikation des nonspecific lipid-transfer protein 1 precursors (LTP1).....	29
Abbildung 10: Schematische Darstellung der Logistic Dose Response Funktion.....	33
Tabelle 1: Arbeitsplan Projekt 806098, Stand April 2004 .....	21
Tabelle 2: Bestimmung der NWP .....	27
Tabelle 3: Darstellung ausgewählter Parameter des Konzentrationsprozesses.....	27
Tabelle 4: Zusammensetzung der Biertrübung .....	30
Tabelle 5: Kostenzusammenfassung 09/2002 – 09/2005 von Projekt 806098 .....	<b>Fehler!</b>
<b>Textmarke nicht definiert.</b>	
Tabelle 6: Personalkosten 09/2002 – 09/2005 von Projekt 806098... <b>Fehler! Textmarke nicht definiert.</b>	
Tabelle 7: Sonstige Kosten 1 von 09/2002 – 09/2005 von Projekt 806098 <b>Fehler! Textmarke nicht definiert.</b>	
Tabelle 8: Sonstige Kosten 2.1 von 09/2002 – 09/2005 von Projekt 806098.....	<b>Fehler!</b>
<b>Textmarke nicht definiert.</b>	
Tabelle 9: Sonstige Kosten 2.2 von 09/2002 – 09/2005 von Projekt 806098.....	<b>Fehler!</b>
<b>Textmarke nicht definiert.</b>	
Formel 1: Normalized water permeabilität.....	26
Formel 2: Spezifische Enzymaktivität .....	32
Formel 3: Zusammenhang Miller units und äquivalenter 17 $\beta$ -Estradiol-Konzentration.....	32

## 6 Materialliste

### Mikro- Ultrafiltration:

- Laborfiltrationsanlage Millipore, Labscale™ TFF System, Tankvolumen 500ml

### Filterkassetten:

- Millipore, Pellicon XL Biomax 3, Membran Polyethersulphon
- Millipore, Pellicon XL Biomax 5, Membran Polyethersulphon
- Millipore, Pellicon XL Biomax 10, Membran Polyethersulphon

### Waschflüssigkeit:

- NaOH, 0,1-0,5N
- Aqua dest.

### Technikumsversuche Molsheim

- Tank XX42P Tank, Volumen 10 Liter
- Membranhalter BioDemo Equipment H93
- Steuerung Siemens
- Filter Pellicon 2 Cassette Filter P2B005A05 (Lot Nr. P4CN5800) Membran Biomax 5k, Fläche 0,5m<sup>2</sup>

### Bestimmung der östrogenen Aktivität

- Hefestamm 188R1 (*Saccharomyces cerevisiae*)
- Expressionsplasmid (YEpE12; CUP1 Promotor)
- Reporterplasmid (YRpE2)
- Auxotrophiemarker Tryptophan (trp)
- Kultivierung der Hefe: synthetische Gold-Medium ohne trp/ura
- 10 mM Stocklösung von 17β-Estradiol in DMSO
- Waschmedium: 1 ml lacZ-Puffer (100 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7.0, mit 10 mM KCl, 1 mM MgSO<sub>4</sub> und 50 mM β-Mercaptoethanol)
- Glaskugeln (Merck, 0,45 µm Durchmesser)
- Substratlösung (ONPG-Lösung, 4 mg ONPG/ml lacZ-Puffer)
- Mikrotiterplatten
- Mehrkanalphotometer (Wellenlänge 405 nm)
- Bio-Rad-Reagens zur Proteinbestimmung
- Software: Table Curve 2D, Jandel Scientific