

Aus dem Institut für Pflanzenernährung und Bodenkunde
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**Einfluss der Schwefelversorgung auf Gehalt und Qualität der
Samenproteine von *Pisum sativum* L. und *Glycine max.* L. und Eignung
verschiedener Methoden zur Diagnose der Schwefelversorgung**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Agrar- und Ernährungswissenschaftlichen- Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von
staatl. exam. Lebensmittelchemiker
Bijan Kawiani

aus Osterode

Kiel 2006

Dekan: Professor Dr. Joachim Krieter

1. Berichterstatter: Dr. habil. Jóska Gerendás
2. Berichterstatter: Prof. Dr. K. Schwarz

Tag der mündlichen Prüfung: 08.02.2007

Gedruckt mit Genehmigung der Agrar- und Ernährungswissenschaftlichen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel.

Danksagung

Die vorliegende Dissertation entstand nach einer Themenstellung von Herrn Dr. habil. J. Gerendás in zweijähriger Forschungsarbeit (Februar 2004 bis April 2006) und basiert auf dem DFG-Projekt Ge 1009 / 4-1.

Die Arbeiten wurden in der Forschungsgruppe Pflanzenernährung am Institut Pflanzenernährung und Bodenkunde in Kiel durchgeführt.

Mein Dank gilt den Personen, die es mir ermöglicht haben, in diesem Forschungsbereich zu promovieren. Dazu zählen Herr Dr. habil. J. Gerendás und Herr Prof. Dr. B. Sattelmacher († November 2005) für die Bereitstellung des Themas und die Betreuung sowie Frau Prof. Dr. K. Schwarz aus dem Institut für Humanernährung und Lebensmittelkunde der CAU Kiel und Prof. Dr. R. Horn aus dem Institut für Bodenkunde der CAU Kiel.

Ich danke außerdem den Mitarbeitern Dr. Klaus Dittert, Dr. Holger Brück und Pia Lüttich für die materielle Unterstützung, Dr. Reiner Krähmer für die anregenden Diskussionen, insbesondere Dr. Holger Brück, Jehad Abadi, Mehmet Senbayram und Dieter Hamann für die Unterstützung bei der Pflanzenanzucht und der Gewächshausarbeit, meinen Kolleginnen Nadine Zimmermann, Stephanie thor Straten und Anne Thießen für die hilfreiche Unterstützung im Labor und die angenehme Atmosphäre sowie Regina Epbinder für die geistige Unterstützung.

Evelyn Grabowsky vom Institut für Botanik danke ich für die Hilfe bei der Gel-Elektrophorese,

Dr. Christine Bösch-Saadatmandi vom Institut für Lebensmittelwissenschaft der CAU Kiel für die Kooperation,

genauso wie Dr. C. Domoney vom John Innes Centre, Norwich Research Park, Colney, Norwich, NR4 7UH, UK ('JIC') für die freundliche Unterstützung und das Saatgut.

Außerdem danke ich der Nordsaat Saatzeit GmbH, Saatzeit Langenstein, Hauptstr.1, 38895 Böhnhausen für die kostenlose Bereitstellung der Erbsensorte Grana.

Inhalt

Danksagung	2
Abkürzungsverzeichnis	5
1. Einleitung	7
2. Grundlagen	9
2.1. Leguminosen	9
2.2. Speicherproteine	11
2.2.1. Nomenklatur und Definition	12
2.2.2. 12S- und 7S-Globuline	12
2.2.2.1. Soja-Globuline	13
2.2.2.2. Erbsen-Globuline	15
2.2.3. 2S-Albumine	16
2.2.3.1. Enzym-Inhibitoren	17
2.3. Schwefelmangel	19
2.4. Diagnostik und Pflanzenanalyse	24
2.5. Proteinanalytik	25
3. Material und Methoden	26
3.1. Pflanzenanzucht	26
3.1.1. Vorversuche	26
3.1.2. Durchführung der Gefäßversuche für Soja (<i>Glycine max.</i> L.)	26
3.1.3. Durchführung der Gefäßversuche für Erbsen (<i>Pisum sativum</i> L.)	28
3.1.4. Durchführung der Gefäßversuche mit NIL-Erbsen	29
3.2. Chlorophyll-Messungen mit dem SPAD-Meter	29
3.3. Darstellung eines Acetonpulvers (bei Soja)	29
3.4. Trypsin Inhibitor Aktivität (TIA)	30
3.4.1. Reagenzien	30
3.4.2. Probenvorbereitung	30
3.4.3. Bestimmung der TIA	31
3.4.4. Berechnung	31
3.5. Schwefel- und Sulfat-Analytik	32
3.5.1. Schwefelmessung mittels Elementaranalysator	32
3.5.2. Heißwasserextraktion	32
3.5.3. Messung des Sulfatschwefel-Gehalts mittels Ionenchromatographie (HPIC)	32
3.6. Messung der schwefelhaltigen Aminosäuren (Methionin und Cystein)	33
3.6.1. Saure Hydrolyse	33
3.6.1.1. Reagenzien	34
3.6.1.2. Oxidation mit Perameisensäure	34
3.6.1.3. Durchführung der Hydrolyse mit 6 M HCl	35
3.6.2. Aminosäureanalytik	35
3.6.2.1. Durchführung	36
3.7. Protein-HPLC	37
3.7.1. Fortschritte in der Technologie	37
3.7.2. Durchführung	39
3.7.2.1. Reagenzien	39
3.7.2.2. Extraktion der Proteine	39
3.7.2.3. Präparation der Proteinfractionen (Methode nach Thanh und Shibasaki)	39
3.7.2.4. RP-HPLC	40
3.7.2.5. Trennsäulenvergleich	40

3.8. Messung des Gesamt-Stickstoff-Gehalts	41
3.9. SDS-Gelelektrophorese	41
3.10. Statistik	42
4. Ergebnisse	43
4.1. Ernte und Ertrag	43
4.1.1. Sojabohnenertrag	43
4.1.2. Kritische Nährstoffkonzentration	46
4.1.3. Erbsenertrag	48
4.2. Protein-HPLC	50
4.2.1. Trennsäulenvergleich	50
4.2.2. Globulin-HPLC	53
4.3. Bestimmung der schwefelhaltigen Aminosäuren in Sojabohnen	56
4.3.1. Bestimmung in der Albumin- bzw. Globulin-Fraktion	56
4.3.2. Bestimmung im ganzen Samen	59
4.4. Bestimmung der Trypsin-Inhibitoren in Sojabohnen	60
4.4.1. TIA in Sojabohnen	60
4.4.2. BBI-Konzentration in Sojabohnen	61
4.5. Bestimmung der Trypsin-Inhibitoren in Erbse	63
4.5.1. TIA in Erbse nach Schwefelsteigerung	63
4.5.2. Bestimmung der TIA in Nahen Isogenen Linien (NIL)	64
4.6. Stickstoff-, Schwefel- und Sulfatmessungen bei Soja und Erbse	65
4.6.1. Schwefel- und Sulfatmessungen bei Sojabohnen	65
4.6.2. N-Messungen bei Soja	66
4.6.3. Schwefel- und Sulfatmessungen bei Erbse	67
4.6.4. N-Messungen bei Erbse	68
4.6.5. Stickstoff-, Schwefel- und Sulfatmessungen bei NIL-Erbse	68
5. Diskussion	71
5.1. Schwefelsteigerung und Samenertrag bzw. Proteinertrag	71
5.1.1. Samenertrag	71
5.1.2. Proteinertrag	72
5.2. Trennsäulenvergleich	74
5.3. Zusammensetzung der Protein-Peaks	75
5.4. Auswirkungen auf die Aktivität und den Gehalt an Enzym-Inhibitoren	75
5.5. Auswirkungen der Schwefelernährung auf NIL-Erbse	79
5.6. Schwefelsteigerung und Gehalt an Gesamt- bzw. Sulfatschwefel	80
6. Ausblick	82
7. Zusammenfassung	84
8. Summary	87
Abbildungsverzeichnis	90
Tabellenverzeichnis	94
Literatur	95

Abkürzungsverzeichnis

α - TS	Antisense-Threonin-Synthase
A ₁	Absorptionsänderung
Alb	Albuminfraktion
APR	APS-Reduktase
APS	Adenosin-5'-phosphosulfat
BAPNA	N _{α} -Benzoyl-DL-Arginin-4-Nitroanilid-Hydrochlorid
BBI	Bowman-Birk Inhibitor
BW	Biologische Wertigkeit
C _n	Kohlenstoffkette mit n = 4, 5, 8, 18 Atome
CNC	critical nutrient concentration
CgS	Cystathionin- γ -Synthase
CME	Carboxymethyl-Cellulose
DEAE	Diethylaminoethylcellulose
ESI-MS	Electrospray-Mass-Spectrometry
EW	Einwaage
Glob	Globulinfraktion
Gy[1.....5]	Strukturgene der Glycininuntereinheiten
HA5	Bezeichnung einer nahen isogenen Erbsenlinie
HC8	Bezeichnung einer nahen isogenen Erbsenlinie
HPIC	High Performance Ion Chromatography
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IEC	Ion Exchange Chromatography
IR	Infrarot-Spektroskopie
LA5	Bezeichnung einer nahen isogenen Erbsenlinie
LC8	Bezeichnung einer nahen isogenen Erbsenlinie
Lys-Ser	Lysin-Serin
Leu-Ser	Leucin-Serin
MALDI-TOF	Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation Time of Flight
max	maximus/a/um
MEROPS	Peptidase Database http://merops.sanger.ac.uk/
ND	not determined
NIL	Near Isogenic Line
OAS	O-Acetylserin
PA	Pisum Albumin
p.A.	pro Analysis
pI	Isoelektrischer Punkt
PTFE	Polytetrafluorethylen
PVP	Probenverdünnungspuffer
RP4 // RP18 //	Reversed Phase mit 4fach bzw. 18fach Kohlenstoffkette
RP-HPLC	Reversed Phase-High Performance Liquid Chromatography
RT	Raumtemperatur
SAM	S-Adenosylmethionin
SAT	Serinacetyltransferase
SE-HPLC	Size Exclusion HPLC
SD	Standardabweichung

SDS	Sodiumdodecylsulfat
SMM	S-Methylmethionin
SBTI	Soybean-Trypsin-Inhibitor
TFA	Trifluoressigsäure
TI	Trypsin-Inhibitor
TIA	Trypsin-Inhibitor Aktivität (mg gehemmtes Trypsin/g TM)
TIU	Trypsin-Inhibitor Units ($\times TIA = 1,90 \times TIU \text{ mg}^{-1}$)
TKS	Torfkultursubstrate
TM	Trockenmasse (in der Lebensmittelchemie verwendeter Begriff. Synonym für Trockensubstanz)
TS	Trockensubstanz (siehe auch TM)
Tris- Puffer	Tris[hydroxymethyl]methylamin
UV	Ultraviolettes Licht
Vis	Visuelles Licht
VD	Verdünnung
v/v	Volumen/Volumen
v/w	Volumen/Gewicht

1. Einleitung

Schwefel in seiner reduzierten Form, in Cystein und Methionin, ist für die Proteinsynthese notwendig und hiermit für das Wachstum und die Entwicklung der Pflanze. Er ist außerdem essentiell für die Synthese von Coenzymen und eine Anzahl sekundärer Metabolite. Schwefelmangel führt zu reduziertem Wachstum und Chlorosen, die typischerweise an jungen Blättern auftreten (Herschbach et al., 2002). Die Ursachen für die verminderten Chlorophyllgehalte ergeben sich aus der Tatsache, dass bei Schwefelmangel die Synthese von Enzymen und Struktur-Proteinen gehemmt ist, was auf einen Mangel an den Aminosäuren Cystein und Methionin zurückzuführen ist (Anderson, 1990). Mangel tritt infolge verminderter atmosphärischer Deposition sowie veränderter Düngepraxis in landwirtschaftlichen Betrieben seit Beginn der 80er Jahre verstärkt auf (Mc-Grath et al., 1996; Schnug, 1991).

Neben diesen allgemeinen Effekten ist Schwefelmangel insbesondere für den Proteinhaushalt der generativen Organe von großer Bedeutung.

Die meisten Samen von Leguminosen bestehen zu 20 bis 25% aus Proteinen (Derbyshire et al., 1976). Besonders Sojasamen sind mit bis zu 45% reich an Protein (Serretti et al., 1994).

Alle Samen von Leguminosen enthalten Proteingruppen, die als Strukturproteine, funktionelle Enzyme und Speicherproteine klassifiziert wurden. Davon sind die Speicherproteine am stärksten vertreten. Sie machen annähernd zwei Drittel des gesamten Samenproteins aus. Im Vergleich zu den Getreideproteinen weisen sie einen geringeren Schwefelgehalt auf [...]. Im Hinblick auf die biologische Wertigkeit mangelt es den Proteinen aus Hülsenfrüchten mehr oder weniger an den schwefelhaltigen Aminosäuren Methionin und Cystein. Eine Trennung der Proteine aus Leguminosen auf Grund der Löslichkeit mit dem von T.B. Osborne bei Getreideproteinen angewandten Verfahren ergibt nur drei Fraktionen: Albumine, Globuline, und Gluteline, wobei die Globuline vorherrschen (Belitz et al., 2001).

Die globulären Speicherproteine in Leguminosen, die in Salzlösungen löslich sind, wurden in zwei Hauptgruppen aufgeteilt: die hexameren legumin- und die trimeren vicilinartigen Speicherproteine mit Sedimentationskonstanten (nach Svedberg) von 11/12S (Legumin) und 7/8S (Vicilin und Convicilin bei Erbse).

Bei der Sojabohne werden die 11/12S-Speicherproteine Glycinin und die 7/8S-Speicherproteine β -Conglycinin genannt. Man hat herausgefunden, dass bei Zunahme oder Abnahme des Gehalts an Methionin in den Speicherproteinen der Sojabohne dieses sich auf die relative Abundanz der β -Kette des β -Conglycinins auswirkt, und ein Mangel an freien schwefelhaltigen Aminosäuren die Synthese des Glycinins beschränkt (Imsande und Schmidt, 1998; Paek et al., 2000).

Des Weiteren spielen die schwefelreicheren 2S-Albumine eine Rolle. Zu dieser Gruppe wasserlöslicher Proteine mit besonderer biologischer Aktivität zählen u.a. Proteinase-Inhibitoren der Kunitz- und der Bowman-Birk-Familie, welche die Aktivität proteolytischer Enzyme wie Trypsin und Chymotrypsin hemmen, sowie Phytohämagglutinine (Lectine) (Norton et al., 1985; Jansman, 1996).

Es besteht Interesse, ein geeignetes Diagnoseverfahren für die S-Versorgung zu finden. Bei Bodenanalysen besteht wie beim Stickstoff das Hauptproblem in der Abschätzung des

pflanzenverfügbaren Schwefels. Wesentlich vielversprechender erscheint der Weg der Pflanzenanalyse. In der Vergangenheit wurden die Gesamt-S-Konzentrationen wegen des direkten Bezuges zur S-Versorgung häufiger verwendet (Spencer et al., 1977; Gilbert und Robson, 1984). Die Bestimmung des Sulfatgehaltes der jüngeren Blätter oder des gesamten Sprosses spiegeln den S-Versorgungsgrad der Pflanzen wesentlich empfindlicher wider (Freney et al., 1978; Spencer und Freney, 1980). Eine Alternative stellt die Bestimmung S-haltiger Metabolite, insbesondere Glutathion dar (Zhao et al., 1996) sowie die Bestimmung des Nitrat/Sulfat-Quotienten (Spencer et al., 1977; Freney et al., 1978). Ein vom Entwicklungsstadium der Pflanze weitgehend unabhängiges S-Diagnoseverfahren stellt die ionenchromatographische Bestimmung des Malat/Sulfat-Peakverhältnisses bei Raps und Weizen dar (Blake-Kalff et al., 2000).

Die grundlegende Aufgabe im Rahmen der vorliegenden Arbeit bestand darin, drei Fragekomplexe intensiver zu verfolgen:

1. Zu prüfen, wie sich ein gestaffeltes Schwefelangebot auf die Proteinqualität der Samen und die relative Bedeutung der S-haltigen Aminosäuren in der Speicherglobulin bzw. -albuminfraktionen auswirkt.
Hierzu wurde in Gefäßversuchen mit Torfkultursubstrat (sechs S-Stufen mit vier Wiederholungen) im Gewächshaus der Einfluss des S-Angebots auf die Proteinqualität der Samen von Soja (*Glycine max.* L.) und Erbse (*Pisum sativum* L.) untersucht. Die Fraktionierung der Samenproteine in Albumine und Globuline erfolgte mittels RP-HPLC an einer C₁₈-Umkehrphase (300 Å, 5 µm). Dabei standen auch drei verschiedene RP-Säulen zur Verfügung, deren Trennleistung und Eignung für dieses Projekt untersucht wurden. Durch Bestimmung der S-haltigen Aminosäuren in den Proteinfractionen und in den ganzen Samen bei Soja wurde geprüft, in welchem Maß Anpassungsmechanismen bestehen. Dabei wurden die Fraktionen, nach einer vorangegangenen Oxidation mit Perameisensäure, mit 6 M Salzsäure 22h bei 110°C hydrolysiert, um anschließend die Cystein- und Methioninkonzentration zu bestimmen. N-Bestimmungen, um den Proteingehalt der Samen zu ermitteln, erfolgten am Elementaranalysator. Bei einer S-Versorgung über dem Ertragsoptimum hat sich dabei keine weitere Variation in der Proteinqualität ergeben.
2. Um die Auswirkung eines variablen Schwefelangebots auf die ernährungsphysiologische Qualität zu charakterisieren, wurde an Soja und insbesondere an nahen isogenen Erbsenlinien, die sich nur im *Tri*-Locus unterscheiden, der die quantitative Variation in der Trypsin-Inhibitor-Aktivität kontrolliert, der Einfluss des Schwefelversorgungsgrades auf die Aktivität an Trypsin-Inhibitoren bestimmt. Zusätzlich wurde auch die Inhibitorkonzentration in Sojabohnen mittels RP-HPLC gemessen. Hier konnte ein interessanter Einfluss der S-Steigerung auf die Aktivität und Konzentration der Trypsin-Inhibitoren deutlich gemacht werden.
3. Um Aussagen zur S-Homeostasis zu erhalten, sollte neben dem Gesamt-S-Gehalt mittels S-Analysator auch der Gehalt an oxidiertem Schwefel mittels HPIC bestimmt werden (d.h. nur Sulfat, Sulfatester wurden nicht bestimmt). Nach Tabe et al. (2002) soll ein höherer Gehalt an reduzierten Schwefelverbindungen durch eine Abnahme oxidierter Schwefelverbindungen kompensiert werden.

2. Grundlagen

2.1. Leguminosen

Als „Hülsenfrüchte“ oder „Leguminosen“ (*Leguminosae*) werden die reifen Samen von Kulturpflanzen aus der Familie *Fabaceae* = *Papilionaceae* (Schmetterlingsblütler) bezeichnet. Da Hülsenfrüchte relativ (zu den anderen Hauptnährstoffen Fett und Kohlenhydrat, d.Verf.) viel Protein enthalten, sind sie für die Eiweißversorgung, insbesondere der Menschen in den Entwicklungsländern, unentbehrlich (Belitz et al., 2001).

Für die menschliche Ernährung werden vor allem Bohnen, Erbsen, Linsen sowie Erdnüsse und Sojabohnen kultiviert. Darüber hinaus sind Hülsenfrüchte wie Süßlupine, Luzerne, Seradella, Puffbohne (Ackerbohne), Peluschke (Ackererbse) u.a., aber auch die Sojabohne sowie die bei der Fettgewinnung von Sojaöl und Erdnussöl anfallenden Press- bzw. Extraktionsrückstände ein wertvolles eiweißreiches Futtermittel.

Von besonderer Bedeutung für die Landwirtschaft beim Anbau von Leguminosen ist, die Ausbildung luftstickstoffbindender Wurzelknöllchen (Rhizobien-Leguminosen Symbiose).

Die Bedeutung der Schwefelversorgung für Ertragshöhe und Qualität des Samenproteins von Leguminosen ergibt sich auf dreierlei Weise:

1. über das vegetative Wachstum
2. über die biologische N₂-Fixierung im Rahmen der Symbiose mit Rhizobien und
3. über Menge und Zusammensetzung des Samenproteins.

So hemmt ein Schwefelmangel die biologische N₂-Fixierung der Rhizobien-Leguminosen Symbiose (Scherer und Lange, 1996). Dies geht sowohl auf eine Abnahme der Knöllchenzahl als auch die der Nitrogenaseaktivität zurück (Munshi und Reena, 2001).

Leguminosen weisen sowohl in den vegetativen Pflanzenteilen als auch in ihren Samen deutlich höhere Proteingehalte auf als Nicht-Leguminosen. In den Samen ist der Proteingehalt mindestens doppelt so hoch wie bei Getreide, was die Bedeutung der Leguminosen als wichtige Proteinträger unterstreicht. Im Vergleich zu den Getreideproteinen zeigen die Leguminosenproteine einen geringeren Schwefelgehalt auf, was in dem N/S-Verhältnis von 40:1 zum Ausdruck kommt. Getreideprotein hingegen hat ein N/S-Verhältnis von 30:1. Die Ursache ist ein verminderter Gehalt an den schwefelhaltigen Aminosäuren Methionin und Cystein, die auch die biologische Wertigkeit der Proteine begrenzen (Dijkshoorn und Wijk, 1967).

Das Leguminosenprotein wird in Mehlen zu 80% ausgenutzt und kann leicht durch Zugabe von anderem Eiweiß (z.B. Milchpulver) biologisch aufgewertet werden. Der biologische Wert (BW) ist nach THOMAS die Menge Körperprotein, die durch 100 g Nahrungsprotein ersetzt werden kann (Franzke, 1990). Des Weiteren gibt es noch andere biologische Parameter, um die Proteinqualität zu beschreiben. Dazu zählen die Protein Efficiency Ratio (PER), Net

Protein Utilization (NPU) (Belitz et al., 2001), Net Dietary Protein Energy Ratio (NDPER) und der Net Dietary Protein Value (NDPV) (Biesalski und Grimm, 1999).

Der Protein digestibility-corrected amino acid score (PDCAAS) ist eine genauere Methode zur Qualitätsbestimmung von Proteinen. Er basiert auf dem Aminosäureprofil des Proteins und der wahren Verdaulichkeit. Der Amino acid score (AAS) wird errechnet aus dem Verhältnis der das größte Defizit aufweisenden unentbehrlichen Aminosäure zum Bedarfswert.

Es hat sich gezeigt, dass der PDCAAS von isoliertem Sojaprotein dem von Milch- oder Eiprotein entspricht. Benötigt z.B. ein Erwachsener täglich 50 g Protein, dann kann er seinen Bedarf durch die Aufnahme von 50 g des entsprechenden isolierten Sojaproteins decken. Weizenprotein dagegen weist nur einen PDCAAS von 0,40 auf. D. h., dass die Aufnahme von 125 g Weizenprotein erforderlich ist, um den Bedarf an unentbehrlichen Aminosäuren zu decken, die jedoch bereits in 50 g isoliertem Sojaprotein enthalten sind (Quellen: FDA, 1993; FAO/WHO, 1985; Cheftel, Cuq und Lorient, 1992)

Rohe Leguminosensamen sind nahezu unverdaulich, erst durch technologische Aufarbeitung bzw. Behandlung werden sie verdaubar gemacht. Ungeschälte ganze Hülsenfrüchte hingegen bleiben aufgrund ihres hohen Rohfasergehaltes in den Hüllen schwer verdaulich und schlecht ausnutzbar. Mehle von Hülsenfrüchten sind nicht backfähig, können aber – Getreidemehl zugesetzt – dessen Backfähigkeit verbessern (Franzke, 1990).

Aufgrund der großen Bedeutung der schwefelhaltigen Aminosäuren für die biologische Wertigkeit des Leguminosenproteins wird seit langem auf züchterischem Wege versucht insbesondere den Methioningehalt zu erhöhen (Clarke und Wiesman, 2000). Für *Vicia faba* zeigt sich eine negative Beziehung zwischen Methioningehalt im Protein und dem Proteingehalt in der Trockensubstanz ($r = -0,56^{**}$), allerdings bei einer breiten Streuung, die einigen Spielraum für züchterische Ansätze vermuten lässt (Frauen, 1989). Insgesamt werden die Erfolgsaussichten eines derartigen Vorgehens aber nicht als hoch eingeschätzt (Müntz et al., 1998). Daher wird versucht, auf gentechnischem Weg (Müntz et al., 1998; Tabe und Higgins, 1998) dieses Ziel zu erreichen. Hierzu werden im wesentlichen zwei Ansätze verfolgt:

- (A) Die Erhöhung des Methioningehalts in 11/12S-Globulinen (Müntz et al., 1997) sowie
- (B) Erhöhung des Gehalts an methioninreichen 2S-Albuminen durch Expression des entsprechenden Gens aus der Paranuss (Saalbach et al., 1992, Aragao et al., 1999), aus Mais (Sharma et al., 1998) oder aus Sonnenblumen (Tabe und Droux, 2002).

In der Narbonner Wicke (*Vicia narbonensis*) mit stabiler Expression des Paranuss-2S-Albumins, wurde der Methioningehalt deutlich erhöht (Saalbach et al., 1995). Bei derartigen Versuchen zeigte sich eine überraschende Stabilität der Gesamtschwefelgehalte, d.h. die Erhöhung des Methioningehaltes ging auf eine verstärkte Verminderung von im Samen gespeicherten Sulfat, bzw. eine Umverteilung zwischen verschiedenen Proteinfractionen zurück (Tabe und Droux, 2002). Nach Tabe et al. (2002) soll ein höherer Gehalt an reduzierten Schwefelverbindungen durch eine Abnahme oxidiertes Schwefelverbindungen (dazu gehören auch die Sulfatester) kompensiert werden.

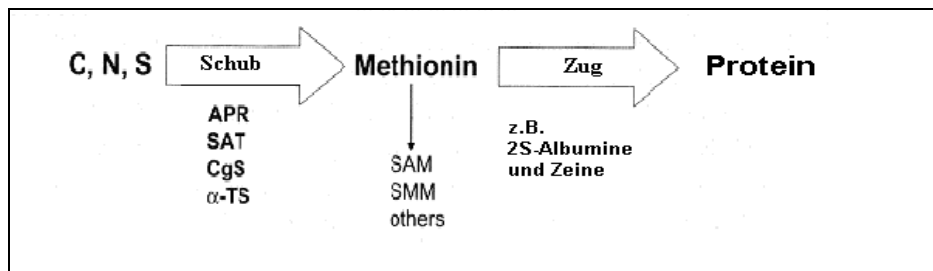


Abbildung 1: Synergistische biotechnologische Annäherungen, um den Methioningehalt in höheren Pflanzen zu erhöhen. SMM, S-Methylmethionin; SAM, S-Adenosylmethionin; APR, APS-Reduktase; SAT, Serinacetyltransferase; α-TS, Antisense-Threonin-Synthase; CgS, Cystathionin-γ-Synthase (nach Hesse et al., 2004).

Aber nicht nur auf züchterischem oder molekularbiologischem Wege ist es möglich, die Proteinqualität der Leguminosen zu erhöhen. Der Mineralstoffversorgung kommt hierbei eine zentrale Rolle zu. Ist die Stickstoffversorgung ausreichend, so steigt mit zunehmender Schwefelversorgung nicht nur der Samenertrag, der Proteingehalt und der Proteinertrag, sondern auch die ernährungsphysiologische Qualität der Speicherproteine infolge steigender Methioningehalte (Gaylor und Sykes, 1985). In die Gruppe der schwefelreichen 2S-Albumine gehören jedoch auch die Trypsin-Inhibitoren. So konnte gezeigt werden, dass eine Schwefeldüngung der Ackerbohne auf einem Mangelstandort den Proteingehalt der Samen zwar geringfügig steigert (103-104% gegenüber der ungedüngten Kontrolle), die Gehalte an Trypsin-Inhibitoren hingegen deutlich erhöht (121-222%) und damit einhergehend die *in vitro*-Verdaulichkeit reduzierte (90-93%; Elsheikh et al., 1999).

2.2. Speicherproteine

Proteine unterscheidet man nach ihrer räumlichen Ausrichtung; man teilt sie in Skleroproteine oder auch fibrilläre Proteine (Faserproteine) bzw. Gerüsteiweißstoffe und Sphäroproteine (Proteine mit kugelförmiger Gestalt) ein. Letztere können noch hinsichtlich ihrer Löslichkeit, wie z.B. durch die Osborne-Fraktionierung (Osborne, 1924), unterschieden werden. Diese Fraktionierung unterscheidet die Proteine nach ihrer Löslichkeit entweder in Wasser (Albumine), in Salzlösungen (Globuline), in wässrigem Alkohol (Prolamine) oder in sauren oder alkalischen Lösungen (Gluteline). Ergebnisse, die auf Sequenzuntersuchungen basieren, zeigten, dass Prolamine und die meisten Gluteline einen gemeinsamen evolutionären Ursprung besitzen (Shewry und Tatham, 1990) und sich nur in ihren Extraktionseigenschaften unterscheiden. Die Klasse der Gluteline kann daher als eigenständige chemische Substanzklasse nicht aufrecht erhalten werden. Obwohl Samenproteine die größte Proteinquelle für den Menschen bereitstellen, sind sie sehr variabel und können in drei Hauptkategorien eingeteilt werden: Speicherproteine, Strukturproteine und biologisch aktive Proteine (Fukushima, 1991). Von diesen Proteinen sind die Speicherproteine in Samen am reichhaltigsten und sind von größter Bedeutung hinsichtlich der Ernährungs- und Verarbeitungseigenschaften (Marcone, 1999). Die einzige physiologische Funktion von Speicherproteinen im Samen ist die Bereitstellung einer Quelle für Aminosäuren und

Stickstoff für die Keimung des Samens (auf die Bedeutung des Schwefels wird später eingegangen).

Ein Protein kann als Speicherprotein angesehen werden, wenn es in großen Mengen im Samen akkumuliert und es während der Keimung und frühen Sämlingswachstum zu einzelnen Aminosäuren hydrolysiert wird, letztendlich große Mengen an stickstoffreichen Aminosäuren enthält (Lambert und Yarwood, 1992; Spencer, 1984).

Trotzdem ist bekannt, dass einige Speicherproteine auch spezifische metabolische Funktionen besitzen. Beispiele solcher Proteine sind Protease-Inhibitoren (siehe Kapitel 2.2.3.), die in großen Mengen in vielen Leguminosensamen und auch Cerealien akkumulieren, und β -Amylasen (Fukushima, 1991; Pernollet und Mossé, 1983). Andere haben Lektin-ähnliche Funktionen wie z.B. in der Gartenbohne und der Erbse (Pernollet und Mossé; Pusztai et al., 1983).

2.2.1. Nomenklatur und Definition

Die Globuline aus Leguminosen haben Sedimentationskoeffizienten von 7S bis 8S und 11S bis 12S; diese Nomenklatur wird allgemein benutzt, obwohl 12S- und 7S-Globuline besser unter beispielsweise Legumin und Vicilin bekannt sind (Danielsson, 1949). Dies gibt die Taxonomie der Leguminosen wieder, aus der diese Globuline zuerst extrahiert oder isoliert wurden (Osborne und Campbell, 1898).

Da sich die Terme 7/8S und 11/12S der aufgereinigten Globuline auf die Sedimentationskoeffizienten nach Svedberg beziehen, aber sich diese Werte und das Assoziations/Dissoziations-Verhalten unter anderen Bedingungen (Temperatur und Druck) und verändertem pH oder Ionenstärke ändern, werden im Folgenden der Einfachheit halber die Terme 7S und 12S verwendet; außerdem werden die Terme Glycinin (*Glycine max*) und Legumin (*Pisum*, *Vicia* spp.) für die 12S-Globuline und die Terme β -Conglycinin (*Glycine max*) und Vicilin bzw. Convicilin (*Pisum*, *Vicia* spp.) für die 7S-Globuline verwendet.

2.2.2. 12S- und 7S-Globuline

Die Molekülmasse eines typischen Legumins mit annähernd 350 kDa, ist größer als die Masse eines typische Vicilins (annähernd 200 kDa) (Derbyshire et al., 1976). Geläufige Modelle beschreiben das 7S-Protein als Trimer, das aus morphologischen Untereinheiten mit den Molekülmassen M_r 50.000-70.000 besteht und das 12S als Hexamer (siehe Abbildung 2), aus morphologischen Untereinheiten mit den Molekülmassen M_r 60.000-80.000. In beiden Globulinen werden die morphologischen Untereinheiten durch nicht-kovalente Bindungen zusammengehalten; die 12S-Globuline bestehen einheitlich aus Disulfid gebundene Dimeren, in denen eine einzelne saure Polypeptidkette A (saurer pI, M_r ca. 40.000) und eine basische Polypeptidkette B (basischer pI, M_r ca. 20.000) kovalent durch eine Disulfidbrücke verbunden sind. Die Untereinheiten werden aus einzelnen Polypeptiden synthetisiert und werden proteolytisch post-translational gespalten, um „AB-Paare“ zu bilden (Lambert et al., 1987). Die Struktur der Polypeptide variiert nicht nur aufgrund der Unterschiede in der Primärstruktur *per se*, sondern auch wegen unterschiedlicher post-translationalen

Modifikation (Glykolyse und Proteolyse), die aus unterschiedlichen Aminosäuresequenzen resultiert (Casey et al., 1999).

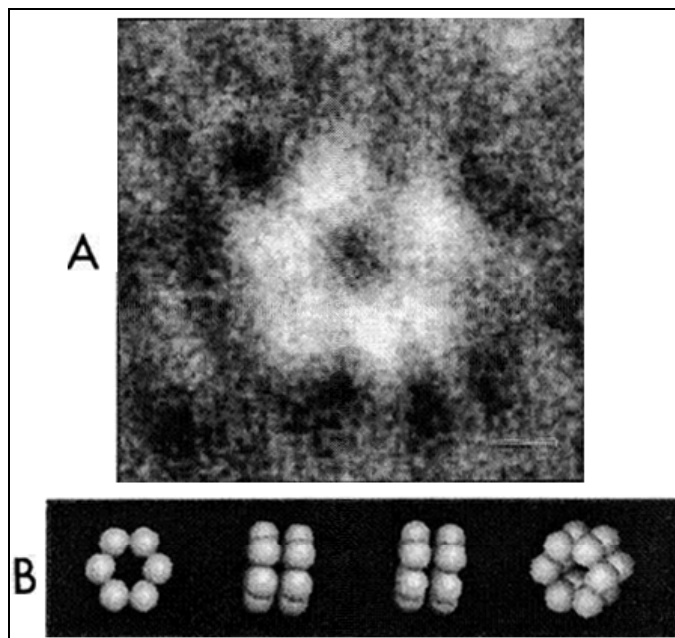


Abbildung 2: (A) Elektronisches Mikrogramm eines einzelnen Globulin-Komplexes (weiß: Protein; schwarz: Färbemittel). (B) Dreidimensionales Model erhalten aus Einzelpartikel-Analysen (Marcone et al., 1999).

2.2.2.1. Soja-Globuline

Das Glycinin der Sojabohne wird essentiell während der gesamten Samenentwicklung synthetisiert, das β -Conglycinin hauptsächlich zum Ende der Samenentwicklung (Meinke et al., 1981). Isoliert von Samenextrakt, ist Glycinin ein Oligomer aus sechs ähnlichen Untereinheiten. Die Strukturgene, welche die Glycinin-Untereinheiten kodieren, wurden identifiziert und als *Gy1* bis *Gy5* bezeichnet.

Insgesamt besteht das Samenprotein der Sojabohne zu annähernd 40% aus Glycinin (siehe Tabelle 1). Die abgeleiteten Aminosäuresequenzen weisen eine normale Proportionierung der 20 Aminosäuren auf und damit eine gute biologische Wertigkeit (Fukushima, 1991). Wenn man das Glycinin mit Hühnereiprotein vergleicht, enthält Glycinin 18 Methioninreste und Hühnereiprotein 28 Reste pro tausend Aminosäurereste. Es enthält 14 Cysteinreste und Hühnereiprotein 28 Reste pro tausend Aminosäurereste. Entsprechend sind im β -Conglycinin drei Methionin- und drei Cysteinreste pro Tausend Aminosäurereste enthalten (Shewry und Casey, 1999).

β -Conglycinin, das 7S-Globulin der Sojabohne, ist als Trimer aus Samen isoliert worden und besitzt eine Molekülmasse von 125-190 kDa. Als Thanh und Shibasaki (1975, 1976, 1978) gereinigtes β -Conglycinin mit DEAE-Sephadex A-50 Chromatographie fraktionierten,

erhielten sie sechs Isoforme. Jede Isoform besteht aus verschiedenen Kombinationen der drei haupttypischen Glycoprotein-Untereinheiten, die als α , α' und β bezeichnet werden (Shewry und Casey, 1999). Spätere Untersuchungen haben ergeben, dass es mindestens sieben Isoformen gibt (Coates et al., 1985; Sebastiani et al., 1991). Die α -Untereinheit, welche aus 605 Aminosäureresten besteht, enthält drei Methionin- und fünf Cysteinreste; die α' -Untereinheit mit 639 Aminosäureresten, enthält sechs Methionin- und fünf Cysteinreste (Sebastiani et al., 1990). Die β -Kette des β -Conglycinins, das bis zu 10% des gesamten Samenproteins einnehmen kann, besteht aus 416 Aminosäureresten, denen es an Methionin bzw. Cystein mangelt. Alle drei Untereinheiten nehmen bis zu 30% des gesamten Samenproteins ein. Wachstumsbedingungen wie S-Versorgung des Standortes können die relative Abundanz dieser sieben Isoformen verändern (Maruyama et al., 2001).

Tabelle 1: Zusammensetzung des Soja-Proteins (nach www.proteinov.com)

Protein-Gruppe (Sedimentations- koeffizient)	Komponente	% -Anteil vom gesamten Sojaprotein	g kg ⁻¹	Molekulargewicht in kDa	Untereinheit Anzahl	pI
12S	Glycinin	31-38	120-150	320-360	12	5,7
7S	Conglycinin	17-21	6,8-8,4	170	3	4,5
	Hämagglutinin	0,6-1		110		8-9
	Lipoxygenase (I-III)	<1		9,40	1	5-6
	Amylasen	<1				
2S	Kunitz	2	0,8	2,01	1	4,55
	Bowman-Birk	0,8	0,3	8	1	4,3
	Cytochrom-C BAS	<1		12,38	1	10,25
	MW Globuline	10,2	4-8	20-70	1	ND

Tabelle 2: Zusammensetzung der Speicherglobulinstruktur einiger Sojabohnensorten und einer Fababohnensorte in $g \times (100 \text{ g TM})^{-1}$ (nach El-Shemy et al., 2000)

Pflanze	Sorte	Speicher-Protein	7S-Protein	α'	α	β	11S-Prot.	Saure Kette	Basische Kette	Verhältnis 11S:7S
Sojabohne										
	Clark (Ägypten)	29,1	14,5	5,6	4,9	4,0	14,6	8,4	6,2	1,01
	Sanga (USA)	28,9	14,7	5,7	4,8	4,2	14,2	8,2	6,0	0,97
	Macon (USA)	28,6	14,1	3,1	4,9	4,0	14,5	8,4	6,1	1,03
	Fukuyutaka (Japan)	28,0	13,5	4,5	4,5	4,5	14,5	8,2	6,3	1,07
	Bragg (USA)	22,4	11,1	3,8	3,6	3,7	11,3	6,3	5,0	1,02
	Kitamusume (Japan)	21,5	10,0	3,3	3,8	3,9	11,5	6,0	5,0	1,15
	Athow (USA)	24,6	11,5	3,6	4,8	3,1	13,5	7,7	5,8	1,17
	Toiku 233 (Japan)	19,7	7,9	0,9	4	3	11,3	6,9	4,4	1,43
	Iwaikuro (Japan)	20,8	7,7	1,4	3,2	3,1	13,1	7,2	6,1	1,70
Fababohne										
	Giza 2 (Ägypten)	16,3	3,9	0,2	0,4	3,3	12,4	8,1	4,3	3,18

So wurde u.a. von Gayler und Sykes (1985) berichtet, dass Schwefelmangel während der Hülsenfüllung die relative Abundanz der β -Kette des β -Conglycinins erhöht. Genauso hat es sich gezeigt, dass ein übermäßiges N-Angebot (z.B. Harnstoff) während der Hülsenfüllung die Samenausbeute und die Abundanz der schwefelarmen β -Kette des β -Conglycinins erhöht. Ist die Stickstoffversorgung ausreichend, so steigt mit zunehmender Schwefelversorgung nicht nur der Samenertrag, der Proteingehalt und -ertrag, sondern auch die ernährungsphysiologische Qualität der Speicherproteine infolge steigender Methioningehalte. So kann der Gehalt an Schwefel enthaltenen Aminosäuren im Speicherprotein des Sojasamens auch einfach erhöht werden, indem man den Ertrag an Sojasamen reduziert, was aber keine begründbare Alternative für den Sojabohnen-Produzenten darstellt (Tabe und Droux, 2001).

2.2.2.2. Erbsen-Globuline

Erbsen-Legumin besteht aus größeren Polypeptiden mit den Molekülmassen von M_r ca. 40.000 und 20.000, die durch Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Außerdem besteht es aus kleineren Polypeptiden mit den Molekülmassen von M_r ca. 40.000, 35.000, 25.000 und 20.000, die wiederum durch Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Die größeren Polypeptidpaare besitzen einen geringen pI und werden als saure Polypeptide bezeichnet, entsprechend der A-Kette des Glycinins der Sojabohne. Die kleineren Polypeptidpaare besitzen einen hohen pI und werden deswegen als basische Polypeptide bezeichnet, was der B-Kette des Glycinins entspricht.

Die α und α' -Untereinheiten des β -Conglycinins der Sojabohne entsprechen dem Convicilin (M_r ca. 70.000), das im Erbsenprotein gefunden wurde, während die β -Kette dem Vicilin (M_r ca. 12.000-50.000) der Erbse und anderen Leguminosen ähnlich ist. Keines der Vicilin-Polypeptide besitzt eine Disulfidbindung.

Sich ändernde Umweltfaktoren wirken sich profund auf die Speicherglobuline in der Erbse aus. Suboptimale Versorgung mit Schwefel, Phosphor oder Kalium verändern den Gehalt an Legumin, Vicilin und den Albuminen in den Samen, wobei Schwefelmangel einen besonderen Effekt hat (Randall et al., 1979). Es hat sich in allen Fällen von Schwefelmangel eine Zunahme im Anteil der weniger schwefelreichen Proteinkomponenten gezeigt. In schwefelarmen Erbsen geht die Reduktion des Legumins einher mit einer reduzierten Syntheserate und mit einem reduzierten Anteil der Legumin-mRNA. Ein Schwefelmangel resultiert in sowohl Zunahme als auch Abnahme der Syntheseraten verschiedener Samenproteinfraktionen und -untereinheiten. Im Falle des M_r 50.000- Vicilins konnte man eine Änderung im zeitlichen Muster seiner Synthese beobachten. Diese Veränderungen verliefen parallel mit den Veränderungen im Anteil der korrespondierenden mRNA (Chandler et al., 1984).

Erbsen sind keine wichtige Proteinquelle für die menschliche Ernährung, obwohl signifikante Proteinmengen aus Erbsen in technologisch veränderter Nahrung enthalten sind. Der hauptsächliche Nutzen liegt in der Tierernährung, wo Proteingehalt, Komposition und der Gehalt an schwerverdaulichen Inhaltsstoffen eine wichtige Rolle spielen; Erbsen weisen einen mäßigen Gehalt an Proteinen auf (20-30% der Trockenmasse im Samen) und wie alle Samenproteine aus Leguminosen mangelt es an Cystein und Methionin im Protein. Entsprechend liegt der Gehalt an Methionin im Erbsen-Legumin verglichen mit dem Gehalt in Hühnereiweiß bei 8 Methioninresten pro Tausend Aminosäureresten sowie 7 Cysteinresten. Im Vergleich: Beide Werte liegen in Hühnereiweiß bei 28 Resten (Shewry und Casey, 1999).

2.2.3. 2S-Albumine

Die Albumine zeichnen sich im Gegensatz zu den schwefelarmen Globulinen durch einen vergleichsweise hohen Gehalt an schwefelhaltigen Aminosäuren aus (Shewry et al., 1995; Müntz et al., 1999). Aus diesem Grund sind vor allem aus ernährungsphysiologischer Sicht Samen mit einem höheren Anteil an 2S-Albuminen sehr interessant. Jedoch ist bei den Albuminen nicht das Methionin, sondern eher das Cystein für die relativ hohen Schwefelgehalte verantwortlich. Auch zwei Gruppen wasserlöslicher Proteine mit besonderen biologischen Aktivitäten zählen hierzu: Proteinase-Inhibitoren, welche die Aktivität proteolytischer Enzyme hemmen (z.B. Trypsin- und Chymotrypsin-Inhibitoren) und Phytohämagglutinine, die Erythrozyten agglutinieren können (z.B. Lectine) (Norton et al., 1985; Jansman, 1996).

Im Allgemeinen kann man die 2S-Albumine als heterodimere Proteine typisieren, die Untereinheiten mit 30-40 und 60-90 Aminosäureresten enthalten. Es bestehen einige Variationen im Gehalt an Cystein und Methionin in den 2S-Albuminfraktionen. So sind z.B. einige methioninreiche Proteine in der Sonnenblume, Baumwolle und der Paranuss enthalten und cysteinreiche Proteine in Erbse und im peruanischen Reis (Shewry und Pandya, 1999).

Erbsen (*Pisum sativum*) enthalten zwei Hauptalbumine, PA1 und PA2 (Pisum Albumin), von denen das PA1 zu den 2S-Albuminen gezählt werden kann. Von Higgins et al. (1986) wurde berichtet, dass es ungefähr die Hälfte des gesamten Schwefels im reifen Samen beiträgt, obwohl es nur 10% des gesamten Proteins repräsentiert. PA1 besteht aus zwei Proteinen PA1a und PA1b, die nicht wie typische 2S-Albumine das Bestreben haben, zu Dimeren zu assoziieren.

PA2 ist ein Homodimer, das ähnlich wie Lectin befähigt ist, menschliche Erythrocyten zu agglutinieren und allergene Wirkung besitzt (Vioque et al., 1998).

Das Samenprotein von Leguminosen enthält eine Reihe weiterer Komponenten, die als unerwünscht oder ernährungsphysiologisch nicht geeignet gelten. Viele dieser Komponenten, die der Albuminfraktion angehören, haben eine günstigere Aminosäure-Zusammensetzung als die Globuline. Diese Proteine verleihen den Pflanzen eine Resistenz gegen Krankheiten und Krankheitserreger sowie Schutz gegen Fraßfeinde (samenfressende Insekten). Unter diesen sind die Enzym-Inhibitoren die reichhaltigsten, weit verbreitetsten und diejenigen, die am meisten untersucht wurden. Sie behindern die Verdauung von Proteinen im Darm der Insekten, verringern die Wachstumsrate und Reproduzierbarkeit der Insekten und somit die konsumierte Menge des Pflanzenmaterials. Es besteht andererseits ein Selektionsdruck für diese Schädlinge, die Verdauungsenzyme zu variieren, um dieser Verteidigung zu entgehen (Vioque et al., 1998).

2.2.3.1. Enzym-Inhibitoren

Enzym-Inhibitoren wurden in den 40er Jahren des letzten Jahrhunderts zuerst aus Samen isoliert, die als Proteinase-Inhibitoren aus Sojabohne des Kunitz und Bowman-Birk Typs (Kunitz, 1945; Bowman, 1946) und als α -Amylase-Inhibitoren aus Getreide (Kneen und Sandstedt, 1943) charakterisiert wurden. Die überwiegende Mehrheit der Inhibitoren, die bis heute charakterisiert wurden, sind aktiv gegen Endoproteinasen. Eine geringere Anzahl sind die Amylase-Inhibitoren, von denen einige bifunktional sind (d.h. sie inhibieren Amylasen und Proteinase). Der Vergleich in der Aminosäuresequenz erlaubt eine Klassifizierung in zahlreichen Familien.

Die Inhibitoren der Bowman-Birk Familie sind die am weitesten verbreiteten und intensivst erforschte Gruppe. Sie kommen besonders reichhaltig in Leguminosensamen vor. Sie besitzen eine geringe Molekülmasse von M_r ca. 8.000-9.000, weisen sieben intramolekulare Disulfidbindungen (siehe Abbildung 3) auf und sind meistens „janusköpfig“, d.h. sie besitzen zwei reaktive Seiten, die die gleichen oder auch verschiedenen Serin-Proteinase nach dem „Standardmechanismus“, auch Laskowski-Mechanismus genannt (Laskowski und Kato, 1980; MEROPS), inhibieren können (gewöhnlich Trypsin und Chymotrypsin).

Die zweitgrößte Inhibitor-Familie ist die Kunitz Familie, die auch in Getreide weit verbreitet ist. Die in Leguminosen weit verbreiteten Inhibitoren sind Trypsin-Inhibitoren mit einer Molekülmasse von M_r ca. 2.000 und vier Cysteinresten, die zwei intramolekulare Disulfidbindungen ausbilden (Shewry und Casey, 1999).

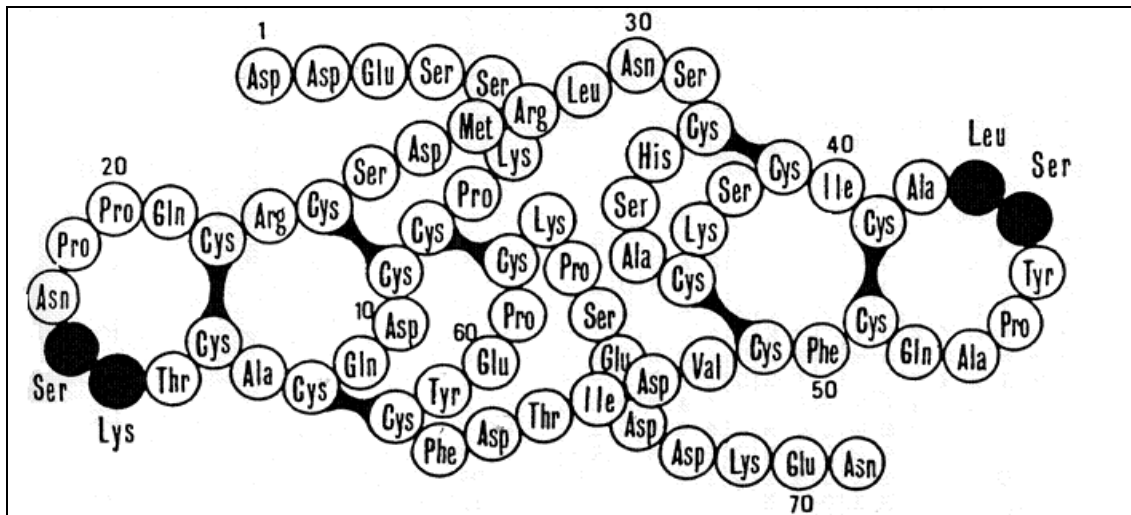


Abbildung 3: Schematische Struktur des Sojabohnen Bowman-Birk Inhibitors. Die Abbildung zeigt die beiden aktiven Seiten (Lys-Ser und Leu-Ser) (Odani und Ikenaka, 1973).

Einige Studien konnten zeigen, dass der Bowman-Birk Inhibitor eine relativ hohe thermische Stabilität, eine Resistenz gegenüber sauren Bedingungen und den Verdauungsenzymen des gastrointestinalen Traktes aufweist (Birk, 1985; Yavelow et al., 1983). Kakade et al. (1973) konnte demonstrieren, dass Proteinase-Inhibitoren für ca. 40% der Wachstumsdepression und Pankreas-Vergrößerung verantwortlich sind, die bei Ratten beobachtet wurden, welche mit Sojabohnen gefüttert wurden.

Neueste wissenschaftliche Erkenntnisse deuten jedoch darauf hin, dass Proteinase-Inhibitoren der Bowman-Birk Familie sehr vielversprechend als chemopräventive Mittel im Kampf gegen Krebs sind. Es hat sich herausgestellt, dass der Bowman-Birk Inhibitor der Sojabohne schützende oder unterdrückende Funktion auf carcinogene Prozesse in Tiermodellsystemen *in vitro* und *in vivo* besitzt (Clemente et al., 2005). Einige mögliche Mechanismen für die anticancerogene Aktivität des Bowman-Birk Inhibitors sind postuliert worden, dennoch bleiben der genaue Angriffspunkt des Proteinase-Inhibitors unbekannt. Serin-Proteinasen spielen eine Schlüsselrolle in weitreichenden biologischen Prozessen. Die aberrierenden Funktionen mancher Proteinasen stehen in Zusammenhang mit der Invasion von Tumorzellen und Metastasen, neuerdings auch mit der Angiogenese (d.h. das Wachstum von kleinen Blutgefäßen, insbesondere von Kapillaren) und Tumorstadium (Kennedy, 1998; Lee et al., 2000; Darmoul et al., 2003).

Transgene Pflanzen, die Proteinase-Inhibitoren der Bowman-Birk Familie (oder auch andere) exprimieren, versprechen eine erhöhte Resistenz gegenüber Schädlingen. Hierfür wurden aphide Parasiten wie die grünstreifige Kartoffelblattlaus (*Macrosiphum euphorbiae*), aus der die Schlupfwespe (*Aphelinus abdominalis*) hervorgeht, einigen Proteinase-Inhibitoren ausgesetzt. Diese Versuche haben gezeigt, dass die digestive proteolytische Aktivität der Larve und der erwachsenen Schlupfwespe überwiegend auf Serin-Proteinasen, die chymotrypsinähnliche Aktivität besitzen, beruht. Dabei stellte sich heraus, dass der Bowman-Birk Inhibitor die Lebensfähigkeit und demographische Parameter der ausgewachsenen Tiere beeinflusste. Die potentiellen Auswirkungen von Pflanzen, die Proteinasen inhibieren können,

auf aphide Parasiten und die Effizienz diese zu kontrollieren, war Anlass zur Diskussion (Azzouz et al., 2005).

2.3. Schwefelmangel

Schwefel ist einer der sechs Makronährstoffe, die von der Pflanze benötigt werden. Wenn man überlegt, dass Schwefel nur 3% bis 5% des Gehalts verglichen mit dem von Stickstoff ausmacht, ist es vielleicht zu verstehen, dass die Schwefelassimilation nicht in gleicher Weise erforscht ist. Aber es liegt vor allem daran, dass sowohl natürliche, als auch agrarökosysteme, N-limitiert sind, und nicht S-limitiert (waren). Die Schwefelgruppe im Cysteinmolekül, eine Thiol-Gruppe, ist extrem nucleophil (Elektronen-Donator) und damit ideal für biologische Redox-Prozesse. Bei der Oxidation können zwei Cysteinmoleküle eine kovalente Bindung eingehen, eine Disulfidbindung, die bei der Reduktion wieder in zwei Thiol-Gruppen überführt wird. Disulfid/Dithiol-Austausch ist so vielseitig, dass sich fast alle aerobischen Lebensformen, Pflanzen inbegriffen, so entwickelt haben, dass sie diese Reaktion als die dominante Form der Redox-Kontrolle benutzen. Redox-Kontrolle reguliert Enzyme und schützt vor oxidativen Schaden (Leustek und Saito, 1999).

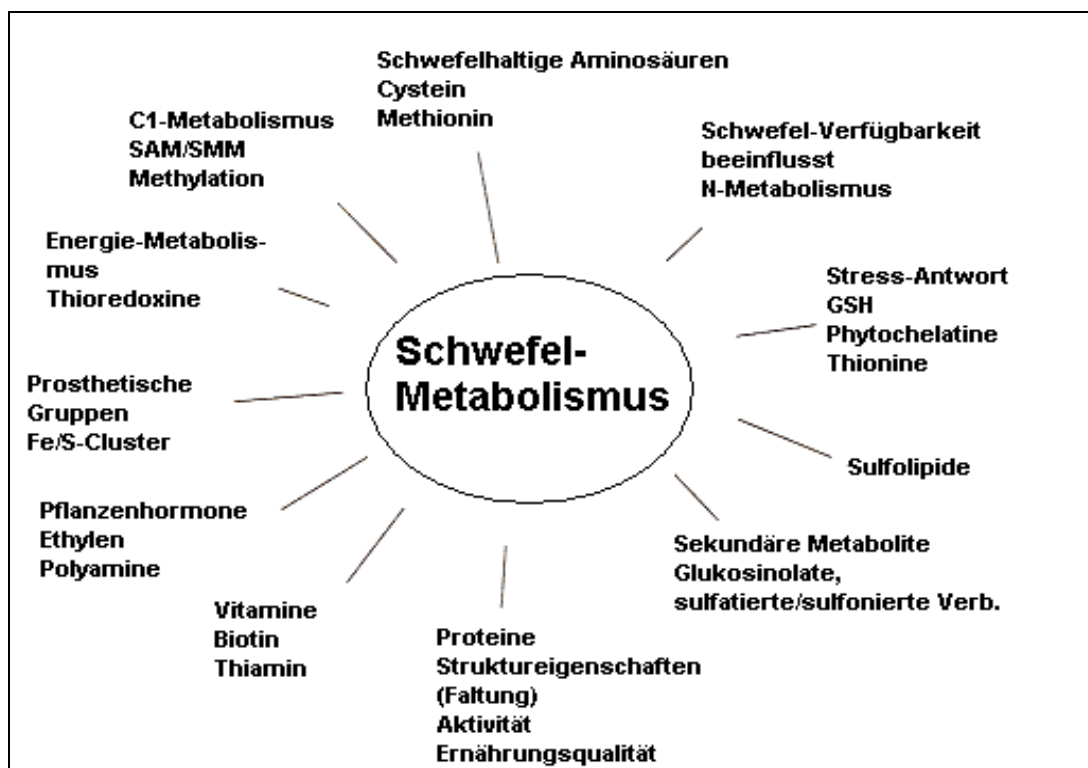


Abbildung 4: Schematische Darstellung des Einflusses von Schwefel auf die Biosynthese von Pflanzenmetaboliten oder physiologische Funktionen (nach Nikiforova et al., 2004).

Pflanzen benötigen Schwefel außerdem, um eine große Anzahl von sekundären Inhaltstoffen (siehe Abbildung 4) zu bilden, die einen Nutzen für den Menschen ausmachen und auf verschiedener Art und Weise die Umwelt beeinflussen (u.a. eine Anzahl von Aromastoffen in z.B. Zwiebel und Knoblauch) (Fahey et al., 1997).

Obwohl man dachte, dass Schwefel nicht die Pflanzenproduktivität limitieren würde, resultierte eine Einschränkung der Schwefelemission der Luft und der daraus resultierende saure Regen in Schwefelmangel in manchen Anbaugebieten dieser Welt (Cooper und Hanson, 1998).

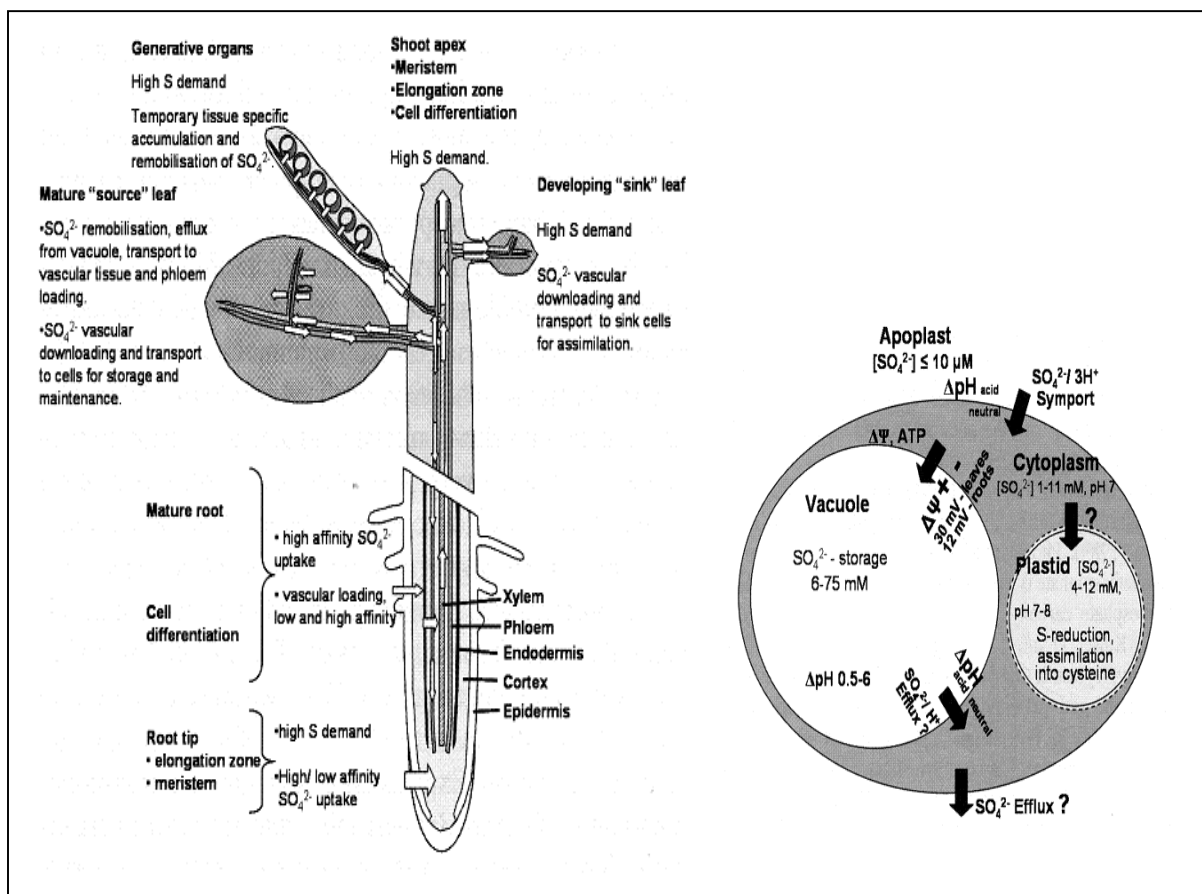
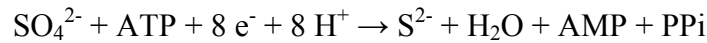


Abbildung 5: Modell der Schwefelaufnahme und -verlagerung in der gesamten Pflanze (Abbildung links); Transmembranbewegung des Sulfates, treibende Kraft und Potentialmechanismus (Abbildung rechts) (Buchner et al., 2004).

Pflanzen nehmen Schwefel primär als Sulfat (SO_4^{2-}) aus dem Boden auf. Es wird aktiv in die Wurzeln transportiert und dann meistens unmetabolisiert über den Xylem-Strom in die Blätter der gesamten Pflanze verteilt (siehe Abbildung 5). Schwefel kann in einer von zwei Oxidationszuständen assimiliert werden. SO_4^{2-} kann an eine Hydroxylgruppe eines organischen Moleküls addiert werden. Diese Sulfatierung wird durch die Sulfotransferase katalysiert. Cystein enthält Schwefel in reduzierter Form, der aus SO_4^{2-} in einem mehrstufigen Stoffwechselweg hervorgeht, bei dem acht Elektronen hinzugefügt werden, um Sulfid (S^{2-}) zu bilden.



Cystein, das Endprodukt diese Stoffwechselweges, ist das Ausgangsmaterial für die Produktion von Methionin, Glutathion, Proteine, Phytochelatine, Biotin, Thiamin, S-Adenosylmethionin, Glucosinolate und anderer Metaboliten, die reduzierten Schwefel enthalten (siehe Abbildung 4) (Leustek und Saito, 1999; Nikiforova et al., 2004).

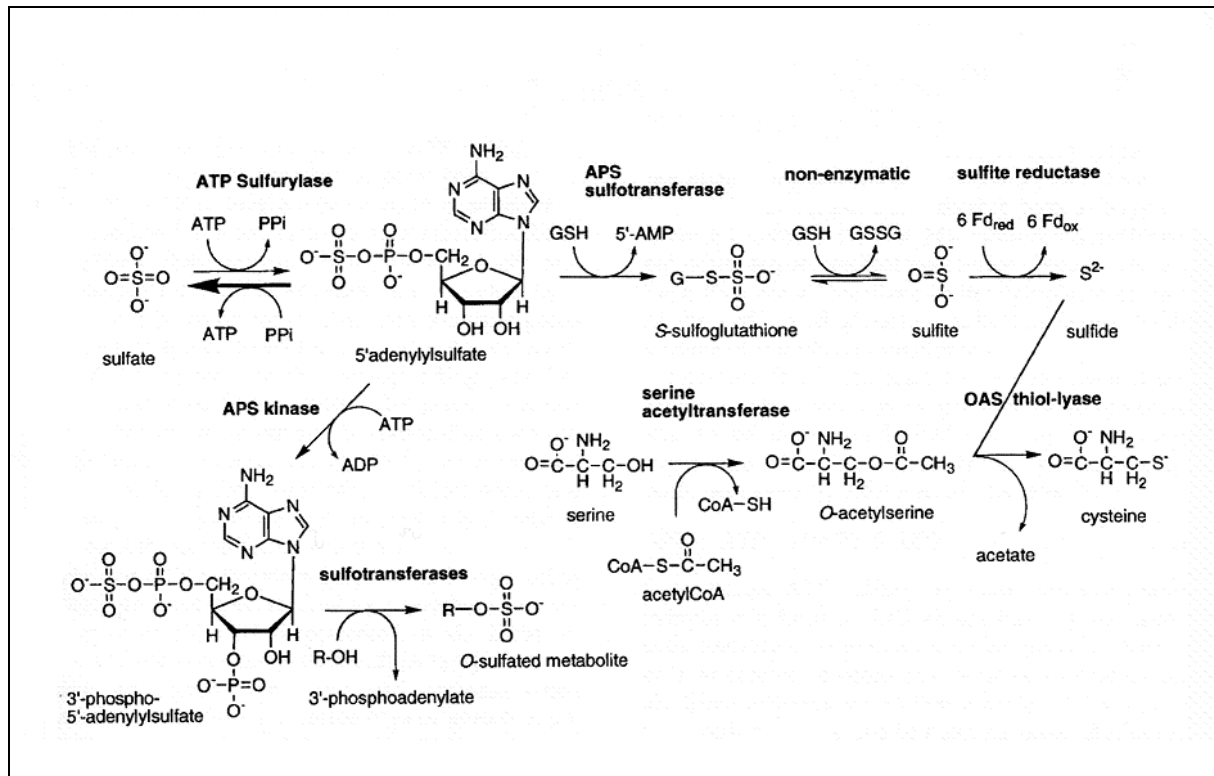


Abbildung 6: SO_4^{2-} Transport und Assimilation (nicht vollständig) (Leustek und Saito, 1999).

Es ist bekannt, dass schwefelhaltige Verbindungen wie Cystein und Glutathion die Aktivität der Schwefelassimilationsenzyme unterdrücken, wenn sie Pflanzen angeboten werden. Umgekehrt induziert Schwefelmangel die Aktivität von bestimmten Enzymen. Unter Verwendung von DNA-Sonden wurde herausgefunden, dass das stationäre Zustandsniveau der mRNA für die Sulfat-Transporter, ATP-Sulfurylase und APS-Sulfotransferase abnimmt, nachdem Pflanzenwurzeln mit Glutathion oder Cystein bei Pflanzenwurzeln behandelt wurden (Smith et al., 1997; Lappartient et al., 1999; Lee und Leustek, 1999). Im Gegensatz dazu nimmt das stationäre Zustandsniveau der mRNA dieser Proteine bei Sulfatmangel zu. Ob diese Reaktion durch Transkriptions- oder Posttranskriptionsmechanismen ausgelöst wird, ist bisher nicht bekannt (Leustek und Saito, 1999).

Schwefelmangel (siehe Abbildung 7) führt zu Chlorosen, die typischerweise an den jüngeren Blättern auftreten, Akkumulation von Anthocyanen, Krümmung des Blattrandes und

gesteigertes Wachstum der Wurzelbiomasse relativ zum Spross (Nikiforova et al., 2004). Die Ursache für die verminderten Chlorophyllgehalte ergibt sich aus der Tatsache, dass Schwefel Bestandteil von Proteinen ist und daher bei Schwefelmangel die Proteinbiosynthese gehemmt ist, was auf den Mangel an Cystein und Methionin zurückzuführen ist (Anderson, 1990). Da das Schlüsselenzym der Photosynthese Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase-Oxygenase (Rubisco) mit Abstand das wichtigste Enzym (30-50% der löslichen Proteine) der Blätter darstellt und der Schwefelgehalt dieses Enzyms mit 120-168 Schwefelatomen pro Rubisco relativ hoch ist, kommt es bei Schwefelmangel zu einer Verminderung der Rubisco-Gehalte (Miziorko und Lorimer, 1988). Da Rubisco- und Chlorophyllgehalt eng miteinander verknüpft sind (Nakano et al., 1997), dürften die verminderten Chlorophyllgehalte die Folge der verminderten Rubisco-Gehalte sein. Auch die bei Schwefelmangel beobachtete verminderte Anzahl (Burke et al., 1986) oder Größe (Dietz, 1989) der Chloroplasten sind vermutlich eher das Ergebnis sekundärer Prozesse und kein primärer Schwefeleffekt.

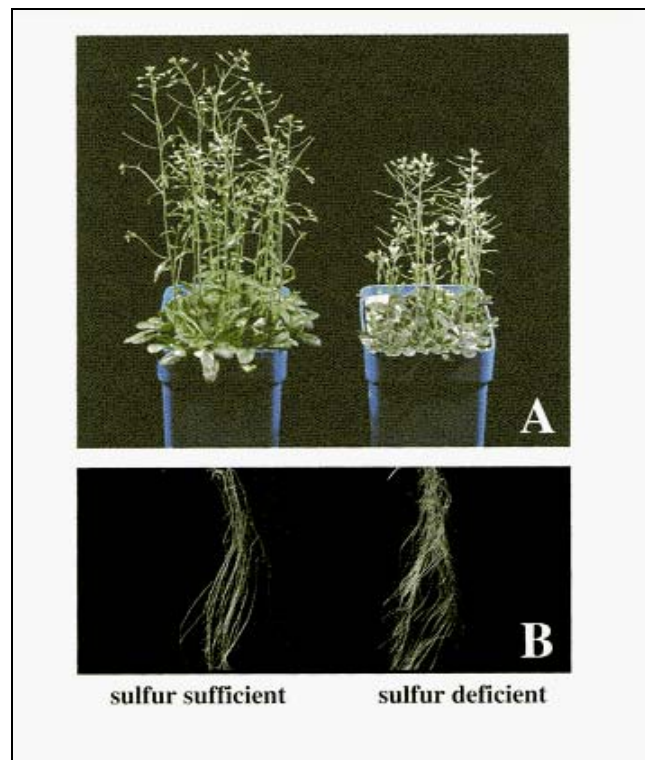
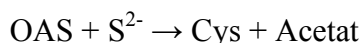


Abbildung 7: (A) Phenotypische Symptome des Schwefelmangels bei *Arabidopsis thaliana*. Die Pflanze auf der linken Seite wächst in einem Medium mit ausreichender Schwefelversorgung (nach einer Woche Wachstum), wurde dann auf ein Schwefelmangelmedium übertragen (nach 22 Tagen Wachstum). Schwefelmangel äußert sich in gehemmttem Wachstum, frühzeitigem Blütenstadium, verstärktes Wurzelwachstum, Anthocyanin-Akkumulation, veränderte Morphologie der Blätter und Chlorosen. (B) zeigt die Unterschiede des Wachstums der Wurzel bei ausreichender Schwefelversorgung (links) und Schwefelmangel (rechts) (Nikiforova et al., 2004).

Da auch bei Schwefelmangel eine lineare Beziehung zwischen der photosynthetischen Aktivität und dem Rubisco-Gehalt der Blätter besteht, kann vermutet werden, dass die bei Schwefelmangel zu beobachtende Depression der Photosyntheserate (Ahmad und Abdin, 2000) auf verminderte Rubisco-Gehalte zurückzuführen ist. Die verminderte photosynthetische Aktivität ist nicht die Ursache für die bei Schwefelmangel beobachtete Wachstumsdepression. Hierfür spricht unter anderem die Tatsache, dass es zu einer Verschiebung des Spross/Wurzel-Verhältnisses zugunsten der Wurzel, also zu einer veränderten Assimilatallokation kommt (Edelbauer, 1980; Furtini-Neto et al., 2000). Das verminderte Wachstum ist vielmehr das Ergebnis der Stoffwechselstörungen, die durch Schwefelmangel ausgelöst werden. Bekanntlich sind Kohlenstoff-, Stickstoff- und Schwefelstoffwechsel aufs engste miteinander verknüpft (Tabe et al., 2002). Bei Schwefelmangel ist die Proteinbiosynthese durch die Verfügbarkeit schwefelhaltiger Aminosäuren limitiert und es kommt über kompetitive Hemmung zu einer Anreicherung von stickstoffreichen Aminosäuren wie Glutamin, Asparagin und Arginin (Ergle und Eaton, 1951; Karmoker et al., 1991; Scherer und Lange, 1996) und anderen löslichen Stickstoffverbindungen wie Nitrat. Für letzteres dürfte auch die Bedeutung von Schwefel für die Nitratreduktase mitverantwortlich sein (Ahmad und Abdin, 1999; Ahmad et al., 1999). Die Wachstumsdepressionen, die bei allen Pflanzenarten bei Schwefelmangel beobachtet werden, fallen bei Leguminosen besonders ausgeprägt aus. Dadurch werden Leguminosen aus Mischbeständen durch Gräser verdrängt (Gilbert und Robson, 1984).

Bei Schwefelmangel kommt es zu einer Abreicherung schwefelreicher und einer Anreicherung schwefelarmer Proteine (Blagrove et al., 1976; Chandler et al., 1984; Schroeder, 1984). Hierbei scheint das O-Acetylserin (OAS) eine Schlüsselrolle zu spielen (Tabe et al., 2002). OAS kondensiert am Cystein-Synthetase-Komplex mit Sulfid aus der Sulfat-Reduktion zu Cystein.



Wenn Sulfid aufgrund geringer Sulfatreduktionsaktivität nicht ausreichend vorhanden ist, wird die OAS-Konzentration ansteigen, was ein Ablösen des Cystein-Synthetase-Komplexes bewirkt (Takahashi et al., 1997).

Eine Akkumulation von OAS scheint das Signal für die bei Schwefelmangel zu beobachtende Verschiebung zugunsten schwefelarmer Proteine und damit einhergehende Änderungen im Aminosäuremuster zu sein. In Übereinstimmung hiermit führt die Applikation von OAS zu Sojabohnenkotyledonen, die in einem schwefelreichen Medium kultiviert wurden, zu Reaktionen (erhöhte Gehalte der schwefelarmen β -Untereinheit von β -Conglycinin und deren mRNA), die für Schwefelmangel typisch sind (Kim et al., 1999). Freies Methionin scheint das Signal für eine ausreichende Schwefelversorgung zu sein, da eine gesteigerte Expression der schwefelreichen Speicherproteine und eine verminderte Expression der schwefelarmeren β -Untereinheit des β -Conglycinins in kultivierten Sojabohnenkotyledonen zu beobachten ist (Holowach et al., 1984a, b, 1986). Außerdem wurde berichtet, dass Glutathion auch als Signal für eine ausreichende Schwefelversorgung gilt, da es die Schwefelassimilation und die Schwefelaufnahme durch die Wurzeln im Sinne einer ‚Feedback inhibition‘ reguliert (Lappartient und Touraine, 1997; Lappartient et al., 1999).

Wenn Pflanzen mit ausreichend Schwefel wachsen, akkumulieren die schwefelreichen Proteine auf höchstem Niveau. Dies wird begleitet durch eine Verlagerung der Aminosäurenbilanz hinsichtlich der S-haltigen Aminosäuren in den Speicherproteinen der Leguminosen (Blagrove et al., 1976; Randall et al., 1979; Gayler und Sykes, 1985; Sexton et al., 1998) und im Falle von Weizen (*Triticum aestivum* L.) in der Backqualität (Moss et al., 1981, 1983; Zhao et al., 1999).

2.4. Diagnostik und Pflanzenanalyse

Die gezielte Verbesserung der S-Versorgung der Feldfrüchte setzt eine verlässliche Bestimmung der S-Versorgung des Standortes (Bodenuntersuchungen) bzw. der Pflanzen (Pflanzenanalyse) als Grundlage der Ableitung eines Düngerbedarfs voraus. Bis zu 98% des S-Gesamtgehaltes des Bodens liegen in Form von organischen Schwefelverbindungen vor, deren Schwefel erst durch Mineralisierung pflanzenverfügbar wird (Bloem, 1998; Scherer, 2001). Bei Bodenanalysen besteht wie beim Stickstoff das Hauptproblem in der Abschätzung des pflanzenverfügbaren Schwefels. Wesentlich vielversprechender erscheint der Weg der Pflanzenanalyse. Prinzipiell sind bei jedem Nährstoff verschiedene Indikatoren denkbar. Es gilt also geeignete auszuwählen.

Bei der Auswahl der Pflanzenanalyse wurden verschiedene Methoden diskutiert. In der Vergangenheit wurden die Gesamtschwefel-Konzentrationen wegen des direkten Bezuges zur Schwefelversorgung häufiger verwendet (Spencer et al., 1977; Gilbert und Robson, 1984). Als kritische Schwefelgehalte für die jungen Blätter von Futterleguminosen und Getreide wurden Werte von 0,2% oder etwas höher abgeleitet. Für Lupine liegt der Wert bei 0,28% (Robson et al., 1995) und damit trotz des höheren Schwefelbedarfs kaum höher. Eine Alternative stellt die Bestimmung des Sulfatgehaltes der jüngeren Blätter oder des gesamten Sprosses dar (Freney et al., 1978; Spencer und Freney, 1980), was eine wesentlich empfindlichere Methode darstellt, da der Kurvenverlauf zwischen S-Gehalt und Ertrag in der Nähe des Optimums relativ flach ist. Eine weitere Alternative bietet die Bestimmung schwefelhaltiger Metabolite, insbesondere Gluthation (Zhao et al., 1996). Diesen Verfahren gemein ist, dass die Grenzwerte einer ausreichenden Versorgung in starkem Maße vom Pflanzenalter abhängig sind. Ein vom Entwicklungsstadium der Pflanze weitgehend unabhängiges S-Diagnoseverfahren stellt die ionenchromatographische Bestimmung des Malat/Sulfat-Peakverhältnisses bei Raps und Weizen dar (Blake-Kalff et al., 2000). Die abgeleiteten Grenzwerte sind weitgehend unabhängig vom Entwicklungsstadium, und die Trennschärfe des Tests geht zumindest bei Raps teilweise auf den Anstieg der Malatkonzentration im Blatt mit zunehmendem Schwefelmangel zurück. Entscheidend ist, dass die Analyse bereits zu einem frühen Entwicklungsstadium erfolgen kann.

Nun spielen diese Diagnoseverfahren hauptsächlich eine Rolle, um den Schwefelbedarf der Pflanze im Anfangsstadium des Wachstums zu diagnostizieren und mit einer gezielten Düngung einem Mangel vorzubeugen.

Die in diesem Projekt angewandte Diagnostik ist retrospektiv, um zu beschreiben, dass bei den Versuchspflanzen ein Schwefelmangel nachgewiesen wurde. Aus diesem Grund wurde es

auch für ausreichend befunden, den Schwefelmangel bei den Versuchspflanzen anhand der Gesamtschwefel-Konzentration in den Samen abzuleiten.

2.5. Proteinanalytik

Für die Fraktionierung der Samenproteine wurde in der Vergangenheit häufig die Osborne-Fraktionierung, die u.a. von Shastry und John (1991) sowie Giami et al. (1999) modifiziert wurde. Die am meisten verwendete Methode zur semi-quantitativen Analyse ist die SDS-Gelelektrophorese. Die Trennung von Speicherproteinen ist damit zwar sehr leistungsfähig, da jedoch in den einzelnen Fraktionen (Albumine und Globuline) eine Bestimmung des Aminosäuremusters vorgesehen war, für das Vorhaben nur bedingt geeignet. Es bieten sich daher chromatographische Verfahren an, unter denen die RP-HPLC in den letzten Jahren stark an Bedeutung gewonnen hat (z.B. Wieser et al., 1998).

Für die Verwendung der RP-HPLC zur Proteinfractionierung musste eine geeignete Methode gefunden und etabliert werden. Dies schloss die Auswahl der benötigten Säulenparameter, den Gradienten sowie Identifizierung und Zuordnung der Proteinbanden mit ein. Bei der Identifizierung kam auch die SDS-Gelelektrophorese zum Einsatz. Genauso musste eine geeignete Methode zur Bestimmung der S-haltigen Aminosäuren in den durch die HPLC gewonnenen Fraktionen gefunden werden. Dabei mussten die Parameter der Hydrolyse genau festgelegt werden, wie bei der vorangehenden Oxidation auch, um zu reproduzierbaren Ergebnissen zu gelangen.

3. Material und Methoden

3.1. Pflanzenanzucht

In Gefäßversuchen im Gewächshaus wurde der Einfluss des Schwefelangebots auf die Proteinqualität der Samen von Erbse und Sojabohne untersucht. Durch Variation des S-Angebots sollte Schwefelmangel und ausreichende bis sehr hohe S-Versorgung induziert werden.

Dafür wurden sechs S-Stufen mit jeweils vier Wiederholungen gewählt (mg S/Gefäß: 0; 10; 50; 200; 500; 1.000), um auch im oberen Bereich der Schwefeldüngung herauszufinden, ob Variationen der Proteinqualität möglich sind.

3.1.1. Vorversuche

Im Rahmen von Vorversuchen stellte sich heraus, dass sowohl die Induktion von Schwefelmangel wie auch die Vermeidung von Toxizitäten (bei Mn) oder Salzschäden durch das Substrat bestimmt wurde.

Vor diesem Hintergrund wurde Weißtorf als Standardsubstrat verwendet.

Da man die Faktoren minimieren wollte, die zu einer Schwankung im Wuchs der Pflanzen führen konnten, die nicht auf eine unterschiedliche S-Versorgung zurückzuführen sind, wurde auf eine Beimpfung mit Rhizobien verzichtet. Immerhin konnte dann auch das N/S-Verhältnis von 15-22,5 (Bergmann, 1976) berücksichtigt werden, da Stickstoff in definierter Form von Ammoniumnitrat und Kaliumnitrat dem Substrat beigefügt werden konnte.

3.1.2. Durchführung der Gefäßversuche für Soja (*Glycine max.* L.)

Als zuverlässige Bedingung für die Anzucht gesunder Pflanzen bei variabler Schwefelversorgung etablierte sich, dem Substrat nur einen Teil des Schwefels der entsprechenden Schwefelstufe beizufügen. Ein weiterer Teil wurde durch das Gießwasser zugeführt.

Als Boden wurde Weißtorf (Floratorf von der Firma Floragard) verwendet. Jeweils 6 l wurden in PE-Gefäßen (Fassungsvermögen ca. 8 l) gefüllt, die zuvor zur Vermeidung von Stauwasser am Gefäßboden mit Löchern versehen wurden

Es wurde die Soja-Sorte Oghata (Prograin Eurasia B.V., Jennerstraat 224, 7909 EG Hoogeveen, Niederlande) verwendet. Früher Blühbeginn, eine mittlere Pflanzenlänge, ein mittlerer bis hoher Rohproteintrag, aber ein niedriger Kornertrag zeichnen diese Sorte aus.

Die Samen wurden in einem Gefäß, welches mit Papiertüchern ausgelegt war, das mit etwas 0,1 mM CaCl₂-Lösung getränkt war, zum Keimen gebracht. Dabei wurden die Samen auch

mit Papiertüchern abgedeckt. Etwa 10-12 Keimlinge wurde dann in die Gefäße transferiert und nach zwei Wochen auf fünf Pflanzen reduziert.

Die Beleuchtungszeit im Gewächshaus betrug 14 Stunden. Die Gewächshaustemperatur betrug 25°C.

Am Ende der Kornfüllungsphase wurden die Hülsen so lange an der Pflanze belassen, bis die Samen einen Wassergehalt von ca. 10-12% besaßen. Währenddessen wurde auch das Gießen eingestellt. Nach der Ernte wurden die Pflanzenteile separat bei 80°C im Trockenofen getrocknet.

Um den Gehalt an Magnesium für alle Schwefelstufen konstant zu halten, wurde dem Boden entsprechend der jeweiligen Schwefelstufe Magnesium als Magnesiumchlorid hinzugefügt.

Da die Pflanzen einen erheblich geringeren Gießwasserverbrauch hatten als vorher angenommen, haben sich am Ende folgende Gehalte für die Schwefeldüngung ergeben:

Tabelle 3: Schwefelgehalt in den Pflanztöpfen

angestrebte Schwefelstufe	Zugabe als Bodendüngung	Zugabe als Gießwasser	tatsächliche (berechnete) Schwefelstufe
(mg S pro Gefäß)	(mg S pro Gefäß)	(mg S pro Gefäß)	(mg S pro Gefäß)
0	0	0	0
10	5	1	6
50	10	10	20
200	25	45	70
500	50	110	160
1000	100	250	350

Tabelle 4: Nährstoffzusammensetzung für alle Versuchsglieder

Spurenelement	Zugabe als	m Salz (g pro Gefäß)
Eisen	FeNaEDTA	23,03
Mangan	MnCl ₂ × 4 H ₂ O	1,80
Zink	ZnCl ₂	0,63
Kupfer	CuCl ₂ × 2 H ₂ O	5,37
Bor	H ₃ BO ₃	2,86
Molybdän	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ × 4 H ₂ O	1,47
Element	Zugabe als	m Salz (g pro Gefäß)
Stickstoff	NH ₄ NO ₃	1,64
Phosphor	KH ₂ PO ₄	0,48
Kalium	KNO ₃	1,26
Magnesium	MgCl ₂ × 6 H ₂ O MgSO ₄ × 7 H ₂ O	1,26
Ca (pH 5,5)	Ca(OH) ₂	12,10

Der Versuch wurde von Juni und August 2004 durchgeführt. Die Vegetationsdauer betrug 72 Tage.

3.1.3. Durchführung der Gefäßversuche für Erbsen (*Pisum sativum* L.)

Analog zur Durchführung der Gefäßversuche für Soja wurden die Gefäßversuche für Erbsen durchgeführt (siehe 3.1.2.).

Als Substrat wurde wieder Weißtorf (Floratorf von der Firma Floragard) verwendet. Jeweils 6 l wurden in PE-Gefäßen (Fassungsvermögen ca. 8 l) gefüllt, die zuvor zur Vermeidung von Stauwasser am Gefäßboden mit Löchern versehen wurden

Es wurde die Erbsen-Sorte Grana (Nordsaat Saatzucht GmbH, Saatzucht Langenstein, Hauptstr.1, 38895 Böhnhausen) verwendet. Bei dieser Sorte sind Fiederblätter vorhanden. Sie zeichnet sich außerdem durch eine hohe Standfestigkeit bei der Ernte und eine starke Unterdrückung des Beikrautes aus. Weist allerdings einen niedrigen Kornertrag und einen niedrigen Rohproteingehalt auf. Diesmal wurden etwa 10-12 Keimlinge in die Gefäße transferiert und nach zwei Wochen auf die Anzahl von acht Pflanzen reduziert.

Der Schwefelgehalt und die Nährstoffzusammensetzung wurde wie unter 3.1.2. beschrieben beibehalten (siehe Tabelle 3 und 4). Auch die Gewächshaus- und Ernteparameter wurden wie bei Soja beibehalten.

Der Versuch fand zwischen September und November 2005 statt. Die Vegetationsdauer betrug 70 Tage.

3.1.4. Durchführung der Gefäßversuche mit NIL-Erbesen

Für die Durchführung des Gefäßversuches mit NIL-Erbesen wurden (mangels genügend Saatguts) nur die niedrigste und eine hohe Schwefelstufe mit jeweils vier Wiederholungen gewählt. Die tatsächlich berechnete Menge Schwefel pro Gefäß lag somit bei 0 mg Schwefel bzw. bei 160 mg Schwefel pro Gefäß. Es wurden nur 3 l Substrat (wie oben beschrieben) pro Gefäß verwendet (Vierecktöpfe mit Löchern im Boden, Fassungsvermögen ca. 4 l). Somit berechnete sich die Nährstoffzusammensetzung auf die Hälfte der oben in der Tabelle angegebenen Gehalte. Die Vorgehensweise bei der Keimung und Bepflanzung entsprach weitestgehend den unter 3.1.2. aufgeführten Bedingungen. Es wurden diesmal nur vier Pflanzen pro Gefäß kultiviert.

Die Linien wurden mit freundlicher Unterstützung von *Dr. Claire Domoney* vom John Innes Centre, Norwich Research Park, Colney, Norwich, NR4 7UH, UK ('JIC') zur Verfügung gestellt und tragen die Bezeichnungen: HA5, LA5, HC8 und LC8.

Es sind nahe isogene Linien, die sich nur im *Tri*-Locus unterscheiden, der die quantitative Variation in der TIA kontrolliert. HC8 und LC8 sind außerdem isogen im *Vc-2*-Locus, der die Variation im Vicilin kontrolliert. Die Buchstaben H und L bezeichnen die Linien mit jeweils hoher (high) oder niedriger (low) TIA, A und C jeweils die A-Linie und C-Linie.

Die Isolinien stammen aus der heterocygoten Selektion der Abkömmlinge einer Kreuzung aus JI 516 (*R* rund-samige Genotypen mit hoher TIA) und JI 868 (*r* runzelig-samige Genotypen mit niedriger TIA). Nähere Informationen zur Züchtung dieser Isolinien liefert Wiseman et al. (2003, 2006).

Der Versuch fand zwischen Februar und April 2006 statt. Die Vegetationsdauer betrug 65 Tage.

3.2. Chlorophyll-Messungen mit dem SPAD-Meter

Die Farbe des jüngsten voll entwickelten Blattes bei jeder Pflanze wurde mit einem Chlorophyll-Messgerät (SPAD 520, Minolta Co., Ltd.) in der Zeit der frühen Blüte gemessen.

3.3. Darstellung eines Acetonpulvers (bei Soja)

Zur Eliminierung von Fetten und Phenolen wurde das gemahlene (Mühle IKA, 0,6 mm Sieb) und getrocknete (Trockenofen, 80°C) Probenmaterial mit Aceton behandelt.

Dabei wurden die Proben in einen großen Überschuss von kaltem Aceton (p.A.) in Rundbogengläsern (100 × 16 mm) eingetragen. Man rechnete etwa einen zehnfachen Überschuss von Aceton, bezogen auf das Trockengewicht des Materials, und homogenisierte mittels Vortex in dieser Acetonlösung das Probenmaterial.

Nach dem Absaugen der acetonhaltigen Lösung mit einer Pasteur-Pipette wurde der Prozess mit dem Rückstand noch 2 mal wiederholt, wobei in diesen Fällen die Acetonmenge reduziert werden konnte. Schließlich wurde das unlösliche Material filtriert (Schleicher & Schüll Faltenfilter 595½) und auf einer Papierschicht ausgebreitet, wo es sehr rasch trocknete.

3.4. Trypsin Inhibitor Aktivität (TIA)

Die Bestimmung der Trypsin Inhibitor Aktivität wird anhand einer Reihe von Methoden ausgeführt, die generell auf einer Abnahmerate der Aktivität von zugefügtem Trypsin zu einem natürlichen (Casein) oder synthetischen (N_{α} -Benzoyl-DL-arginin-4-nitroanilid-Hydrochlorid, kurz BAPNA) Substrat basiert, die durch den Inhibitor hervorgerufen wird. Kakade et al. (1974) empfiehlt die Benutzung von BAPNA für die Analyse der TIA in Sojabohnen. Diese Methode wurde unter anderem auch von Clemente et al. (2005) und Wang et al. (1998) für die Analyse der TIA in Erbsen angewendet.

Die hier zugrundeliegende Methode ist von Smith et al. (1980) beinhaltet die Extraktion des Inhibitors aus Lebensmitteln bei pH 9,5 und Vermengen der ungefilterten Suspension mit bovinem Trypsin. Die Aktivität des restlichen nicht am Trypsin-Inhibitor gebundenen Trypsins wird durch die Zugabe von BAPNA unter standardisierten Bedingungen gemessen: Das freigesetzte gelbe p-Nitroanilin kann spektroskopisch bei 410 nm gemessen werden. Diese Reaktion macht eine lineare Messung der restlichen Trypsin-Aktivität möglich, sodass die Menge des reinen Trypsins, das inhibiert wurde, pro Gewichtseinheit der Probe angegeben werden kann.

3.4.1. Reagenzien

Tris-Puffer (TRIZMA®BASE: Tris[hydroxymethyl]methylamin, 50 mM, pH 8,2) (SIGMA Reagent Grade) mit 20 mM $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ (p.A.).

BAPNA (N_{α} -Benzoyl-DL-arginin-4-nitroanilid-Hydrochlorid, FLUKA $\geq 98\%$ [911-77-3]), 40 mg vollständig gelöst in 1 ml Dimethylsulfoxid (Uvasol) und dann gelöst in 100 ml Tris-Puffer (vorher erwärmt auf 37°C). Dieses Substrat sollte jeden Tag frisch hergestellt werden. Standard-Trypsin-Lösung. 22 mg bovines Trypsin (FLUKA [9002-07-7]; EC 3.4.21.4) in 1 mM HCl lösen und auf 1 l auffüllen. 2 ml dieser Lösung ergeben bei Durchführung der unten beschriebenen Methode nach Abzug des Reagenzienleerwertes eine Absorption von $0,410 \pm 0,10$. Diese Lösung ist eine Woche bei 4°C haltbar.

Des Weiteren wurde auch HCl (1 mM, p.A.), Essigsäure (30%ig, p.A.) und NaOH-Lösung (4,5 mM, p.A.) benötigt.

3.4.2. Probenvorbereitung

Es wurden 0,5 g der feingemahlene Probe (Acetonpulver bei Soja) in eine 100 ml PE-Flasche genau eingewogen, mit 25 ml 4,5 mM NaOH-Lösung versetzt und drei Stunden bei RT unter Schütteln (Orbitalschüttler) extrahiert. Nach der Extraktion wurde die Suspension mit Bidest entsprechend verdünnt, falls die prozentuale Hemmung nicht 40-60% betrug.

3.4.3. Bestimmung der TIA

Die folgenden Zusätze wurden aufeinanderfolgend in Rundbogengläser (100 × 16 mm) pipettiert: (A) *Reagenzien-Leerwert*: 2 ml Bidest; (B) *Standard (40 µg Trypsin)*: 2 ml Standard-Trypsin-Lösung, 2 ml Bidest; (C) *Proben-Leerwert*: 1 ml verdünnter Probenextrakt, 1 ml Bidest; (D) *Probe*: 1 ml verdünnter Probenextrakt, 1 ml Bidest, 2 ml Standard-Trypsin-Lösung.

Nachdem der jeweilige Inhalt gemischt und im Wasserbad 10 Minuten auf 37°C temperiert worden war, wurden 5 ml BAPNA-Lösung (auf 37°C vorgewärmt) in jedes Rundbogengläschen pipettiert. Nach exakt 10 Minuten Inkubation bei 37°C erhielt jedes Gläschen 1 ml Essigsäure (30%ig v/v), um die Reaktion zu stoppen. Diese 10 Minuten müssen auch wirklich exakt eingehalten werden, weil man sonst zu unterschiedlichen Ergebnissen gelangt. Die Standard-Trypsin-Lösung wurde dann dem Reagenzien-Leerwert (A) und dem Proben-Leerwert (C) hinzugefügt. Dann wurde die Absorption der klaren Lösung bei 410 nm (Hitachi U-3000 Spectrophotometer) gemessen. Das Chromophor war für ein bis zwei Stunden stabil.

3.4.4. Berechnung

Die Absorptionsänderung (A_I) bedingt durch die Trypsinhemmung pro ml verdünnten Extraktes beträgt $(A_{\text{Standard}} - A_{\text{Reagenzien-Leerwert}}) - (A_{\text{Probe}} - A_{\text{Proben-Leerwert}})$. Die prozentuale Hemmung in den einzelnen Proben ist definiert als: $100 A_I / (A_{\text{Standard}} - A_{\text{Reagenzien-Leerwert}})$. Falls die prozentuale Hemmung <40% oder >60% war, sollte die Bestimmung bei einer adäquaten Verdünnung wiederholt werden. Der TIA wurde wie folgt berechnet:

$$\text{TIA (mg gehemmtes Trypsin/g Probe)} = 2,632 \times \text{VD} \times A_I / \text{EW}$$

Dabei sind:

VD = Verdünnung

A_I = Absorptionsänderung

EW = Einwaage (g)

2,632 = Konstante, welche auf dem Gewicht an gehemmteten Trypsin ml⁻¹ basiert

3.5. Schwefel- und Sulfat-Analytik

3.5.1. Schwefelmessung mittels Elementaranalysator

Die Messung des Gesamt-Schwefel-Gehalts erfolgte anhand eines Elementaranalysator (Eltra Metalyt CS).

Dafür wurden die feingemahlten und getrockneten Proben in ein Porzellanschiffchen eingewogen und bei 1.300°C im Sauerstoffstrom totalverbrannt. Das Verbrennungsprodukt Schwefeldioxid wurde dabei spektroskopisch mittels Absorption im IR-Bereich gemessen.

Bei Blattanalysen wurden die Blätter mit einer Kugelmühle (MM200, Retsch, Haan, Deutschland) feingemahlen und getrocknet (Trockenofen, 80°C).

3.5.2. Heißwasserextraktion

Zur Messung des Sulfat-Schwefel-Gehalts wurden die Proben einer Heißwasserextraktion unterzogen. Dazu wurden jeweils etwa 60 mg der feingemahlten und getrockneten Proben in Rundbogengläser (100 × 16 mm) genau eingewogen und mit PE-Lamellenstopfen (mit einem kleinen Loch versehen) verschlossen. Es wurden 3 ml Bidest zu jedem Gläschen pipettiert, der Inhalt homogenisiert und sofort in kochendes Wasser gestellt. Nach 2,5 Minuten wurden die Gläschen aus dem Wasserbad genommen und nochmals homogenisiert. Die Proben wurden weitere 2,5 Minuten im kochenden Wasser belassen (insgesamt 5 Minuten), danach zum Abkühlen in ein Eisbad gestellt (mindestens 30 Minuten), zentrifugiert (5°C, 3800 rpm, 30 Minuten) und an RP-18-Kartuschen (Phenomenex Strata C-18-E; 55 µm, 70 Å) aufgereinigt.

3.5.3. Messung des Sulfatschwefel-Gehalts mittels Ionenchromatographie (HPIC)

Die nach 3.2.2. vorbehandelten Proben wurden einer Anionen-HPIC unterzogen, um den Sulfat-Gehalt zu messen. Bei dieser Methode war es möglich neben Sulfat auch andere Anionen wie Nitrat, Chlorid, etc. zu messen.

Gerät:	ICS 2500 Dionex, bestehend aus: AS50 Autosampler, AS50 Chromatography Compartment, ED50 Electrical Detector, GP50 Gradient Pump
Trennsäule:	AS11
Suppressor:	AMMS III (4 mm)
Eluent A:	bidest. Wasser
Eluent B:	50 mM NaOH
Fluss:	1,5 ml/min
Gradient:	0 min. 4% Eluent B, 5 min. 10% B, 13 min. 48% B, 13,5 min. 100% B, 14,5 min. 100% B

3.6. Messung der schwefelhaltigen Aminosäuren (Methionin und Cystein)

3.6.1. Saure Hydrolyse

Die schwefelhaltigen Aminosäuren Methionin, Cystein bzw. Cystin sind zu un stabil für eine saure Hydrolyse und neigen dazu sich in sehr ähnliche Derivate umzuwandeln. Dies erschwert eine Quantifizierung des Gehalts an diesen Aminosäuren. Solche Derivate mit geeigneter Modifikation sind offen für die Bestimmung mit dem Analysator. Deshalb werden die Aminosäuren Methionin und Cystein erst bestimmt, nachdem sie einer Oxidation (siehe Abbildung 8) mit Perameisensäure unterzogen wurden und zu Methioninsulfon und Cysteinsäure derivatisiert wurden (94/64/EC; Spackman et al., 1958; Moore, 1951).

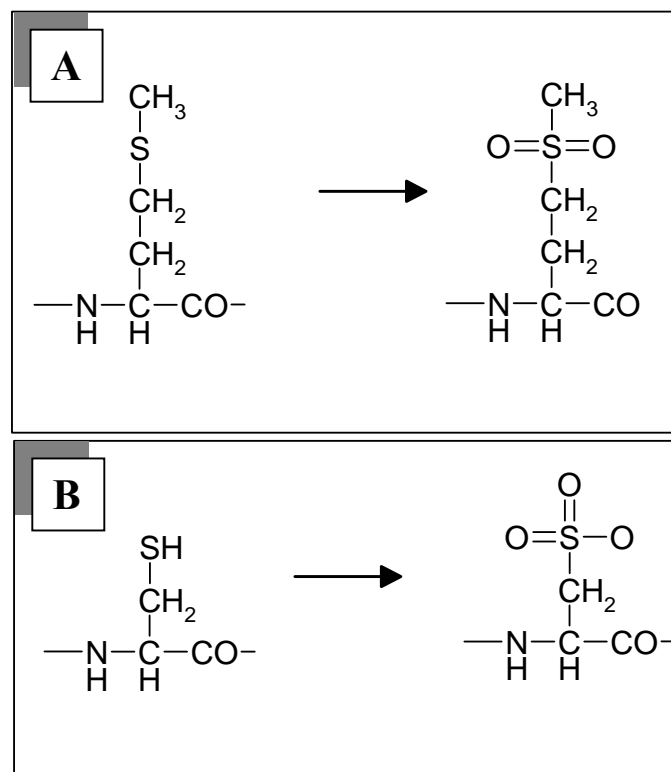


Abbildung 8: Oxidation der Aminosäuren (A) Methionin zu Methioninsulfon und (B) Cystein zu Cysteinsäure.

Die Analyse von Aminosäuren bringt aber noch weitere Probleme mit sich, was die Standardisierung, die Kontrolle der Hydrolyseschritte und die Auswahl der akkuratesten Methode zur Aminosäure-Analyse betrifft.

Wenn die Methode mit vorangegangener Oxidation verwendet wird, bringt dies wiederum Nachteile bei der Bestimmung von Tyrosin mit sich, das dabei zerstört wird (Bech-Andersen et al., 1990).

Um vergleichbare Ergebnisse zu liefern, müssen einige Parameter standardisiert werden: Die Partikelgröße des Mehles, das Verhältnis Probe/Säure oder Probe/Oxidationsreagenz, Stickstoffatmosphäre im Reaktionsgefäß, Hydrolyse-Zeit und Temperatur und die Behandlung des Hydrolysates vor der Injektion in den Analysator (Evaporation oder Einstellung des pH).

Um Heterogenitäten und unvollständige Hydrolyse zu vermeiden, sollte die Partikelgröße kleiner als 0,6 mm sein. Ein zu hohes Verhältnis zwischen Probe und Säure führt auch zu einer unvollständigen Hydrolyse. Außerdem sollte ein Minimumverhältnis zwischen Probe und Oxidans eingehalten werden, da sonst nicht alles Methionin oder Cystein in der Probe erfasst werden kann. Eine Schutzatmosphäre mit einem Inertgas wie Stickstoff verhindert die Oxidation und den Abbau von Aminosäuren. Die Schutzatmosphäre ist vor allen Dingen wichtig, wenn schwefelhaltige Aminosäuren ohne vorangegangener Oxidation bestimmt werden sollen (Wathelet, 1999).

3.6.1.1. Reagenzien

Perameisensäure: Zu 72 ml der Ameisensäure (98-100%, p.A., MERCK) gibt man 1,5 ml Methanol (LiChrosolv, MERCK) und 7,5 ml H₂O₂ (30%, p.A., MERCK). Diese Lösung sollte mindestens zwei Stunden bei RT in einem geschlossenen Gefäß aufbewahrt werden, um die maximale Produktion von Perameisensäure zu gewährleisten.

Es wurde außerdem Bromwasserstoffsäure (HBr) (47%, p.A.), Natriumhydroxid (NaOH) (p.A.) und Salzsäure (HCl) (36-38%, 'Baker Analyzed') verwendet.

3.6.1.2. Oxidation mit Perameisensäure

Ca. 12 mg feingemahlene und getrocknete Mehl wurde im 50-ml-Rundkolben genau eingewogen. (Wurde proteinhaltige Lösung verwendet, musste die Probe vorher getrocknet werden.)

Ein paar Tropfen der Perameisensäure wurden auf die Probe pipettiert, um diese etwas aufzuweichen. Dann wurde die Probe für ca. 10 Minuten in einen Tiefkühlschrank bei -18°C gestellt.

Als nächstes wurde die Probe mit 3-5 ml Perameisensäure versetzt und über Nacht bei <3°C geschüttelt (Orbitalschüttler). Der Kolben sollte dabei aufrecht stehen.

Es wurden 5 ml Bideest hinzugefügt und dann mit 600 µl HBr vermischt, um die restliche Perameisensäure zu zerstören. Man lässt den Kolben ca. 15 Minuten unter dem Abzug stehen, damit die Bromdämpfe entweichen können.

Die Lösung wurde mit dem Rotationsverdampfer bis fast zur Trockne eingedampft. Man sollte etwas festes NaOH in den Auffangkolben geben, um die restliche HBr zu absorbieren.

3.6.1.3. Durchführung der Hydrolyse mit 6 M HCl

Es wurden 3 ml 6 M HCl in 1 ml Volumina verwendet, um das Oxidat aus dem Kolben in die Spießampulle (5 ml, mit Brechring) zu transferieren.

Unter Beibehaltung einer N₂-Schutzatmosphäre wurde die Ampulle verschlossen.

Die Ampulle wurde in aufrechter Position 22 Stunden bei 110°C ± 2°C in einen Umluft- bzw. Trockenofen aufbewahrt.

Danach wurde die Probe aufrecht aus dem Ofen genommen, damit keine Flüssigkeit in den Hals der Ampulle fließen kann und im Kühlschrank abgekühlt.

Nach dem Abkühlen wurde die Spießampulle geöffnet und der Inhalt über einen Spritzenfilter (Rotilabo, CME, 0,45 µm) in einen 50-ml-Kolben filtriert. Die Ampulle wurde 2 bis 3 mal mit Bidest ausgespült und den Kolben am Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingedampft (auch hier wurde wieder etwas NaOH in den Auffangkolben geben, um die verdampfende Säure zu neutralisieren).

Die restliche HCl wurde entfernt, indem man den Kolben über Nacht in einen evakuierten Exsikkator stellte, den man vorher mit einem offenen Gefäß beschickte, das NaOH-Plätzchen enthielt.

Die Probe konnte zur Analyse im Aminosäure-Analysator in Probenverdünnungspuffer gelöst werden (siehe unter 3.6.2.). Nachdem alles feste Material komplett gelöst wurde, konnte die Lösung analysiert werden. Sollte noch festes Material, was aus der Trocknung resultieren könnte, vorhanden sein, musste dieses filtriert oder abzentrifugiert werden. Konnte die Probe nicht gleich analysiert werden, wurde sie bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt oder eingefroren.

3.6.2. Aminosäureanalytik

Verschiedene Methoden sind dazu geeignet Aminosäuren zu bestimmen. Zu den Methoden zählt die Bestimmung mit HPLC, GC (Duncan und Poljak, 1998) oder Kapillarelektrophorese (Smith, 1997). Die Bestimmung mit der HPLC wird vorrangig für Lebensmittel verwendet. Da Aminosäuren mit UV oder Fluoreszenz nicht so leicht detektierbar sind, werden sie derivatisiert. Dafür stehen zwei Methoden zur Wahl:

- Die Vorsäulenderivatisierung mit o-Phthaldialdehyd (OPA) (Bruton, 1986; Fürst et al., 1990) auf Derivatisierungs-Autosampler, Trennung auf einer Reversed Phase-Säule und anschließender Fluoreszenzdetektion. Nachteil: Die Methode ist nicht geeignet für die Bestimmung von Cystein. Ähnlichen Methoden: Derivatisierung mit 9-Fluorenylmethylchloroformat – FMOC-Cl (Haynes et al., 1991; Ou et al., 1996), 1-Dimethylaminonaphthalen-5-sulfonylchlorid – Dansyl-Cl (Simmaco et al., 1990) oder mit 4-(Dimethylamino)azobenzene-4'-sulfonyl chlorid – Dabsyl-Cl (Waters Corporation 1996 AccQ Tag Solutions, Milford, MA.).
- Die Nachsäulenderivatisierung mit Ninhydrin und Trennung auf einem Kationenaustauscher-Harz. Es entstehen einheitliche Produkte, die Derivate des Chromophors Ruhemann's Purple darstellen. Bei dieser ursprünglich von Moore und Stein (1951) eingeführten Methode werden Gemische von Aminosäuren an einem

Kationenaustauscher durch (stufenweise) Gradientenelution mit Lithiumcitratpuffer getrennt. Dies ist die Standardmethode zur Erfassung aller Aminosäuren in Lebensmitteln und ähnlichen Proben (Maier, 1990). Instrumenteller Vorteil: Es braucht nur einen Standard-Autosampler zur Injektion.

Im medizinischen Bereich hat sich zunehmend die OPA-Vorsäulenderivatisierungs-Methode durchgesetzt (eine Nachsäulenderivatisierung wäre auch möglich). Beide Methoden sind heute auf vollautomatischen, modularen HPLC-Systemem durchführbar.

3.6.2.1. Durchführung

Die Aminosäureanalyse erfolgte am Biochrom 30 series Amino Acid Analyser.

Als Puffersystem wurde folgendes verwendet:

Tabelle 5: Puffersystem für die Aminosäure-Chromatographie

	A	B	C	D	E	PVP
pH	2,95	3,30	4,25	8,00	10,30	2,20
Lithiumhydroxid(× H₂O)				2,1 g	12, 6g	
Lithiumacetat(× 2H₂O)	16,3 g	18,4 g	20,4 g	5,1 g		16,3 g
Methanol	25-30 ml	10 ml				25 ml
Ameisensäure	7,5 ml	6,0 ml	3,5 ml	4,0 ml	2,0 ml	7,5 ml
Lithiumtetraborate				8,45 g	8,45 g	
Oktansäure	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
Bidest	auffüllen auf 1l	auffüllen auf 1l	auffüllen auf 1l	auffüllen auf 1l	auffüllen auf 1l	auffüllen auf 1l

PVP = Probenverdünnungspuffer

Alle Reagenzien waren p.A.-Qualität, außer Methanol (LiChrosolv). Die pH-Einstellung erfolgte mit Trifluoressigsäure (Uvasol) und Lithiumhydroxid. Alle Puffer wurden mit PTFE-Filtern (0,22 µm) filtriert. Die Ninhydrin-Lösung wurde als fertige Messlösung vom Laborservice Onken GmbH bezogen.

3.7. Protein-HPLC

3.7.1. Fortschritte in der Technologie

Da es ein Ziel dieser Arbeit war, den Einfluss von Schwefel auf das Proteinmuster zu untersuchen, musste eine geeignete Methode gefunden werden.

In der Vergangenheit wurden verschiedene Techniken bewertet, um die Identität verschiedener Sojabohnensorten festzustellen. Methoden wie die Ultrazentrifugation (Wolf et al., 1961; Saio et al., 1969), Gelelektrophorese (Saio et al., 1969; Hughes und Murphy, 1983; Fontes et al., 1984; Sathe et al., 1987), isoelektrische Fokussierung (Mori et al., 1981) und die Rocket-Immunoelktrophorese (Murphy und Resurreccion, 1984) wurden beurteilt.

Keiner dieser Methoden ist wirklich befriedigend, was insbesondere die mangelnde Reproduzierbarkeit und die Langwierigkeit bzw. Länge der Analysenzeit betrifft. Extensive Studien bei der Charakterisierung von Getreidesorten (Bietz, 1983, 1986; Wieser et al., 1998) mittels HPLC haben dazu angespornt, diese Technik auch für die Bestimmung von Samenproteinen aus Leguminosen zu nutzen (siehe Abbildung 9).

Fortschritte in der Technologie der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie machten die Trennung von Proteinen mit hohem Molekulargewicht einfacher. Bedingungen zur Elution und Extraktion von Sojabohnensamenproteinen mittels HPLC mit Umkehrphasen waren Gegenstand von vielfältigen Untersuchungen. Buehler et al. (1989a, b) untersuchten den Einfluss verschiedener Parameter wie Konzentration der Trifluoressigsäure in der mobilen Phase, Fließgeschwindigkeit, Detektorwellenlänge und Proteinextraktion. Sie benutzten eine RP4 wide pore-Säule. Dabei fanden sie heraus, dass eine Änderung der Konzentration der Trifluoressigsäure zwischen 0,01% und 0,20% die Auflösung der Banden nicht beeinflusste. Die gleichen Elutionsprofile wurden bei Fließgeschwindigkeiten von 0,5 ml/min und 1,0 ml/min erbracht. Immerhin war die Analysendauer bei höheren Fließgeschwindigkeiten verkürzt. Detektorwellenlängen von $\lambda = 254$ nm und $\lambda = 280$ nm registrierten die Proteine, aber bei Detektorwellenlängen von $\lambda = 210$ nm konnte die Detektion von Proteinen geringerer Abundanz aufgrund ihrer höheren Absorption bei dieser Wellenlänge verbessert werden (Proteine, die Tryptophan- und Tyrosinreste enthalten, können etwas besser bei $\lambda = 280$ nm detektiert werden) (Bietz, 1983). Optimale Extraktionseigenschaften aus nicht eingeqollenen Sojabohnensamen wurden erhalten, wenn die Extraktionslösung 0,4 M NaCl enthielt, während die Peak-Auflösung durch Harnstoff und Natriumdodecylsulfat sich nicht verbesserte. Sojabohnensamenproteine wurden mittels RP-HPLC erfolgreich getrennt, die somit ein geeignetes Verfahren zur Saatgutprüfung, Sortenechtheitsbestimmung, Samenqualitätsbestimmung etc. ist.

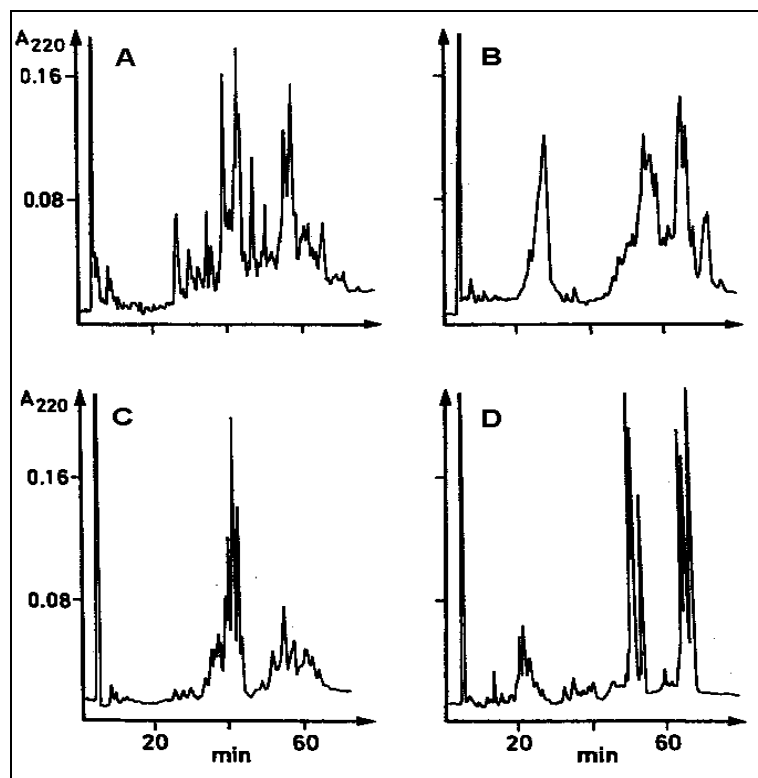


Abbildung 9: RP-HPLC der Prolamine von (A) Weizen (Sorte „Kolibri“), (B) Roggen (Sortenmischung), (C) Gerste (Sorte „Aura“) und (D) Hafer (Sorte „Alfred“) (Wieser und Belitz, 1989).

Verzele et al. (1988) hat den Einfluss der Partikelgröße auf die Peak-Verbreiterung untersucht. Da die Auflösung der Peaks durch die Säulenlänge, den inneren Säulendurchmesser und durch die Partikelgröße des Füllmaterials bestimmt wird, sollte der Einfluss der Partikelgröße des Füllmaterials auf die Peak-Verbreiterung bei großen Molekülen bzw. Proteinen untersucht werden. Die Auflösung nahm bei sinkender Partikelgröße ab. Für die Chromatographie von Proteinen sind deshalb ein niedriger Gradient und eine hohe Durchflussrate nötig.

Ein weiterer Einflussfaktor ist die Wahl der geeigneten Alkyl-Kettenlänge. Die Retention von Proteinen auf RP-Säulen korreliert oft gut mit ihrer ansteigenden relativen Hydrophobizität. Je kürzer die Alkyl-Kettenlänge (z.B. C_4 , C_5), desto besser ist typischerweise die Trennung von „klebrigen“ hydrophoben Proben, während RP-Säulen mit längeren Alkyl-Ketten (z.B. C_{18}) passender für hydrophile Proben sind. Mit wachsender Alkyl-Kettenlänge steigt auch die Stärke der hydrophoben Wechselwirkung mit dem Protein an. Das kann zu signifikanten Verlusten der Bioaktivität der Probe führen. Im Allgemeinen sind zytosolische Proteine eher hydrophil, während Membran-Proteine eher zur Hydrophobizität neigen.

Die Porengröße der Partikel (mit empfohlenen Durchmessern von $5\ \mu\text{m}$ und $8\ \mu\text{m}$) sollte gemäß der Größe der gelösten Proteine gewählt werden, um einen eingeschränkten Zugang zur stationären Phase zu vermeiden (d.h., je größer das Protein, desto größer die optimale benötigte Porenweite). Kleine Peptide mit 1 bis 10 Resten benötigen eine Porenweite von $90\ \text{Å}$, wobei sehr große Proteine (z.B. $100\ \text{kDa}$) eine Porenweite von annähernd $4.000\ \text{Å}$

benötigen. Allgemein reicht eine Porenweite von 300 Å für die meisten Proteine (Bradshaw, 2000).

3.7.2. Durchführung

3.7.2.1. Reagenzien

Acetonitril (ROTISOLV®, HPLC, Roth) und Trifluoressigsäure (TFA) (Uvasol) wurden für die mobile Phase verwendet. Für den Extraktions-Puffer wird Tris[hydroxymethyl]methylamin (TRIZMA®BASE, SIGMA Reagent Grade), 2-Mercaptoethanol und NaCl (beides p.A.) verwendet. Die pH-Einstellung erfolgte mit HCl (0,1 M, p.A.). Das Wasser für die HPLC und Analysen (Bidest) wurde durch ein Reinstwasser-System (Clear) der Firma SG (Wasseraufbereitung und Regenerierstation GmbH, 22885 Barsbüttel) aufbereitet (Leitwert: 0,055 µS/cm).

Es hat sich gezeigt, dass die Verwendung von Acetonitril geeigneter Qualität von großer Bedeutung war. Da Produkte anderer Firmen eine zu hohe Eigenabsorption aufwiesen, wurde das oben aufgeführten Produkt bevorzugt (diese Eigenabsorption konnte außerdem mit der Lagerungsdauer ansteigen).

3.7.2.2. Extraktion der Proteine

Die Extraktion erfolgte mit einem Tris-Puffer bestehend aus 30 mM Tris-HCl (pH 7,6), 10 mM 2-Mercaptoethanol und 0,4 M NaCl. Das Acetonpulver wurde dabei im Verhältnis 40:1 (v/w) auf Eis 30 Minuten geschüttelt (Wippschüttler), bei 27.000 g, 30 Minuten bei 5°C zentrifugiert und vor der Injektion filtriert (Rotilabo, CME, 0,45 µm).

3.7.2.3. Präparation der Proteinfractionen (Methode nach Thanh und Shibasaki)

Um die Globuline von den Albuminen zu trennen und Referenzmaterial für die RP-HPLC zu erhalten (diese waren vor ca. zehn Jahren noch im Handel erhältlich), wurde Glycinin und β-Conglycinin (Globulinfraktion) mittels Präzipitation nach der Methode von Thanh und Shibasaki (1976) präpariert.

Dazu wurde ein Soja-Extrakt aus Acetonpulver mit einem pH 8,0 Tris-Puffer (30 mM, mit 10 mM 2-Mercaptoethanol) hergestellt. Der pH-Wert des Extrakts wurde auf pH 6,4 (mit HCl) eingestellt und über Nacht bei 3-5°C gekühlt. Anschließend wurde das Präzipitat bei 27.000 g in 30 Minuten bei 5°C zentrifugiert. Das daraus resultierende Präzipitat, ein „grobes“ Glycinin, wurde mit 30 mM Tris-Puffer (pH 6,4) gewaschen, wieder gelöst in pH 7,6 (Ionenstärke 0,5) Kaliumphosphat-Natriumchlorid-Puffer (bestehend aus 0,4 M NaCl, 33 mM K₂HPO₄, 2,6 mM KH₂PO₄, 0,02% NaN₃ und 10 mM 2-Mercaptoethanol) und dialysiert gegen Bidest. Der nach dem Entfernen des „groben“ Glycinins aus dem Tris-Extrakt bei pH 6,4 verbleibende Überstand wurde auf pH 4,8 eingestellt, um „grobes“ β-Conglycinin

zu erhalten. Das „grobe“ β -Conglycinin wurde in 30 mM Tris-Puffer (pH 7,6) dispergiert und der pH-Wert auf pH 6,2 eingestellt und anschließend zentrifugiert, um das polymerisierte β -Conglycinin zu entfernen. Der Überstand wurde wieder gegen Bidest dialysiert. Die dialysierten Überstände wurden filtriert (Rotilabo, CME, 0,45 μ m) und in die RP-HPLC injiziert.

3.7.2.4. RP-HPLC

Die Auftrennung der Speicheralbumine bzw. -globuline erfolgte mittels Hochleistungsflüssigchromatographie an einer Umkehrphase (RP-18).

Gerät:	Milton Roy CM 4000 (multiple solvent delivery system); spectroMonitor 3100 (variable wavelength detector); Spark Holland Column Thermostat
Trennsäule:	Grom Saphir C ₁₈ (5 μ m, 250 \times 4 mm, 300 Å); Vorsäule: Grom-SIL ODS-5 ST (10 \times 4,6 mm); Säulen-Temperatur: 60°C
Detektion:	UV-Absorption (210 nm)
Eluent A:	0,1% TFA in Wasser
Eluent B:	0,1% TFA in Acetonitril
Fluss:	1 ml/min;
Gradient (Soja):	5 min isokratisch auf 0% B, 30 min auf 50% B, 40 min auf 45% B
Gradient (Erbsen):	5 min isokratisch auf 0% B, 40 min auf 75% B, 50 min auf 75% B

3.7.2.5. Trennsäulenvergleich

Es wurden drei Reversed Phase-Säulen, die mit Material unterschiedlicher Herkunft gefüllt sind, miteinander verglichen. Dazu gehörte eine moderne Trennsäule von der Firma Grom (Grom Saphir C₁₈), die entwickelt wurde, um große Proteine und Polypeptide zu analysieren. Weitere Eigenschaften dieser Säule sollen eine hohe pH-Stabilität (pH-Bereich 1,5 bis 10), scharfe Peaks, eine hohe Ausbeute durch sehr sauberes Silika (bis zu 99,99% metallfrei) und eine dichte Bürstenschicht sein. Diese Eigenschaften sollen eine hohe Kapazität garantieren. Des Weiteren wurden noch eine Nucleosil C₁₈- (5 μ m, 250 \times 4 mm, 300 Å) und eine Vydac C₁₈-Trennsäule (10 μ m, 250 \times 4 mm, 300 Å) zum Vergleich herangezogen, wobei die Grom Saphir C₁₈ und die Nucleosil C₁₈ die gleichen Spezifikationen aufweisen. Nur die Vydac C₁₈ weicht mit einer Partikelgröße von 10 μ m von den anderen beiden Trennsäulen (beide 5 μ m) ab.

Die Auswertung wurde mit ChromQuest™ durchgeführt, wobei verschiedene Integrationsparameter (Peak Width) benutzt wurden, um die durchschnittliche Peak-Anzahl zu bestimmen. Dabei wurden nur Peaks gezählt die von der Software eindeutig integriert wurden.

Die Integrationsparameter waren:

Threshold:	3
Min Area:	20
Peak Width:	0,3 - 0,8

3.8. Messung des Gesamt-Stickstoff-Gehalts

Der Gehalt an Gesamt-Stickstoff im Mehl wurde mittels Elementaranalysator mit der Methode nach Dumas bestimmt.

Bei dieser Methode wird die pulverförmig gemahlene Probe einer Totalverbrennung unter Heliumstrom bei 1200°C unterzogen. Nach Absorption des CO₂ und eventuell sich bildender anderer Gase wird der gebildete Stickstoff gaschromatographisch mit einem Wärmeleitfähigkeitsdetektor bestimmt (Maier, 1990).

Zur analytischen Erfassung des Gesamtprotein- oder Rohproteingehaltes (beide Begriffe sind in einigen Disziplinen synonym, in einigen Disziplinen benutzt man nur einen der beiden Begriffe, wobei sie immer im Gegensatz zu dem Begriff „Reinprotein“ verwendet werden) wird in der Regel der gemessene Stickstoffanteil mit dem Faktor 6,25 (16% N im Protein) multipliziert, um den Proteingehalt zu erhalten (Horwitz, 1970; Souci et al., 1963-1979; Nakasathien et al., 2000; Wang et al., 1998; Wathelet, 1999). Im Folgenden wird nur noch der Begriff „Rohprotein“ verwendet.

Gerät:	Elementaranalysator 1108, Carlo Erba, Mailand
Trägergas:	Helium
Detektor:	Wärmeleitfähigkeitsdetektor

Einwaage eines Äquivalents von ca. 20 µg N in Zinnschiffchen 4 × 8 mm (IVA, Meerbusch, Deutschland).

3.9. SDS-Gelelektrophorese

Mit den durch die HPLC fraktionierten Peaks wurde eine Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese nach der Laemmli-Prozedur (Laemmli, 1970) durchgeführt. Das Gel enthielt 12% Polyacrylamid mit einem Acrylamid/Bisacrylamid-Verhältnis von 36:1. Das Gel wurde mit Coomassie Brilliant Blue R-250 eingefärbt.

3.10. Statistik

Die statistische Analyse der Ergebnisse aller Versuchsglieder, außer der Standardabweichungen, wurden mittels SAS (SAS Institute Inc., Cary, USA, Release 8.02, 2001) durchgeführt. Die Vergleiche der Mittelwerte wurden mit der GLM-Prozedur, insbesondere dem Tukey's Studentized Range (HSD) Test durchgeführt. Bei zweifaktorieller Versuchsanlage (Versuche mit NIL-Erbesen) wurde zur Wahrung der versuchsbezogenen Irrtumswahrscheinlichkeit bei multiplen t-Tests unter Berücksichtigung der Anzahl sinnvoller Mittelwertvergleiche die Bonferoni-Prozedur angewendet (α von $p < 0.05$).

4. Ergebnisse

4.1. Ernte und Ertrag

4.1.1. Sojabohnenertrag

Am Ende der Kornfüllungsphase wurden die Hülsen so lange an der Pflanze belassen, bis die Samen einen Wassergehalt ca. 10-12% besaßen. Danach wurden sie geerntet und Hülsen sowie Samen gezählt.

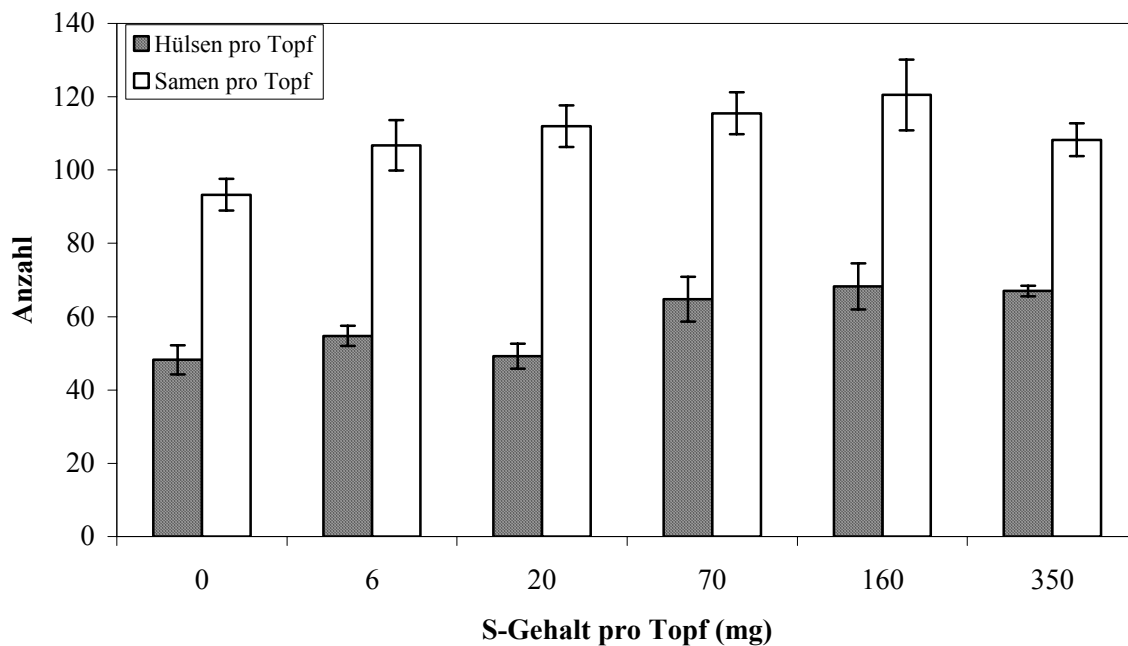


Abbildung 10: Durchschnittliche Anzahl der Samen pro Topf bei S-Steigerung und Hülsen pro Topf bei S-Steigerung (Schwefelstufen 0, 6, 20, 70, 160 und 350 mg Schwefel pro Topf). Die Mittelwerte von jeweils vier Wiederholungen (\pm SD) weisen keine signifikanten Unterschiede bei $p < 0.05$ gemäß Tukey's Studentized Range (HSD) Test auf.

Man kann in Abbildung 10 einen leichten aber nicht signifikanten Anstieg in der Anzahl der Hülsen und der Samen pro Topf von den Varianten mit 20 mg bis 160 mg Schwefel pro Topf erkennen. Die Schwefelstufe mit 160 mg weist die höchste Samen-Anzahl mit durchschnittlich 120,5 Samen auf. Die Pflanzen dieser Stufe bildeten auch die meisten Hülsen aus (mit durchschnittlich 68,25 Hülsen). Die Schwefelstufe mit 0 mg weist die niedrigste Anzahl der Samen mit durchschnittlich 93,25 Samen und 48,25 Hülsen auf. Eine Ertragssteigerung mit einer Schwefelernährung von mehr als 160 mg Schwefel pro Topf konnte nicht nachgewiesen werden.

Signifikante Unterschiede kann man nur zwischen der 0 mg Stufe und der 70 mg Stufe sowie der 70 mg Stufe und der 160 mg Stufe erkennen. Analog zur Anzahl wurde die Trockenmasse der Samen bestimmt (siehe Abbildung 11).

Die Trockenmasse der Samen nimmt, ebenfalls nicht signifikant, mit der Zunahme des Schwefelgehaltes pro Topf zu, erfährt sein Maximum mit der Schwefelstufe von 160 mg pro Topf. Auch danach lässt sich keine weitere Zunahme in der Trockenmasse erkennen. Es lässt sich sogar eine leichte Erniedrigung in der Trockenmasse bei der Schwefelstufe mit 350 mg pro Topf beobachten (nicht signifikant).

Gut zu erkennen war der Schwefelmangel bei den Sojapflanzen der unteren Schwefelstufen (0, 6, 20 mg Schwefel pro Topf), der auch mit bloßem Auge sehr gut zu erkennen war. Die im Kapitel 2.3. beschriebenen Mangelsymptome trafen bei den unteren drei Schwefelstufen zu. Der Schwefelmangel führte hier zu Chlorosen, die typischerweise an den jüngeren Blättern auftraten (siehe Abbildung 13 A und B). Des Weiteren war auch teilweise eine Krümmung des Blattrandes bei einigen Varianten zu erkennen. Anhand der SPAD-Werte (siehe Abbildung 12) lässt sich die Ausprägung dieser Chlorosen gegenüber den Varianten mit ausreichender Schwefelversorgung gut nachvollziehen. Die höchsten SPAD-Werte ließen sich bei der Variante mit 160 mg Schwefel pro Topf erkennen (SPAD-Wert von 48).

Pflanzen mit ausreichender Schwefelversorgung ließen einen üppigeren Wuchs erkennen (siehe Abbildung 13 A).

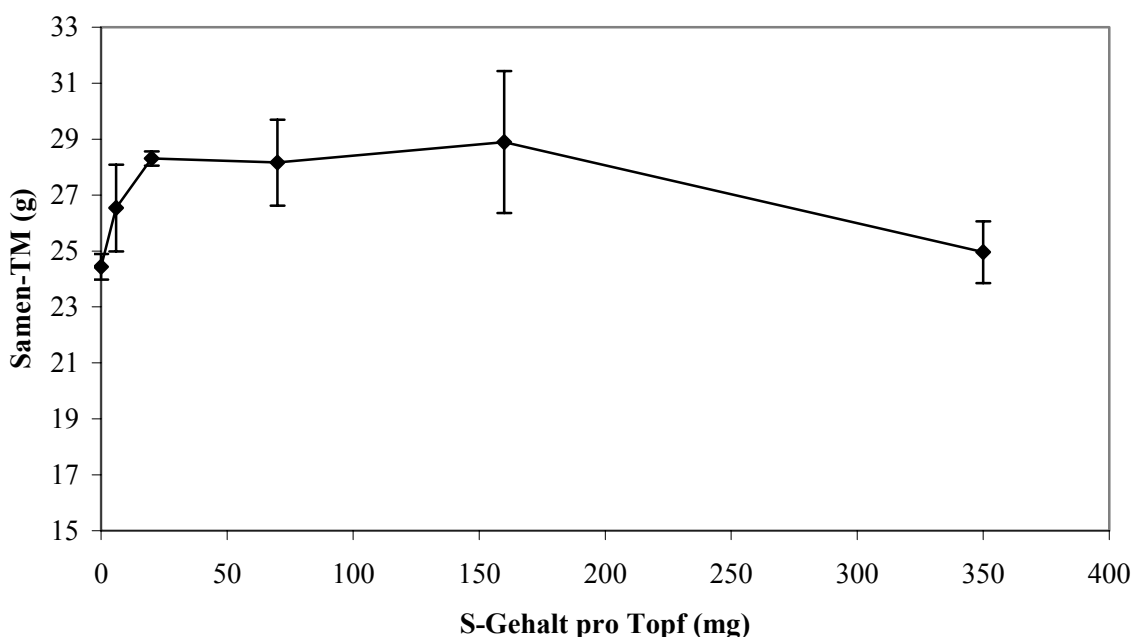


Abbildung 11: Durchschnittliche Trockenmasse (TM) der Samen pro Topf bei jeweiliger Schwefelstufe. Die Mittelwerte von jeweils vier Wiederholungen (\pm SD) weisen keine signifikanten Unterschiede bei $p < 0.05$ gemäß Tukey's Studentized Range (HSD) Test auf.

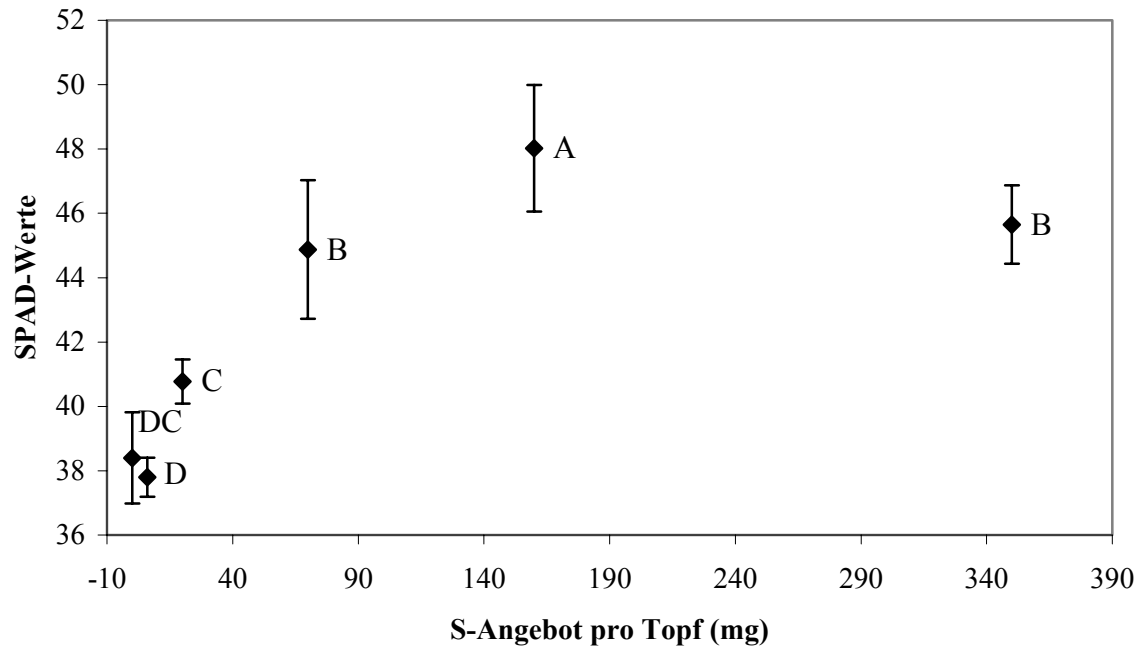


Abbildung 12: SPAD-Werte des jüngsten vollentwickelten Blattes in der Zeit der frühen Blüte. Die Mittelwerte von jeweils vier Wiederholungen (\pm SD) mit demselben Buchstaben weisen keine signifikanten Unterschiede bei $p < 0.05$ gemäß Tukey's Studentized Range (HSD) Test auf.

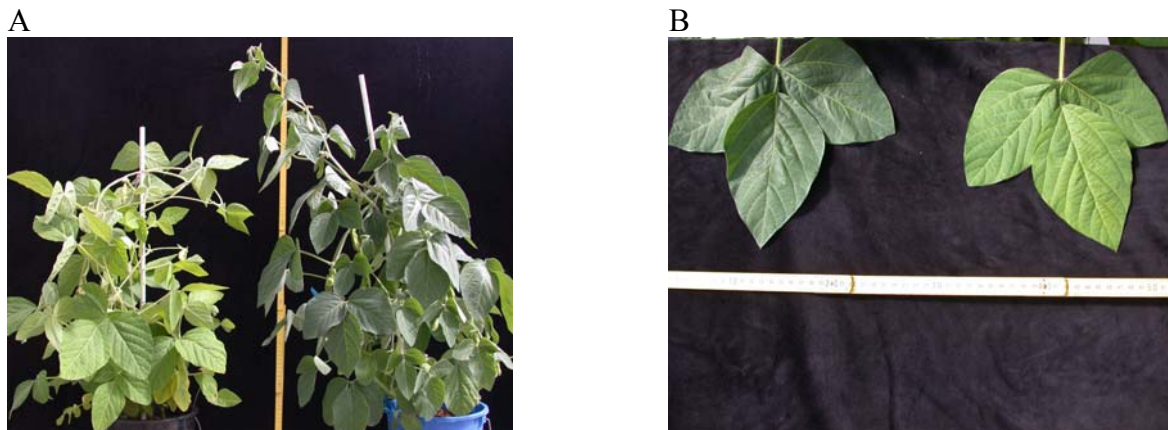


Abbildung 13: A) links eine Sojapflanze, die keinen Schwefel (0 mg Schwefel pro Topf) erhalten hat, rechts eine Sojapflanze mit ausreichender S-Versorgung (160 mg Schwefel pro Topf). B) links im Bild Sojablätter einer Pflanze mit ausreichender Schwefelversorgung (160 mg Schwefel pro Topf), rechts eine Schwefelmangelvariante (0 mg Schwefel pro Topf), mit Zollstock als Maßstab.

4.1.2. Kritische Nährstoffkonzentration

In den Abbildungen 14 und 15 wurde anhand einer definierten Kurve, die eine Beziehung zwischen Ertrag und Nährstoffkonzentration darstellt, eine Ableitung für eine kritische Nährstoffkonzentration erstellt. Die kritische Nährstoffkonzentration ist hier definiert als 95% des Maximums der Kurve, die aus dem Ertrag (der höchste Ertragswert wurde hier als 100% festgesetzt) und der prozentualen Schwefelkonzentration im Blatt bzw. Samen erstellt wurde. Es wurde eine kritische Nährstoffkonzentration in der gesamten Soja-Pflanze (whole shoot) von 0,15% 36 Tage nach der Aussaat und eine Konzentration von 0,185% 60 Tage nach der Aussaat (kritisch bei 95% des Maximums der Kurve) erhalten (siehe Abbildungen 14).

Die hier vorgenommene S-Diagnose dient ausschließlich retrospektiven Zwecken und kann für nachfolgende Gefäßversuche genutzt werden.

Anhand der Analysen des Schwefelgehaltes in den Blättern hat sich ein Mangel bei einem Gehalt von 0,12% 45 Tage nach der Aussaat ergeben. Dabei wurden nur Blätter ab der vierten Verzweigung vom Top ausgehend für die Analyse verwendet.

Danach wurde ein Schwefelgehalt im Samen von 0,15% als Mangel und ein Schwefelgehalt von 0,19% als ausreichende Schwefelversorgung festgelegt (siehe auch Abbildungen 15).

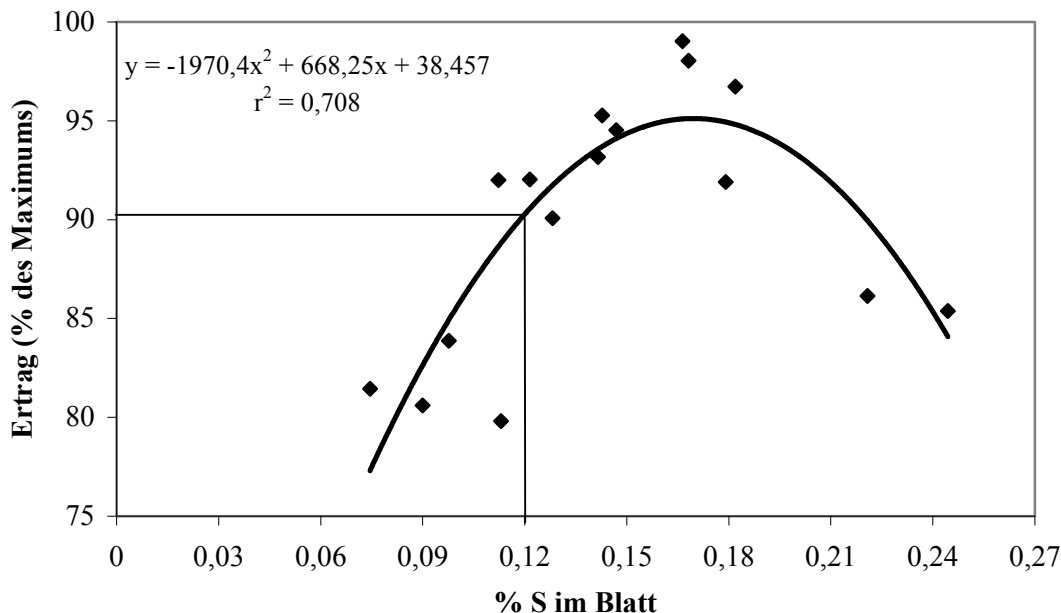


Abbildung 14: Kritische Nährstoffkonzentration im Sojablatt. Abgeleitet aus Samen-Ertrag und Schwefelkonzentration im Blatt.

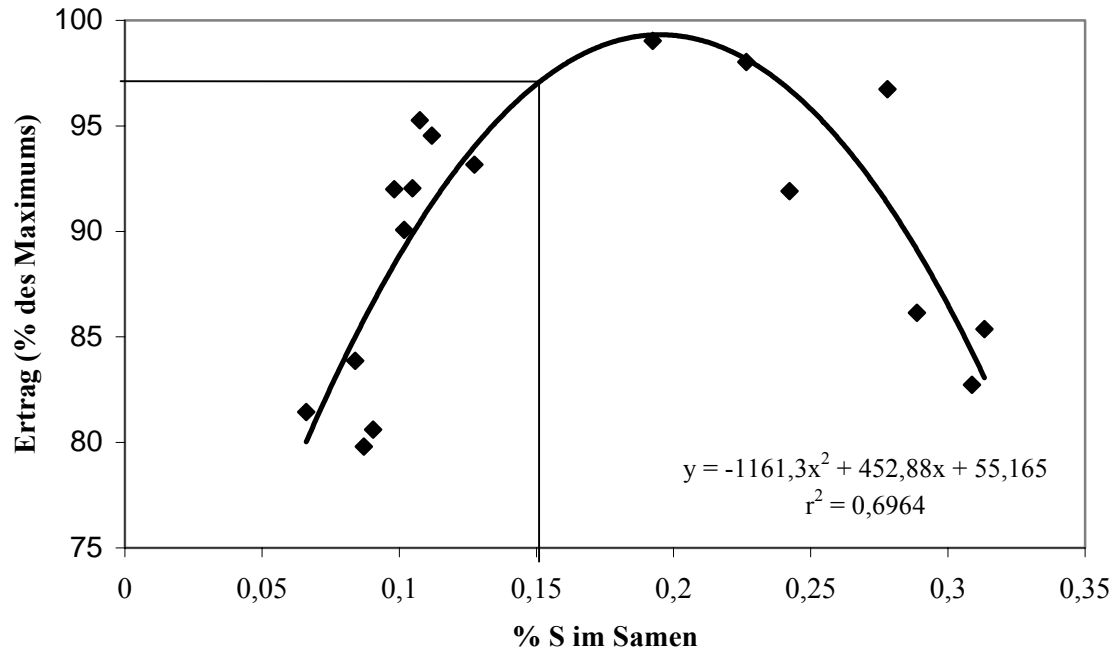


Abbildung 15: Kritische Nährstoffkonzentration im Sojasamen. Abgeleitet aus Samen-Ertrag und Schwefelkonzentration im Samen.

4.1.3. Erbsenertrag

Mit den Erbsen wurde genau wie unter 4.1.1. beschrieben verfahren und anschließend die Anzahl der Hülsen pro Topf und die Anzahl der Samen pro Topf bestimmt.

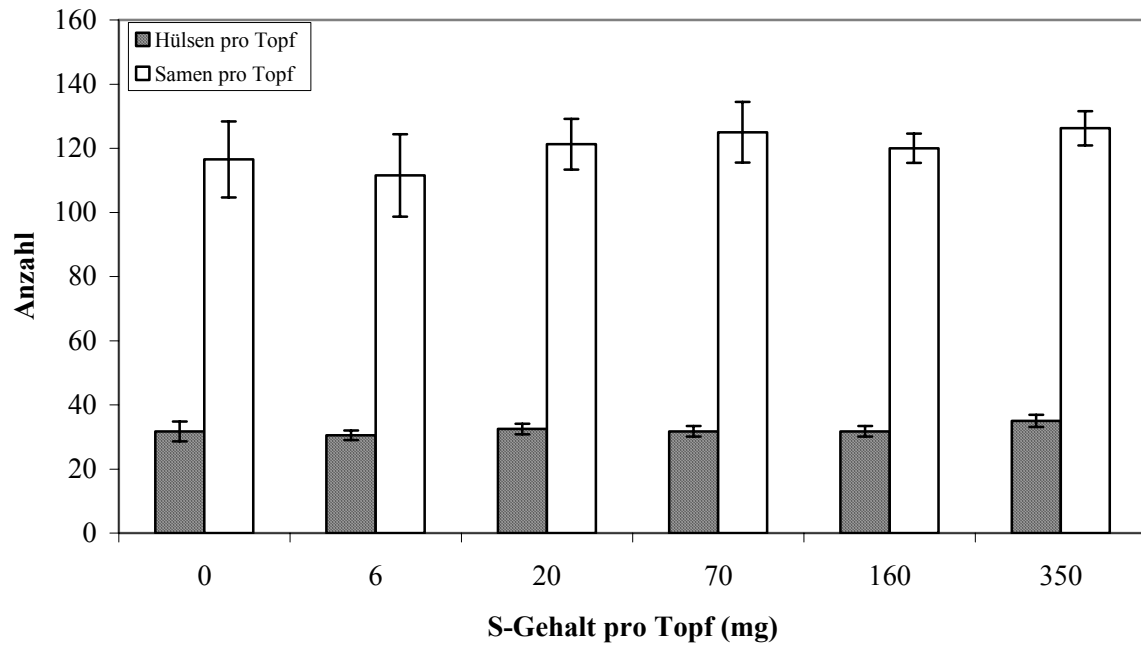


Abbildung 16: Durchschnittliche Anzahl der Erbsensamen pro Topf bei S-Steigerung und Hülsen pro Topf bei S-Steigerung (Schwefelstufen 0, 6, 20, 70, 160 und 350 mg Schwefel pro Topf). Die Mittelwerte von jeweils vier Wiederholungen (\pm SD) weisen keine signifikanten Unterschiede bei $p < 0.05$ gemäß Tukey's Studentized Range (HSD) Test auf.

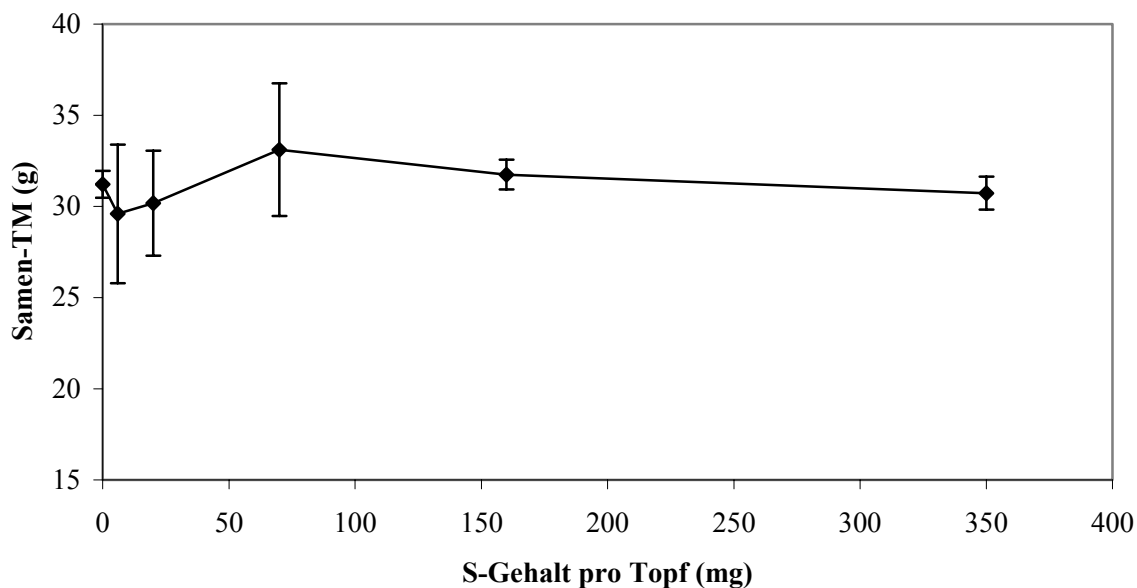


Abbildung 17: Durchschnittliches Gewicht der Erbsensamen pro Topf bei jeweiliger Schwefelstufe. Die Mittelwerte von jeweils vier Wiederholungen (\pm SD) weisen keine signifikanten Unterschiede bei $p < 0.05$ gemäß Tukey's Studentized Range (HSD) Test auf.

Das Ergebnis ist ähnlich ausgefallen wie bei Soja. Es ließen sich keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl der Hülsen und Samen pro Topf feststellen. Auch das durchschnittliche Gewicht der Erbsensamen war bei allen Schwefelstufen annähernd gleich. Die typischen Mangelsymptome wie bei den Sojapflanzen blieben aus.

4.2. Protein-HPLC

4.2.1. Trennsäulenvergleich

Die folgenden Analysen wurden mit Sojaprotein-Extrakten durchgeführt, die von Varianten mit ausreichender Schwefelversorgung stammten:

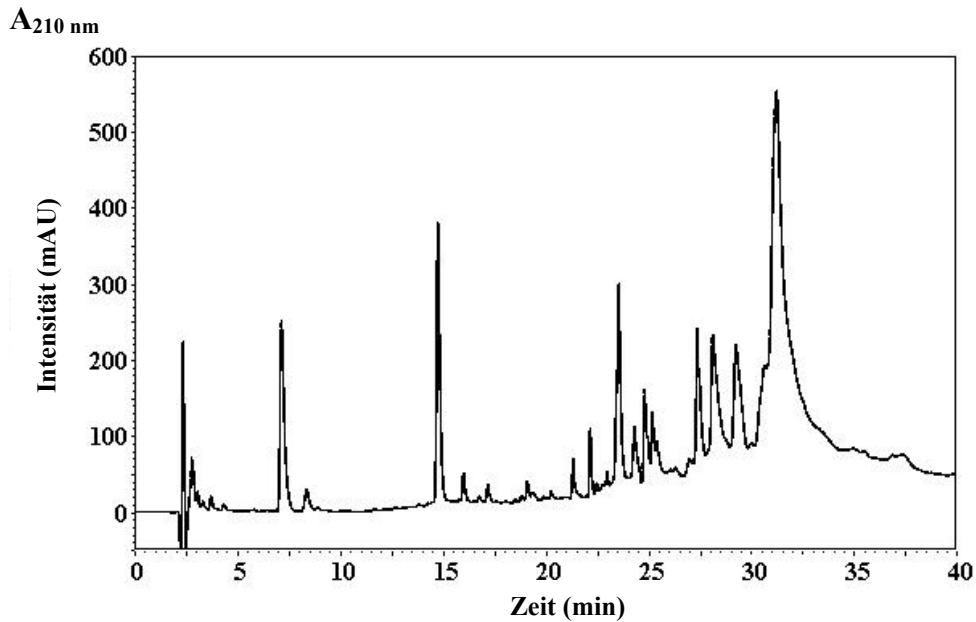


Abbildung 18: Sojaprotein-Chromatogramm der Grom Saphir C₁₈ (5 μm , 250 \times 4 mm, 300 \AA). Die Trenneigenschaften bei der Retentionszeit ab 26 Minuten (hoher organischer Anteil im Fließmittel) sind im Gegensatz zu den anderen Trennsäulen verbessert.

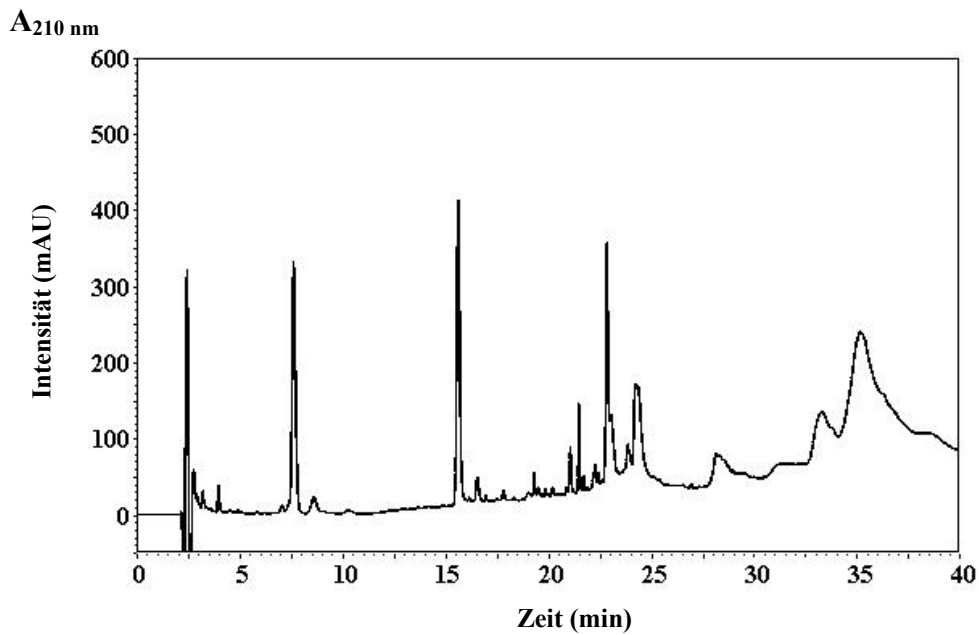


Abbildung 19: Sojaprotein-Chromatogramm der Nucleosil C₁₈ (5 µm, 250 × 4 mm, 300 Å). Man erkennt deutlich, dass die hydrophoberen Proteine, die ab 26 Minuten retardieren fast keine Trennung aufweisen.

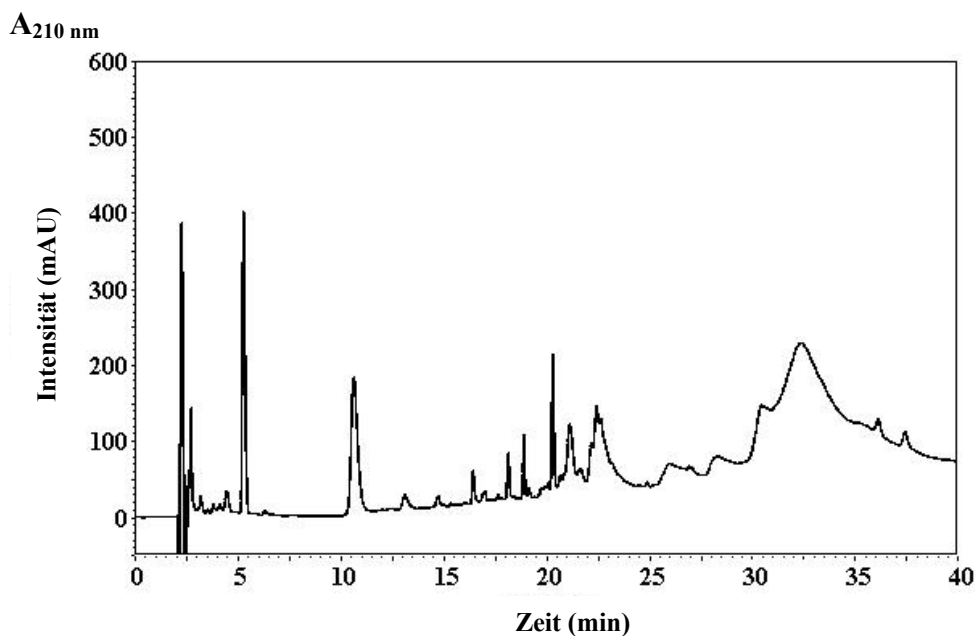


Abbildung 20: Sojaprotein-Chromatogramm der Vydac C₁₈ (10 µm, 250 × 4 mm, 300 Å). Aufgrund der Partikelgröße von 10 µm kann man hier eine Peakverbreiterung erkennen, die auf eine erhöhte Diffusion des Analyten in der mobilen Phase zurückzuführen ist.

Tabelle 6: Trennsäulenvergleich.

Trennsäule (Handelsname)	Durchschnittliche Anzahl der Peaks
Grom Saphir C ₁₈	59
Nucleosil C ₁₈	47
Vydac C ₁₈	55

Die durchschnittliche Anzahl der Peaks ist bei der Grom Saphir C₁₈ am höchsten (siehe Abbildung 18), unterscheidet sich aber nicht sehr stark von der Vydac C₁₈ (siehe Abbildung 20). Die Nucleosil C₁₈ (Abbildung 19) hat die geringste Anzahl an Peaks von den drei Trennsäulen. Man muss aber beachten, dass sich die Peak-Form der Nucleosil C₁₈ im Gegensatz zur Vydac C₁₈ durch eine erheblich geringere Peakverbreiterung (Annäherung an die Gauß-Form, siehe Fußnote ^{*)} und geringeres Tailing auszeichnet. Im Gegensatz zur Grom Saphir C₁₈ weist die Nucleosil C₁₈ aber ein stärkeres Tailing auf (siehe Abbildung 21).

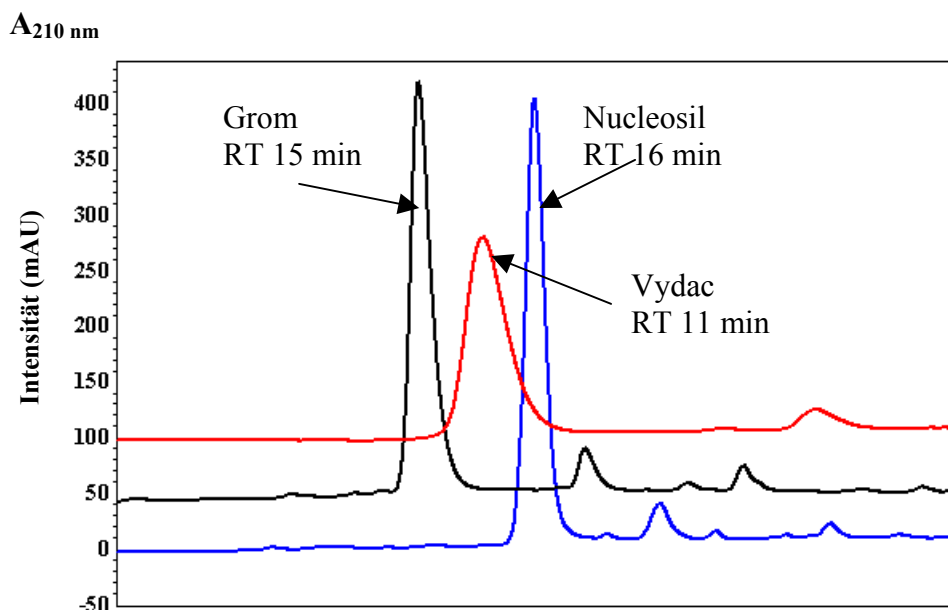


Abbildung 21: Vergleich der Peakform von Peaks identischer Proteinfraction (aber unterschiedlicher Retentionszeit). RT = Retentionszeit.

Für die folgenden Arbeiten wurde aufgrund der besseren Trenneigenschaften nur die Säule Grom Saphir C₁₈ verwendet.

^{*}(Hierzu sei zum besseren Verständnis gesagt: „Die Form dieser Peaks oder Kurven lässt sich in vielen Fällen als Gauß-Funktionen darstellen. Sie wird bestimmt durch Diffusionsvorgänge und statistische Unregelmäßigkeiten in der Gleichgewichtseinstellung zwischen Stoff und der stationären Phase. Der „Verbreiterungsprozess“ in Abhängigkeit von der Zeit kann durch Diffusion erklärt werden [...]. Wegen der endlichen Geschwindigkeit der Gleichgewichtseinstellung werden einerseits Moleküle, die aufgrund der Lage des thermodynamischen Gleichgewichts an einer

4.2.2. Globulin-HPLC

Die nach der Methode von Thanh und Shibasaki (1976) präzipitierten Soja-Globuline (Glycinin- und β -Conglycinin-Fractionen) wurden mittels RP-HPLC analysiert. Diese Methode wurde aufgrund der Trennung der Albumin-Fraktion von der Globulin-Fraktion durchgeführt, um ein Referenzchromatogramm für die Globulin-Fraktion zu erstellen. Dieses sollte dazu dienen, bei späteren präparativen Arbeiten eine Unterscheidung der Albumin- von der Globulin-Fraktion mittels RP-HPLC zu ermöglichen.

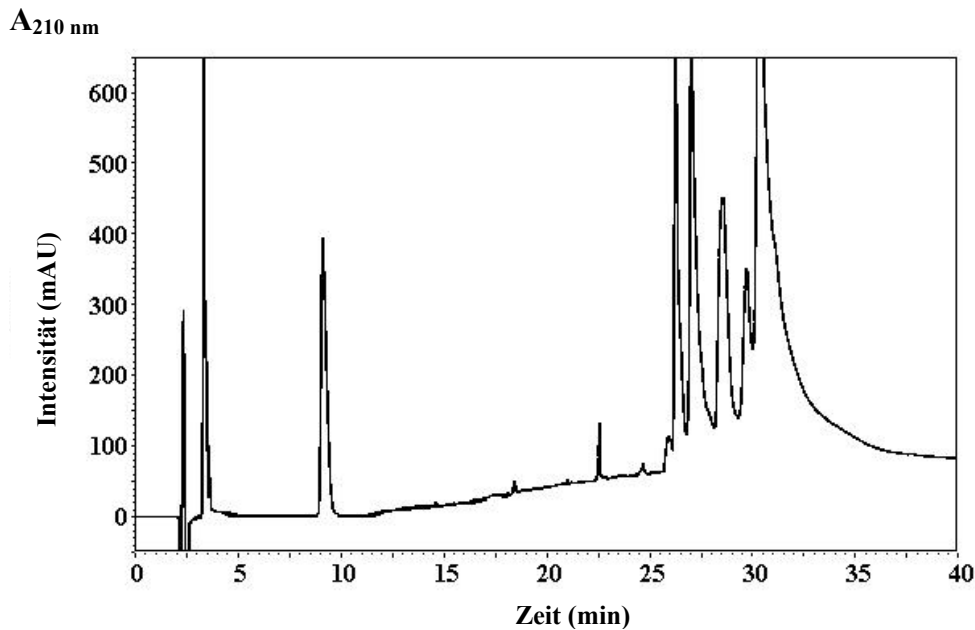


Abbildung 22: Chromatogramm der Soja-Globuline. Bei dem nach etwa 8 Minuten detektierten Peak handelt es sich um ein β -Conglycinin-Fragment, während ab 26 Minuten hauptsächlich Glycinin-Komponenten eluieren.

Da ein Ziel dieser Arbeit darin bestand, die RP-HPLC zur Fraktionierung der Albumine und Globuline aus Sojabohnen-Speicherproteinen zu verwenden, musste geklärt werden, wann die jeweiligen Fraktionen von der Säule eluieren. Anhand des Chromatogramms (siehe Abbildung 22) war eine Zuordnung der Peaks zu den jeweiligen Fraktionen gewährleistet. Daraus resultierte folgende Einteilung im Rohprotein-Extrakt (siehe Abbildung 23):

bestimmten Stelle in die stationäre Phase übergehen sollen, von der mobilen Phase weitergeführt. Moleküle, deren Übertritt aus der stationären Phase in die mobile Phase verzögert ist, bleiben andererseits zurück. So tritt eine Substanzzone am Ende einer Trennstrecke in Form einer verbreiterten Bande auf. Bei wenigen Trennstufen erhält man diese Bande in Form einer Poisson-Verteilung, die Kurve geht jedoch mit zunehmender Trennstufenzahl in die Normal-Verteilung, die Gauß-Kurve über [...]“ (Schwedt, 1994). Zu beachten ist allerdings, dass ein direkter Vergleich der Peaks bei der Gradientenelution nicht möglich ist, wenn die Peaks, wie in diesem Fall, unterschiedliche Retentionszeiten haben. Deswegen wurde nur die Peak-Anzahl bestimmt (siehe Tabelle 6.)

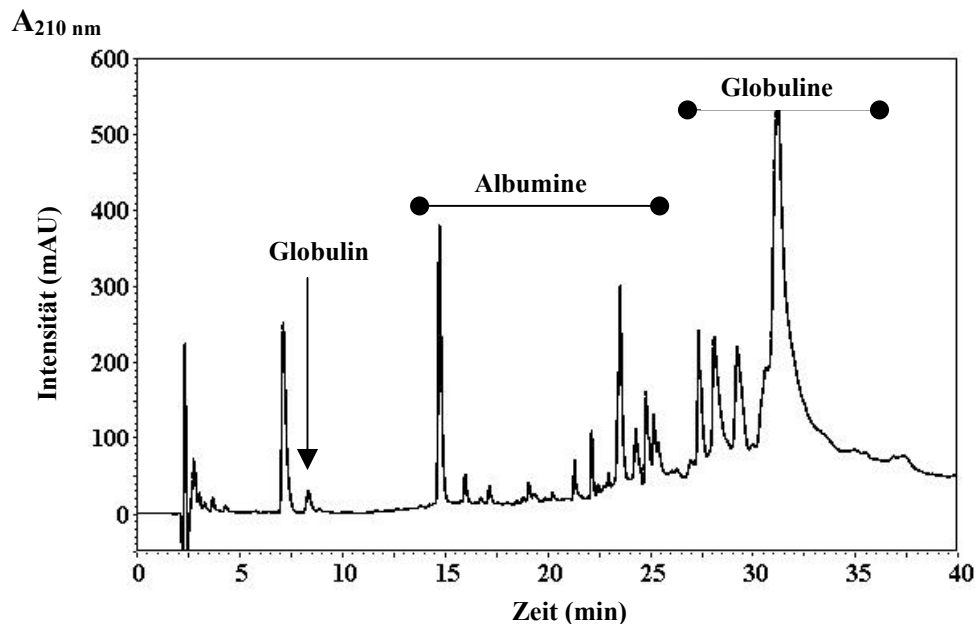


Abbildung 23: Chromatogramm eines Gesamtprotein-Extrakts aus Sojabohnen. Die Peaks zwischen 15 Minuten und 26 Minuten können der Albumin-Fraktion zugeordnet werden.

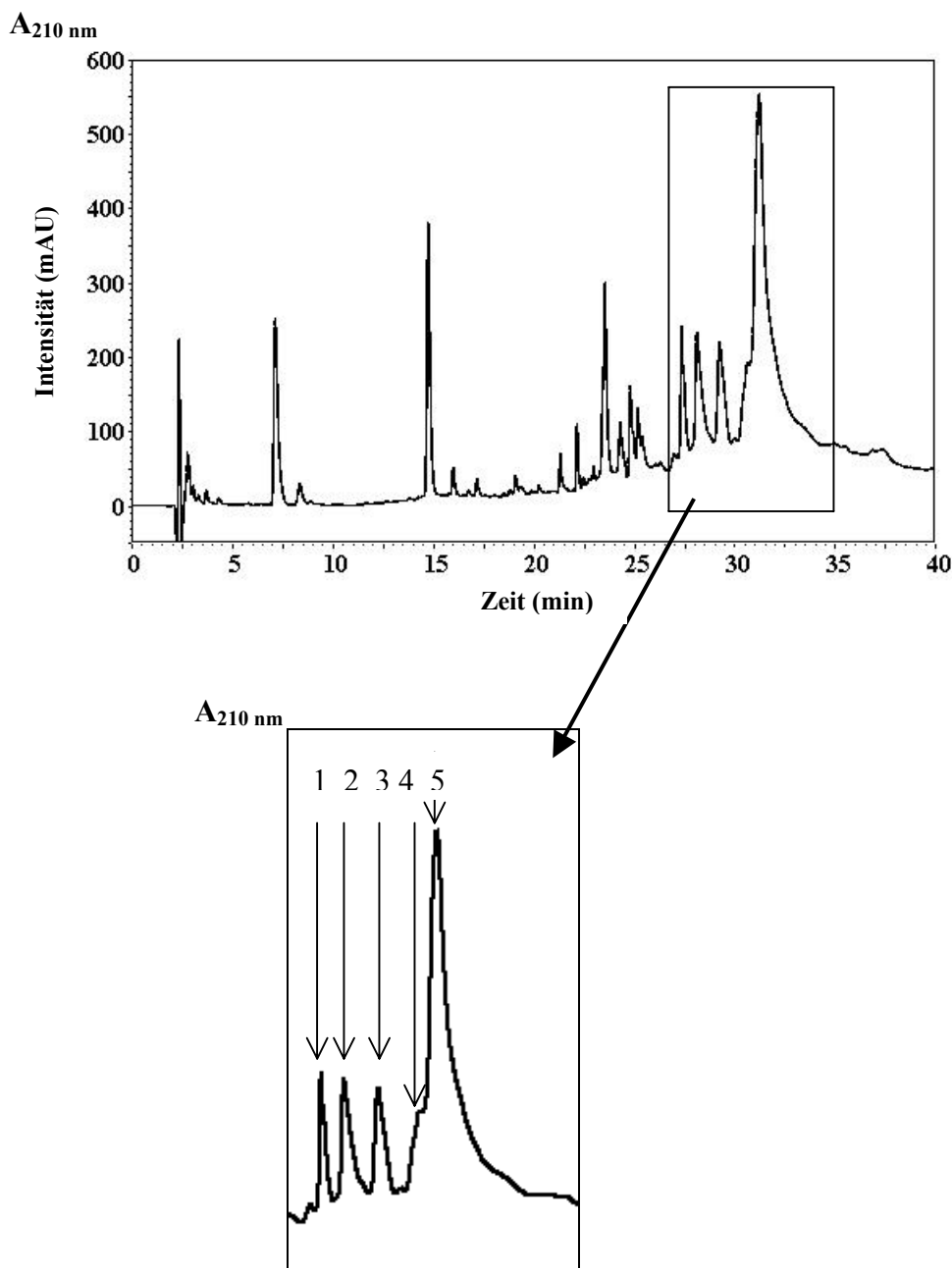


Abbildung 24: Oben: Gleiches Chromatogramm wie in Abbildung 20. Der eingerahmte Bereich markiert die Peaks, die einzeln fraktioniert wurden. Unten: Ausschnitt aus dem Chromatogramm (Retentionszeit: 26-35 Minuten). Zu erkennen sind Globulin-Peaks bestehend aus Glycinin- und β -Conglycinin-Einheiten.

Aufgrund der Unkenntnis über die genaue Zusammensetzung der Peaks, musste ermittelt werden, ob jeweils mehrere Komponenten als ein Peak eluieren oder ob ein Peak nur einem Protein bzw. einer Proteinuntereinheit zuzuordnen ist. D.h., hier stellte sich die Frage, ob beispielsweise ein Peak nur aus der β -Untereinheit des β -Conglycinins besteht. Denn dann wäre man durchaus in der Lage mittels RP-HPLC die Konzentration dieser Untereinheit bei variabler S-Versorgung zu messen. Dazu wurden die mit den Pfeilen markierten Peaks 1-5 (Abbildung 24) fraktioniert gesammelt, die mobile Phase entfernt und mittels SDS-Gelelektrophorese (Laemmli, 1970) wurde die Zusammensetzung der Fraktionen bestimmt.

Daraus resultierte folgendes Elektropherogramm:

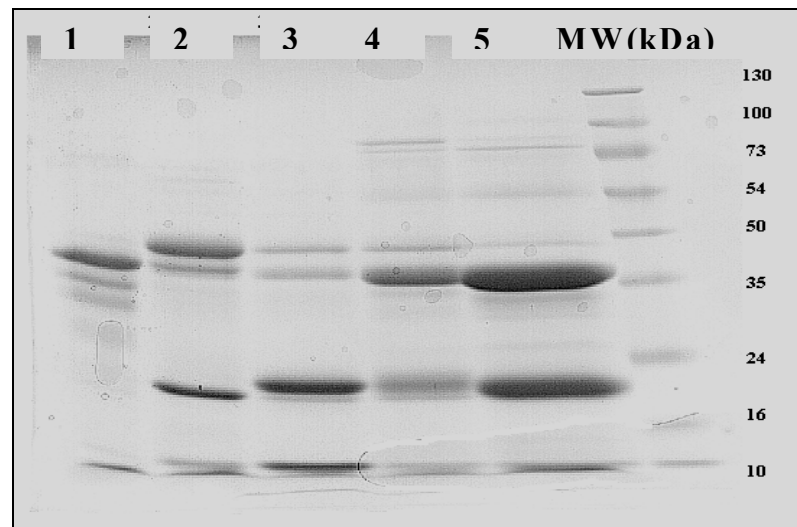


Abbildung 25: Elektropherogramm der RP-HPLC-Fractionen. Man kann in allen Fraktionen Proteinbanden gleichen Molekulargewichts erkennen. Die Zahlen am rechten Rand bezeichnen die Molekulargewichte in kilo-Dalton (kDa).

In der Abbildung 25 sind die Banden der Globulin-Fractionen in unterschiedlicher Intensität zu erkennen. Es wurden keine Quantifizierungen mittels Densitometer durchgeführt. Hinsichtlich des qualitativen Gehalts in den Fraktionen können aber Aussagen getroffen werden. Es ist deutlich zu sehen, dass alle Fraktionen Banden von gleichen Molekulargewichten enthalten. Diese unterscheiden sich aber im Gehalt. Die größten Banden sind in Fraktion 5 zu erkennen, die auch im Chromatogramm (Abbildung 23) den größten Peak aufweist.

4.3. Bestimmung der schwefelhaltigen Aminosäuren in Sojabohnen

4.3.1. Bestimmung in der Albumin- bzw. Globulin-Fraktion

Aus Sojabohnensamen der Schwefelstufen mit 0 mg Schwefel, 70 mg Schwefel und 350 mg Schwefel pro Topf wurden die Albumine bzw. Globuline mittels RP-HPLC fraktioniert. Diese Protein-Fractionen wurden anschließend einer sauren Hydrolyse unterzogen und auf die darin enthaltenen schwefelhaltigen Aminosäuren Methionin und Cystein analysiert.

Tabelle 7: Methionin- und Cystein-Verhältnisse (Cys/Met) der Albumin- bzw. Globulin-Fraktion von Sojabohnen aus drei Schwefelstufen. Alb= Albumin; Glob= Globulin. Schwefelgehalt pro Topf: 0, 70, 350 mg.

Fraktionen	Verhältnis Cys/Meth
Alb 0	1,08
Glob 0	0,37
Alb 70	0,81
Glob 70	0,32
Alb 350	1,85
Glob 350	0,43

Anhand der Abbildung 26 kann man erkennen, dass der Cystein-Gehalt im Albumin der Schwefelmangelvarianten gegenüber dem Methionin-Gehalt nur leicht überwiegt. Im Globulin (Abbildung 27) der S-Mangelvariante überwiegt das Methionin deutlich gegenüber dem Cystein. Der Gehalt an Methionin liegt hier bei ca. 10,98 $\mu\text{mol g}^{-1}$ TM, der des Cysteins bei nur ca. 4,04 $\mu\text{mol g}^{-1}$ TM.

Dieses Verhältnis ist bei der Globulin-Fraktion der mittleren Schwefelstufe (70 mg Schwefel) auch zu erkennen. Das Verhältnis in der Albumin-Fraktion der mittleren Schwefelstufe hat sich gegenüber den Albuminen der Schwefelmangelvariante umgekehrt. Auch der Gesamtgehalt der schwefelhaltigen Aminosäuren nimmt bei der mittleren Schwefelstufe zu.

Im Albumin ist mehr Cystein enthalten (11,50 $\mu\text{mol g}^{-1}$ TM) als im Globulin (5,02 $\mu\text{mol g}^{-1}$ TM), dafür enthält es in der Albumin-Fraktion etwas weniger Methionin (14,26 $\mu\text{mol g}^{-1}$ TM) als in der Globulin-Fraktion (15,71 $\mu\text{mol g}^{-1}$ TM). Insgesamt ist in dieser Schwefelstufe der Cystein-Gehalt um den Faktor 2-3 kleiner als der Methionin-Gehalt.

Bei der höchsten Schwefelstufe kehrt sich das Verhältnis Cystein zu Methionin in der Albumin-Fraktion wieder um, wobei hier der höchste Cystein-Gehalt zu erkennen ist (16,35 $\mu\text{mol g}^{-1}$ TM).

In der Abbildung 26 kann man sehr gut erkennen, dass sich der Gehalt an Methionin und Cystein in der Globulin-Fraktion trotz Schwefelsteigerung nicht signifikant ändert.

Obwohl man hier zwischen der mittleren und der höchsten Variante eine Schwefelsteigerung von 280 mg Schwefel je Topf verzeichnet, kann man nur eine leichte Zunahme im Gehalt des Cysteins erkennen, nicht aber vom Methionin. Dieses nimmt im Gehalt sogar etwas ab (15,71 μmol auf 13,64 $\mu\text{mol g}^{-1}$ TM).

Offensichtlich reagiert die Pflanze nicht mehr auf ein höheres Schwefelangebot, zumindest nicht, um den Schwefel in Form einer der beiden Aminosäure in den Globulinen einzubauen.

Dahingegen ist die Pflanze in der Lage den Cystein-Gehalt in den Albuminen noch zu erhöhen. Dieses geschieht aber auch auf Kosten des Methionins in den Albuminen.

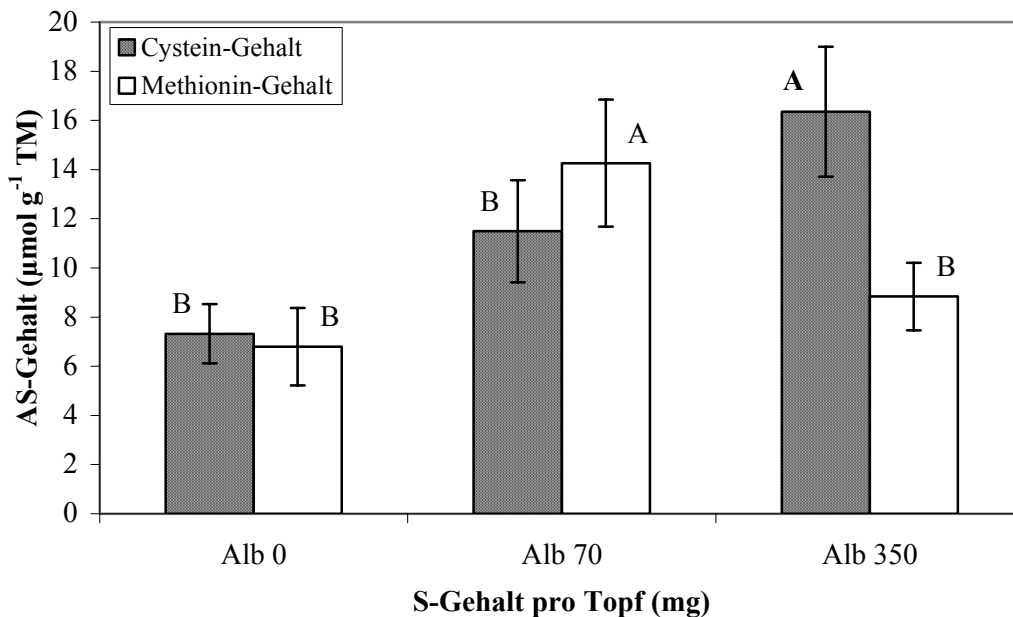


Abbildung 26: Methionin- und Cystein-Gehalt der Albumin-Fraktion von Sojabohnen aus drei Schwefelstufen. Der Aminosäure-Gehalt (AS-Gehalt) ist in $\mu\text{mol g}^{-1}$ Trockenmasse (TM) angegeben. Die Mittelwerte von jeweils vier Wiederholungen (\pm SD) mit demselben Buchstaben in einer Reihe weisen keine signifikanten Unterschiede bei $p < 0.05$ gemäß Tukey's Studentized Range (HSD) Test auf.

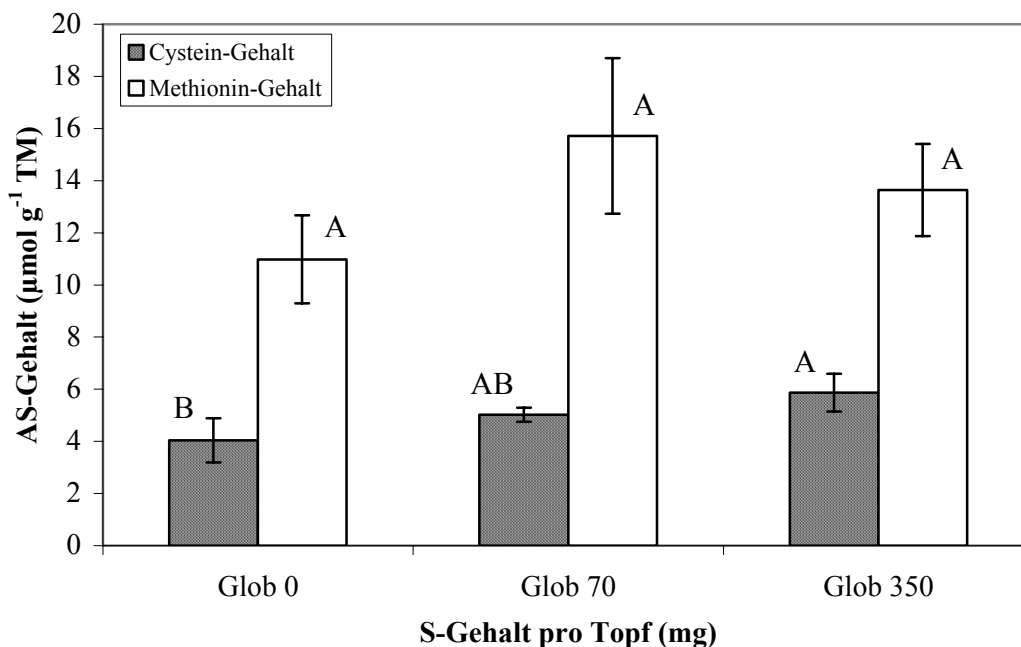


Abbildung 27: Methionin- und Cystein-Gehalt der Globulin-Fraktion von Sojabohnen aus drei Schwefelstufen. Der Aminosäure-Gehalt (AS-Gehalt) ist in $\mu\text{mol g}^{-1}$ Trockenmasse (TM) angegeben. Die Mittelwerte von jeweils vier Wiederholungen (\pm SD) mit demselben Buchstaben in einer Reihe weisen keine signifikanten Unterschiede bei $p < 0.05$ gemäß Tukey's Studentized Range (HSD) Test auf.

4.3.2. Bestimmung im ganzen Samen

Es wurden auch die Gehalte der schwefelhaltigen Aminosäuren im ganzen Samen (inklusive Samenschale) untersucht. Hierzu wurden die Samen aller sechs Schwefelstufen verwendet.

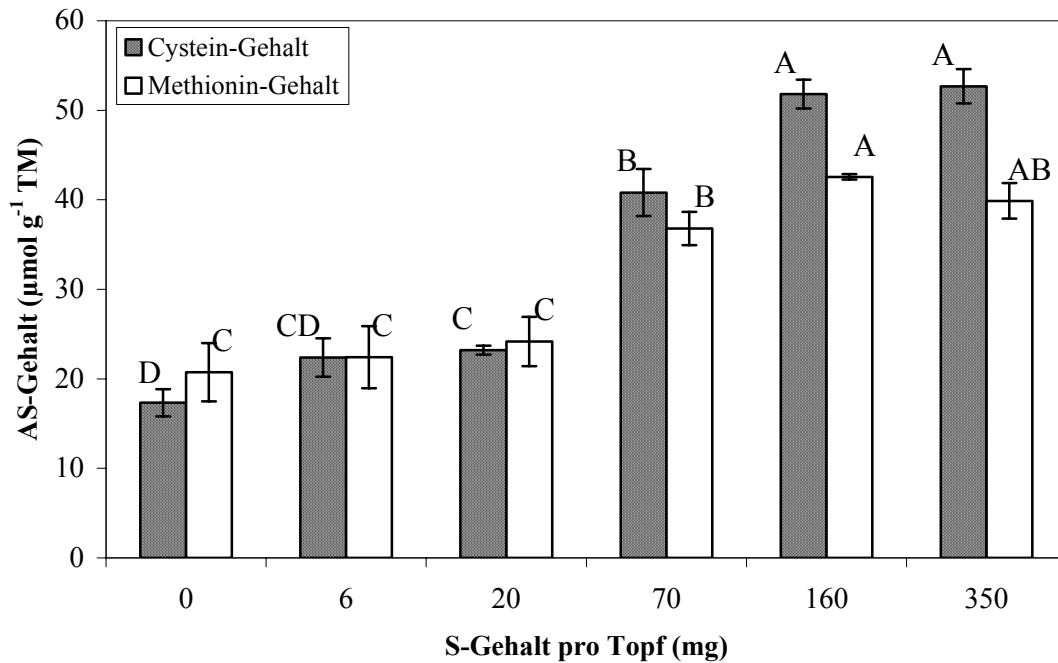


Abbildung 28: Methionin- und Cystein-Gehalt (AS-Gehalt) in $\mu\text{mol g}^{-1}$ TM der ganzen Sojasamen aus allen Schwefelstufen (0, 6, 20, 70, 160 und 350 mg Schwefel pro Topf). Die Mittelwerte von jeweils vier Wiederholungen (\pm SD) mit demselben Buchstaben in einer Reihe weisen keine signifikanten Unterschiede bei $p < 0.05$ gemäß Tukey's Studentized Range (HSD) Test auf.

Hier ist ein Anstieg von den Schwefelmangelvarianten (0-20 mg S pro Topf) bis zu den mit ausreichend Schwefel versorgten Varianten (70-350 mg S pro Topf) zu erkennen (Abbildung 28), wobei die Gehalte an Methionin in den Schwefelmangelvarianten gegenüber den Gehalten an Cystein annähernd gleich sind. Dieses ändert sich bei den mit ausreichend Schwefel versorgten Varianten. Dort überwiegt der Cystein-Gehalt. Auffällig ist auch, dass sich der Gehalt an Cystein ab 160 mg Schwefel pro Topf nur minimal erhöht (von $51,82 \mu\text{mol g}^{-1}$ auf $52,68 \mu\text{mol g}^{-1}$ TM), während der Gehalt an Methionin minimal abnimmt (von $42,57 \mu\text{mol g}^{-1}$ auf $39,88 \mu\text{mol g}^{-1}$ TM).

4.4. Bestimmung der Trypsin-Inhibitoren in Sojabohnen

4.4.1. TIA in Sojabohnen

Die TIA wurde in Sojabohnensamen der sechs Schwefelstufen (0, 6, 20, 70, 160 und 350 mg Schwefel pro Topf) gemessen.

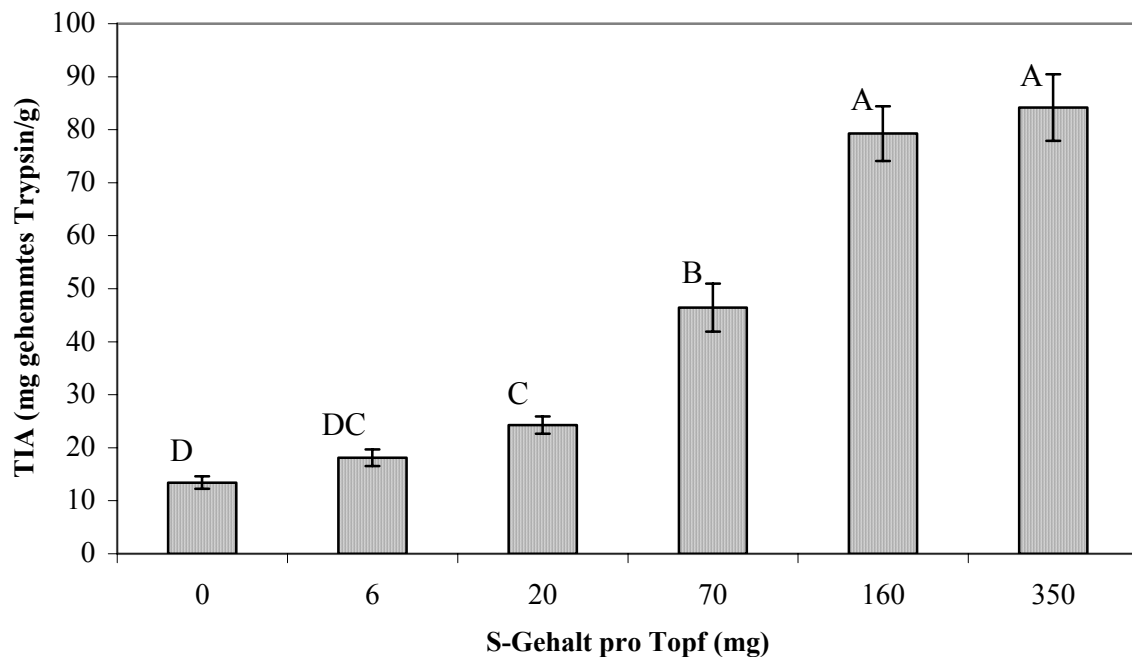


Abbildung 29: Trypsin-Inhibitor-Aktivität (TIA) von Sojabohnen in mg gehemmtem Trypsins pro g Probe aller Schwefelstufen (0, 6, 20, 70, 160 und 350 mg Schwefel pro Topf). Die Mittelwerte von jeweils vier Wiederholungen (\pm SD) mit demselben Buchstaben weisen keine signifikanten Unterschiede bei $p < 0.05$ gemäß Tukey's Studentized Range (HSD) Test auf.

In Abbildung 29 kann man sehr gut einen Anstieg in der Trypsin-Inhibitor-Aktivität erkennen, die mit der Zunahme der Schwefelernährung korreliert. Bei den Schwefelmangelvarianten kann man eine leichte Zunahme in der TIA erkennen, während die mit ausreichend Schwefel versorgten Varianten einen sprunghaften Anstieg in der Aktivität erkennen lassen, die bei den mit 350 mg Schwefel pro Topf versorgten Varianten gegenüber den mit 160 mg versorgten Varianten nicht weiter zunimmt. Hier scheint die Pflanze an eine Grenze der Sättigung gelangt zu sein, da eine Erhöhung um 190 mg Schwefel nur einen Anstieg der Aktivität um 4,89 hervorgerufen hat.

4.4.2. BBI-Konzentration in Sojabohnen

Es wurden auch Versuche unternommen, die Trypsin-Inhibitoren (TI) der Bowman-Birk Familie (BBI) im Sojabohnensamen mittels RP-HPLC zu quantifizieren. Hierfür war es möglich, Standardmaterial im Handel zu beziehen (Firma Sigma, [37330-34-0]). Eine Identifizierung des Inhibitors erfolgte mittels Mischchromatogramm. Die Quantifizierung erfolgte durch eine Standardreihe und führte zu folgenden Gehalten:

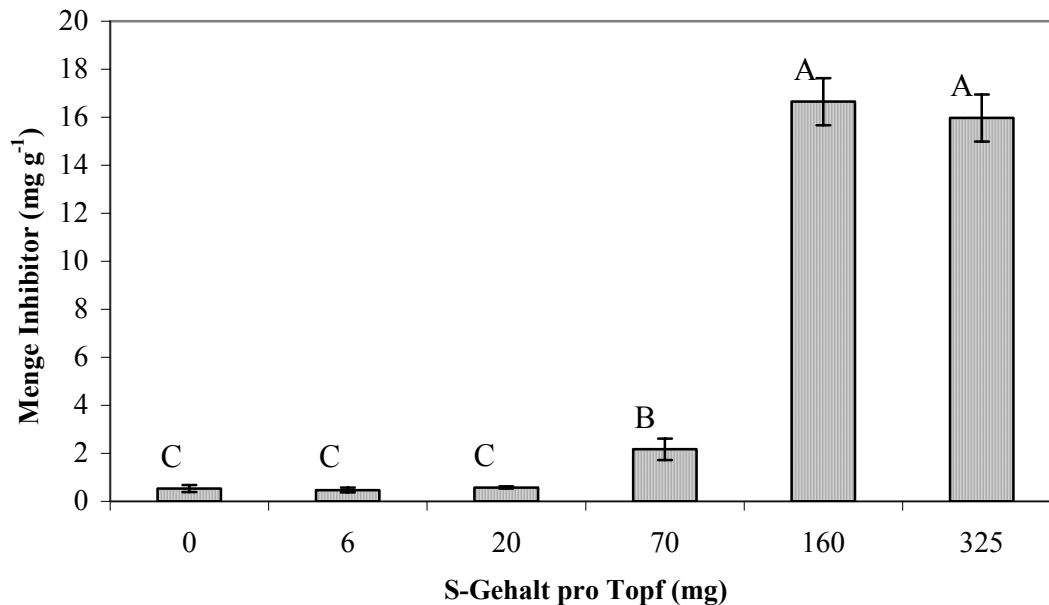


Abbildung 30: Menge des Trypsin-Inhibitors in mg pro g TM im Sojabohnensamen der jeweiligen Schwefelstufen. Die Mittelwerte von jeweils vier Wiederholungen (\pm SD) mit demselben Buchstaben weisen keine signifikanten Unterschiede bei $p < 0.05$ gemäß Tukey's Studentized Range (HSD) Test auf.

In Abbildung 30 kann man einen sprunghaften Anstieg des Gehalts an Bowman-Birk Inhibitor von den Varianten mit 70 mg Schwefel pro Topf (keine Mangelvarianten), die ca. $2,2 \text{ mg g}^{-1}$ des Inhibitors beinhaltet, zu den Varianten mit 160 mg Schwefel pro Topf erkennen, die ca. $16,6 \text{ mg g}^{-1}$ des Inhibitors beinhalten.

Die Abbildung 30 zeigt den Zusammenhang zwischen der Menge des Trypsin-Inhibitors und der Aktivität anhand einer logarithmischen Regression. Wie erwartet stieg die Aktivität des Inhibitors mit der Menge desselben. Zwischen 1 bis 2 mg g^{-1} wurde allerdings nur eine äußerst geringe Zunahme der Aktivität gemessen, die ab 2 mg g^{-1} dann schon fast exponentiell anstieg. Ab 160 mg Schwefel pro Topf ließ sich die Menge des Inhibitors nicht weiter steigern (Abbildung 30). Eine signifikante Steigerung der Aktivität zwischen den letzten beiden S-Stufen war auch nicht mehr zuerkennen (Abbildung 29), was sich auch anhand der gemessenen Menge des Inhibitors nachvollziehen lässt.

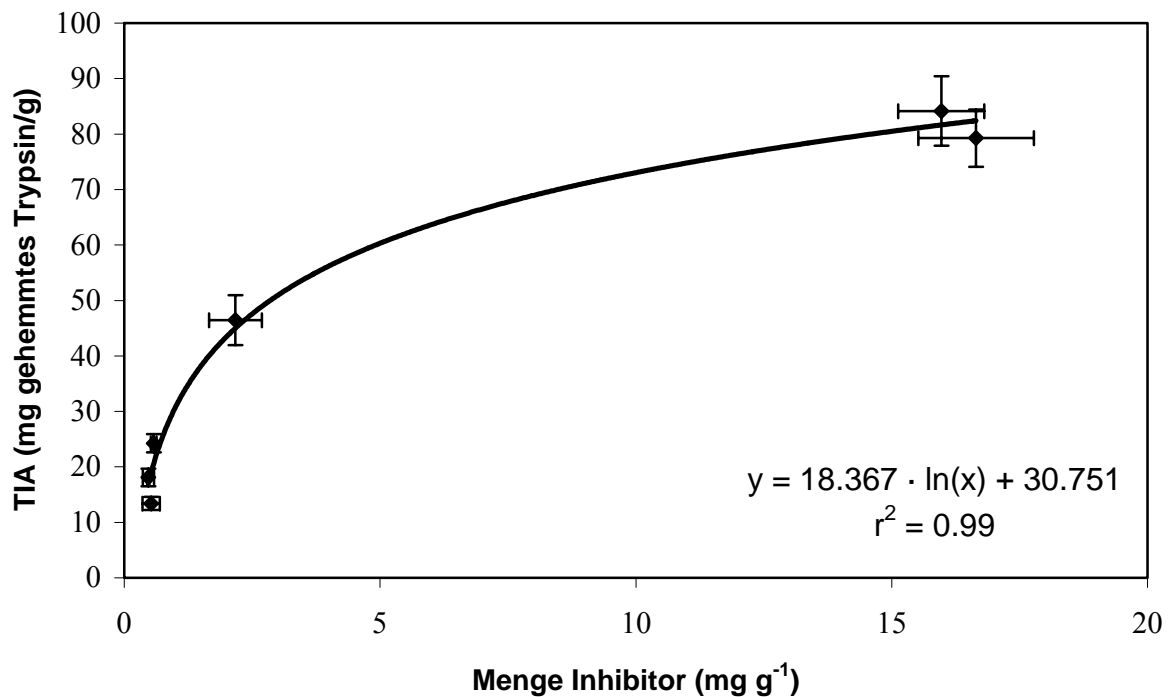


Abbildung 31: Menge des Inhibitors in mg g⁻¹ und TIA (mg gehemmtes Trypsin pro g Probe). Mittelwerte von jeweils vier Wiederholungen (\pm SD). Logarithmische Regression.

In Abbildung 31 wurde eine Korrelation zwischen der Aktivität und der Konzentration des Trypsin-Inhibitors dargestellt ($r^2 = 0,99$).

4.5. Bestimmung der Trypsin-Inhibitoren in Erbse

4.5.1. TIA in Erbse nach Schwefelsteigerung

Die Trypsin-Inhibitor-Aktivität wurde auch in Erbsen der sechs Schwefelstufen (0, 6, 20, 70, 160 und 350 mg Schwefel pro Topf) gemessen.

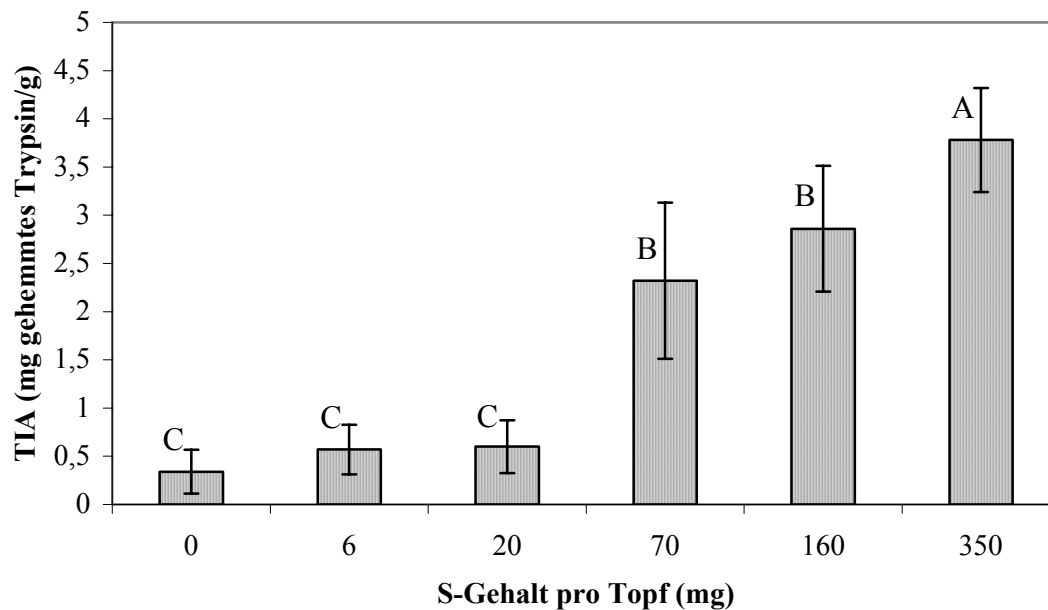


Abbildung 32: Trypsin-Inhibitor-Aktivität (TIA) von Erbsen in mg gehemmtes Trypsin pro g Probe aller Schwefelstufen (0, 6, 20, 70, 160 und 350 mg Schwefel pro Topf). Die Mittelwerte von jeweils vier Wiederholungen (\pm SD) mit demselben Buchstaben weisen keine signifikanten Unterschiede bei $p < 0.05$ gemäß Tukey's Studentized Range (HSD) Test auf.

Ein ähnliches Ergebnis wie bei Soja lieferten die Aktivitätsmessungen bei Erbsen (Abbildung 32). Auch hier ist ein sprunghafter Anstieg bei der 70 mg Stufe zu verzeichnen. Zu beachten ist allerdings, dass die Aktivitäten bei Erbsen im Bereich zwischen 0,3 und 3,8 liegen.

4.5.2. Bestimmung der TIA in Nahen Isogenen Linien (NIL)

Es wurden auch Versuche mit Erbsen naher isogener Linien (NIL) unternommen, wobei der Anbau in Schwefelmangel-Substrat (0 mg Schwefel pro Topf) und auch in schwefelreichem Substrat (160 mg Schwefel pro Topf) erfolgte.

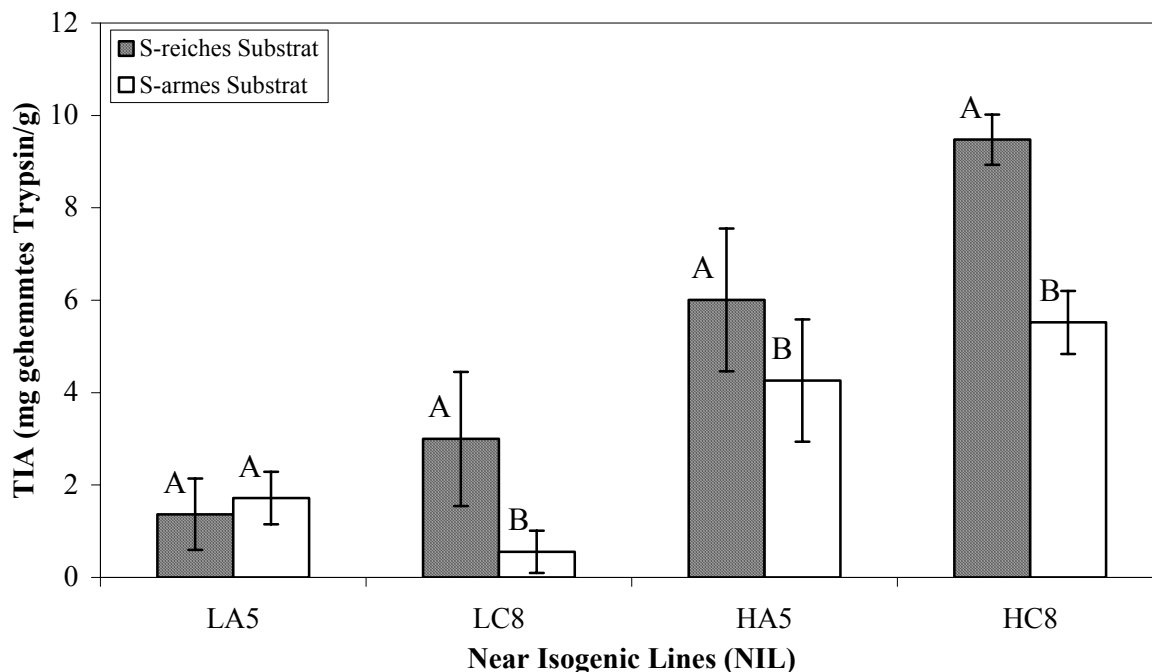


Abbildung 33: TIA-Bestimmung in Nahen Isogenen Erbsenlinien (NIL) mit den Bezeichnungen LA5, LC8, HA5 und HC8. Die linke Säule beschreibt jeweils die TIA bei Erbsen, die in schwefelreichem Substrat angebaut wurden, die rechte Säule jeweils die TIA bei Erbsen, die in schwefelarmem Substrat angebaut wurden. Die Mittelwerte von jeweils vier Wiederholungen (\pm SD) mit demselben Buchstaben weisen keine signifikanten Unterschiede bei $p < 0.05$ gemäß Bonferoni-Prozedur auf.

Die Aktivität des Trypsin-Inhibitors in den NIL-Erbsen (Abbildung 33), die auf schwefelreichem Substrat angebaut wurden, ist für die Linien LC8, HA5 und HC8 stets höher als die Aktivität in den entsprechenden Linien, die auf schwefelarmem Substrat angebaut wurden. Einzig bei der Linie LA5 wurde ein umgekehrtes Verhältnis gefunden. Der höchste Wert (TIA) wurde bei HC8 mit 9,5 mg gehemmten Trypsins pro g Probe gemessen (schwefelreiches Substrat). Immerhin wurde hier auch ein TIA von 5,5 gemessen, obwohl diese Varianten nicht mit Schwefel versorgt wurden. Der niedrigste Wert wurde bei LA5 mit einem TIA von 1,6 gemessen. Diese Linie scheint insgesamt eine sehr niedrige Aktivität aufzuweisen. Allerdings wurde hier eine höhere Aktivität bei den Varianten gefunden, die nicht mit Schwefel versorgt wurden. Bei dieser Linie ist aber die Streuung der gemessenen Aktivität zu beachten. Die geringste Aktivität weist die Linie LC8 mit einem TIA von 0,6 auf, die auf Schwefelmangelsubstrat angebaut wurde.

4.6. Stickstoff-, Schwefel- und Sulfatmessungen bei Soja und Erbse

4.6.1. Schwefel- und Sulfatmessungen bei Sojabohnen

Bei reifen und getrockneten Sojasamen wurden mittels Schwefelanalysator und HPIC der Schwefel- und Sulfatkonzentration quantifiziert. Im Diagramm in Abbildung 34 wird der Sulfatkonzentration als Sulfatschwefelkonzentration angegeben, damit ein direkter Bezug zum Gesamt-Schwefel ersichtlich wird.

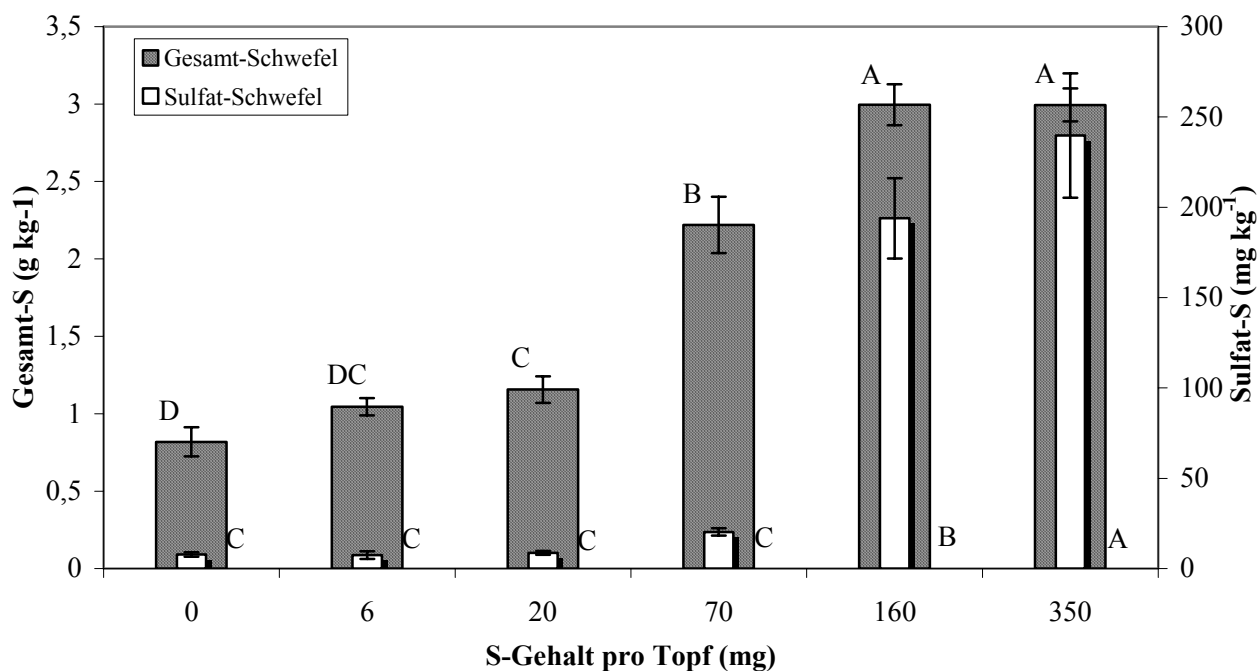


Abbildung 34: Sojabohnen: Gesamtschwefel in g kg⁻¹ TM im Diagramm dargestellt mit großen schraffierten Balken, Sulfatschwefel in mg kg⁻¹ TM als schmale Balken davor. Die Mittelwerte von jeweils vier Wiederholungen (\pm SD) mit demselben Buchstaben in einer Reihe weisen keine signifikanten Unterschiede bei $p < 0.05$ gemäß Tukey's Studentized Range (HSD) Test auf.

Der Gesamtschwefelgehalt ist bei der Schwefelstufe mit 160 mg Schwefel pro Topf am höchsten. Der Gehalt liegt hier bei 3 g kg⁻¹ und lässt sich bei der nächsten Schwefelstufe (350 mg Schwefel pro Topf) nicht weiter steigern. Im Gegensatz dazu ließe sich der Sulfatschwefelgehalt weiter steigern. Dieser liegt bei der Schwefelstufe mit 160 mg Schwefel bei ca. 194 mg kg⁻¹, nimmt aber bei der nächst höheren Schwefelstufe mit ca. 240 mg kg⁻¹ weiter zu.

Die Pflanzen der unteren drei Schwefelstufen liegen mit 0,8-1,2 g kg⁻¹ im Mangelbereich, was man auch sehr gut an den Symptomen erkennen konnte (siehe Abbildung 13).

4.6.2. N-Messungen bei Soja

Wie aus der Abbildung 35 ersichtlich ist, hat sich eine Schwefelsteigerung oder eine Schwefelmangelversorgung der Pflanzen nicht auf den Stickstoffgehalt der Samen ausgewirkt.

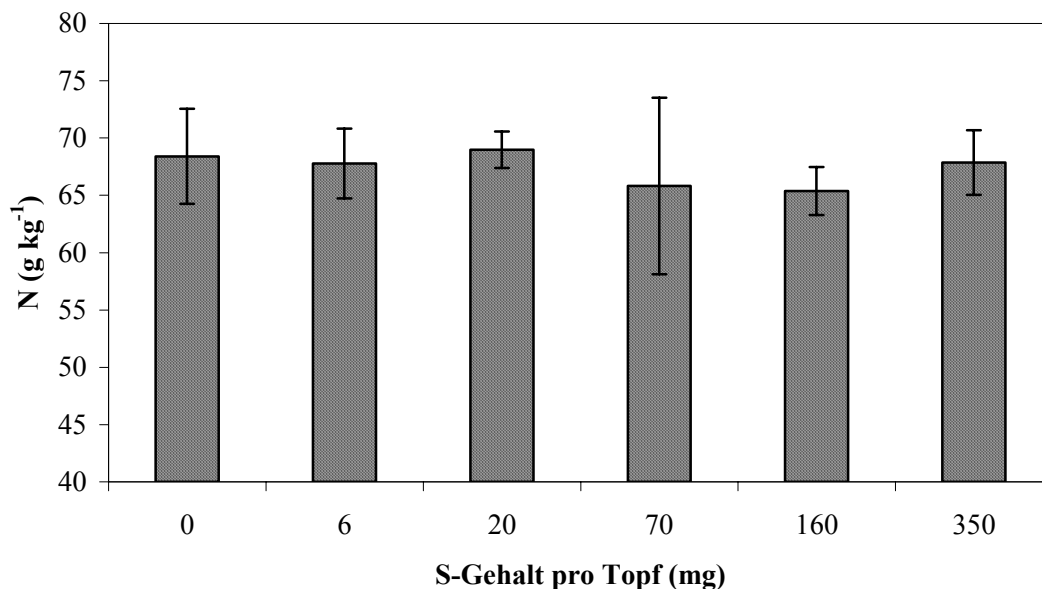


Abbildung 35: Gehalt an Gesamtstickstoff in g kg^{-1} TM in den Samen von Soja nach Schwefelsteigerung. Die Mittelwerte von jeweils vier Wiederholungen (\pm SD) weisen keine signifikanten Unterschiede bei $p < 0.05$ gemäß Tukey's Studentized Range (HSD) Test auf.

Die Sojavarianten der Schwefelsteigerung (Abbildung 35) weisen, unabhängig vom unterschiedlichen Schwefelangebot, einen Gehalt an Stickstoff von ca. 65 bis 69 g kg^{-1} TM auf. Das entspricht einem Rohproteingehalt von 406,3 bis $431,3 \text{ g kg}^{-1}$ TM (Faktor 6,25 aus dem analytisch ermittelten Stickstoffanteil von Leguminosen).

4.6.3. Schwefel- und Sulfatmessungen bei Erbse

Analog zu den Schwefel- und Sulfatmessungen bei den Sojabohnen wurden auch Messungen bei Erbsen durchgeführt.

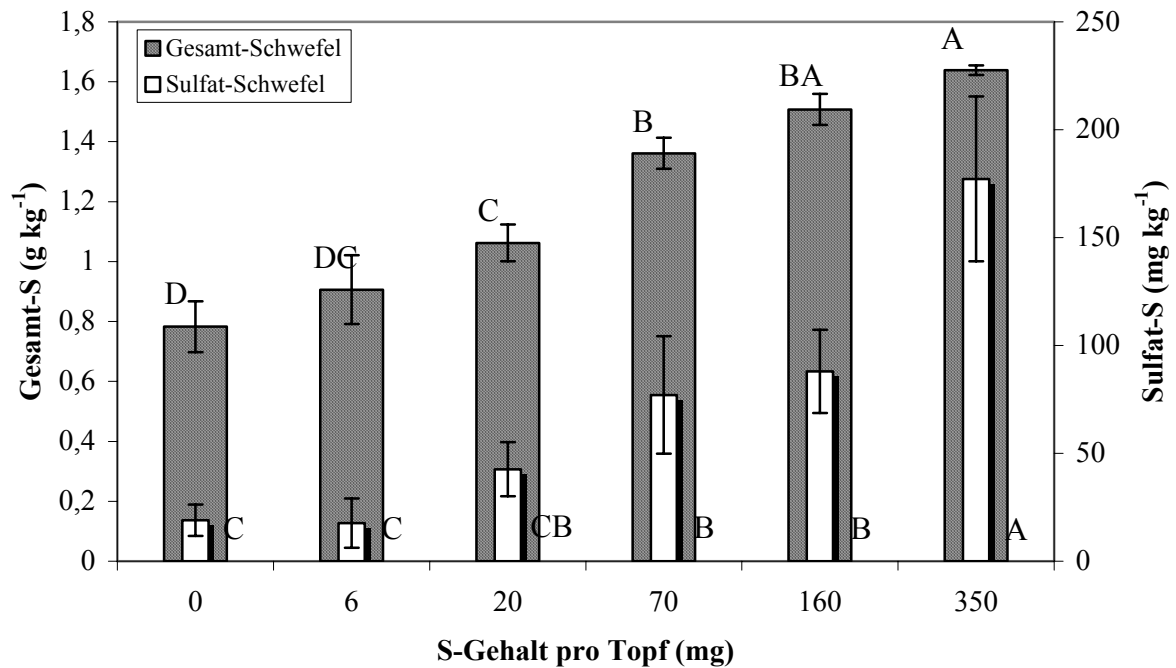


Abbildung 36: Erbsen: Gesamtschwefel in g kg^{-1} TM im Diagramm dargestellt mit großen schraffierten Balken, Sulfatschwefel in mg kg^{-1} TM als schmale Balken davor. Die Mittelwerte von jeweils vier Wiederholungen (\pm SD) mit demselben Buchstaben in einer Reihe weisen keine signifikanten Unterschiede bei $p < 0.05$ gemäß Tukey's Studentized Range (HSD) Test auf.

Trotz ausbleibender Mangelsymptome kann man im Diagramm der Abbildung 36 den Effekt der Schwefelsteigerung deutlich erkennen. Der niedrigste Schwefelgehalt mit ca. $0,8 \text{ g kg}^{-1}$ wurde in den Samen der Schwefelstufe mit 0 mg pro Topf gemessen, der höchste mit ca. $1,63 \text{ g kg}^{-1}$ Schwefel in den Pflanzen, die mit 350 mg Schwefel pro Topf aufwuchsen.

4.6.4. N-Messungen bei Erbse

Bei den Erbsen (Abbildung 37) verhält es sich ähnlich wie bei Soja. Sie enthalten zwischen 36 bis 39 g kg⁻¹ TM Stickstoff, was einen Rohproteingehalt von 225,0 bis 243,8 g kg⁻¹ TM entspricht.

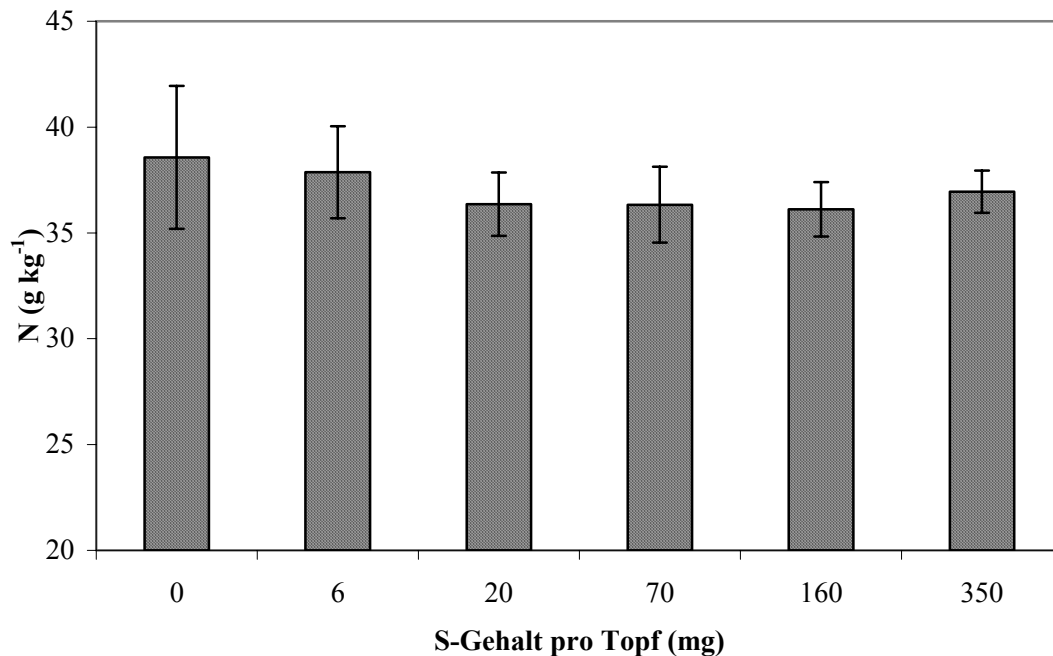


Abbildung 37: Gehalt an Gesamtstickstoff in g kg⁻¹ TM in den Samen von Erbsen nach Schwefelsteigerung. Die Mittelwerte von jeweils vier Wiederholungen (\pm SD) weisen keine signifikanten Unterschiede bei $p < 0.05$ gemäß Tukey's Studentized Range (HSD) Test auf.

4.6.5. Stickstoff-, Schwefel- und Sulfatmessungen bei NIL-Erbsen

Es wurden Stickstoff-, Schwefel und Sulfatschwefelgehalte in den NIL-Erbsen mit den Bezeichnungen LA5, LC8, HA5 und HC8 gemessen (sie unterscheiden sich in der Aktivität des Trypsin-Inhibitors). Der Anbau erfolgte, wie unter Kapitel 4.4.2. beschrieben, in Schwefelmangel-Substrat (0 mg Schwefel pro Topf) und auch in schwefelreichem Substrat (160 mg Schwefel pro Topf) erfolgte.

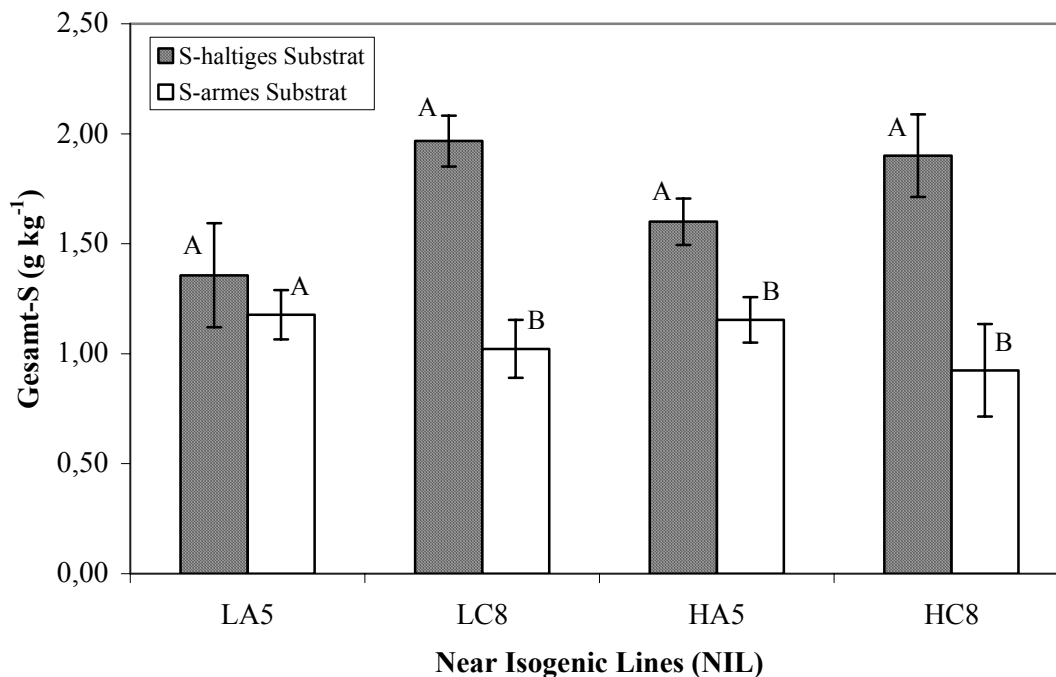


Abbildung 38: Gesamt-S in g kg⁻¹ TM in Nahen Isogenen Erbsenlinien (NIL) mit den Bezeichnungen LA5, LC8, HA5 und HC8. Die Mittelwerte von jeweils vier Wiederholungen (\pm SD) mit demselben Buchstaben weisen keine signifikanten Unterschiede bei $p < 0.05$ gemäß Bonferoni-Prozedur auf.

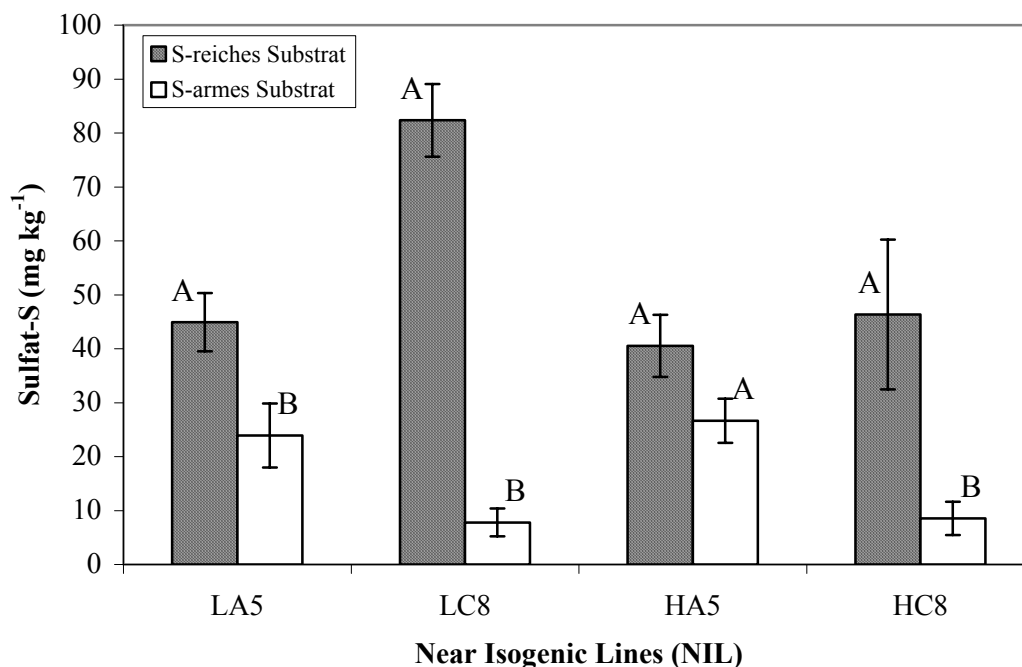


Abbildung 39: Sulfatschwefelgehalt in mg kg⁻¹ bei NIL-Erbsen. Die Mittelwerte von jeweils vier Wiederholungen (\pm SD) mit demselben Buchstaben weisen keine signifikanten Unterschiede bei $p < 0.05$ gemäß Bonferoni-Prozedur auf.

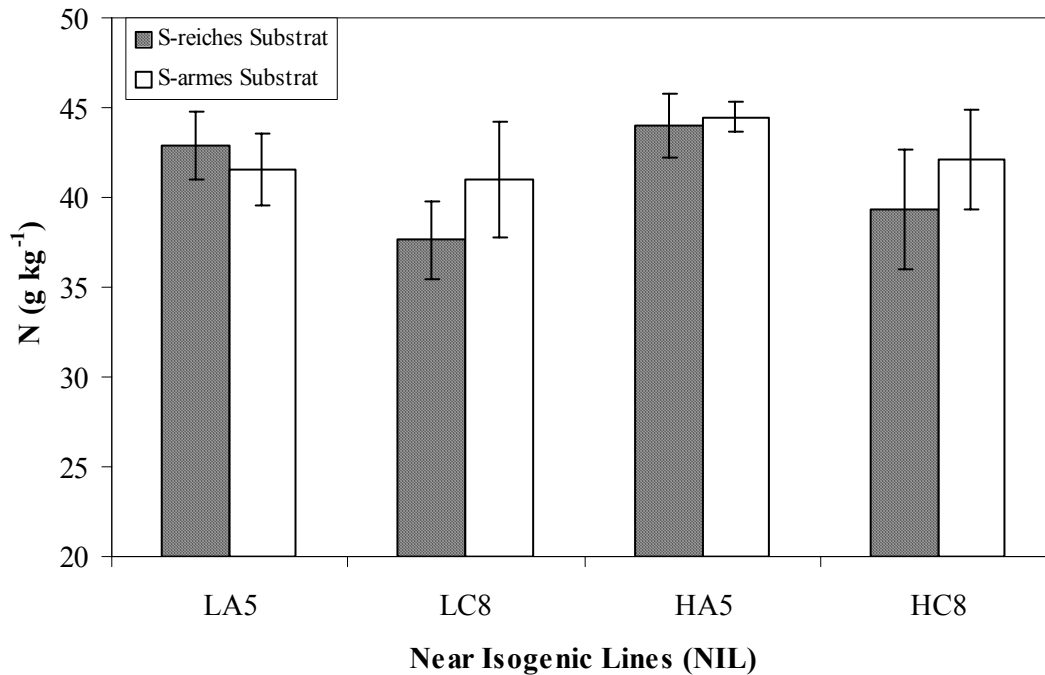


Abbildung 40: Gehalt an Gesamtstickstoff in mg kg^{-1} TM in den Samen von NIL-Erbсен. Die Mittelwerte von jeweils vier Wiederholungen (\pm SD) weisen keine signifikanten Unterschiede bei $p < 0.05$ gemäÙ Bonferoni-Prozedur auf.

Wie aus der Abbildungen 40 ersichtlich ist, hat sich eine unterschiedliche Schwefelversorgung der Pflanzen nicht auf den Stickstoffgehalt der Samen ausgewirkt. Bei den NIL-Erbсен wurde ein Gehalt von 37,6 bis 44,0 mg kg^{-1} TM für die Varianten gemessen, die in schwefelhaltigem Substrat angebaut wurden. Für die NIL-Erbсен in Schwefelmangelsubstrat wurde ein Gehalt von 41,0 bis 44,5 mg kg^{-1} TM gemessen. Die relativ niedrigsten Gehalte weist hier die Variante mit der Bezeichnung LC8 auf, die relativ höchsten Gehalte weist die Variante HA5 auf.

5. Diskussion

5.1. Schwefelsteigerung und Samenertrag bzw. Proteinertrag

5.1.1. Samenertrag

Eine Ertragssteigerung (Gewicht und Anzahl der Samen) mit einer Schwefelernährung von mehr als 160 mg Schwefel pro Topf konnte nicht nachgewiesen werden (siehe Abbildung 10). Signifikante Unterschiede kann man nur zwischen der 0 mg Stufe und der 70 mg Stufe sowie der 70 mg Stufe und der 160 mg Stufe erkennen. Das Ziel bei der S-Steigerung war allerdings, deutlich über das Ertragsoptimum hinauszugehen, um zu sehen, ob im oberen Bereich der S-Düngung Variationen der Proteinqualität möglich sind (siehe nächstes Kapitel). Bei den Erbsen ließ sich ein ähnliches Ergebnis nachweisen (Abbildung 16). Dort waren aber die Symptome, anhand derer sich ein Schwefelmangel nachweisen ließe, nicht ausgeprägt. In der Literatur finden sich Hinweise darauf, dass nicht nur auf züchterischem oder molekularbiologischem Wege es möglich ist, die Proteinqualität der Leguminosen zu erhöhen. Der Mineralstoffversorgung kommt hierbei eine zentrale Rolle zu.

So soll Sulfatmangel während der Hülsenfüllung die relative Abundanz der β -Kette des β -Conglycinins erhöhen. Genauso hat es sich gezeigt, dass ein übermäßiges Stickstoffangebot (z.B. Harnstoff) während der Hülsenfüllung den Samenertrag erhöht. Mit ausreichender Stickstoffversorgung soll mit zunehmender Schwefelversorgung der Samenertrag steigen (Gayler und Sykes, 1985).

Schwefel ist, nicht wie Stickstoff, einheitlicher zwischen den alten und den jungen Blättern verteilt. Der Gehalt ist in alten und jungen Blättern ähnlich vom Ausmaß der Schwefelversorgung betroffen (Freney et al., 1978). Die Verteilung des Schwefels in Schwefelmangelpflanzen wird auch von der Stickstoffversorgung beeinflusst. In den Leguminosen ist, während des Frühstadiums des Schwefelmangels, die Nitrogenaseaktivität in den Wurzelknöllchen stärker eingeschränkt als die Photosynthese (DeBoer und Duke, 1982); die Symptome des Schwefelmangels in symbiotisch gewachsenen Leguminosen sind mit den Symptomen des Stickstoffmangels ununterscheidbar (Anderson und Spencer, 1950), da bei S-Mangel die Synthese der Nitrogenase selbst betroffen sein kann (Munshi und Reena, 2001). Für eine ausreichende Stickstoffversorgung bei den Versuchsgliedern wurde gesorgt. Immerhin zeigten die mit ausreichend Schwefel versorgten Varianten keinerlei Mangelsymptome (siehe Abbildung 13). Da man die Faktoren minimieren wollte, die zu einer Schwankung im Wuchs der Pflanzen führen konnten, die nicht auf eine unterschiedliche Schwefelversorgung zurückzuführen sind, wurde auf eine Beimpfung mit Rhizobien verzichtet.

5.1.2. Proteinertrag

Schwefel in seiner reduzierten Form, in Cystein und Methionin, ist für die Proteinsynthese nötig und hiermit für das Wachstum und die Entwicklung der Pflanze. Er ist außerdem essentiell für die Synthese von Coenzymen und eine Anzahl sekundärer Metaboliten wie z.B. die Glucosinolate, die auch besonders stark auf das S-Angebot reagieren (vgl. Sattelmacher und Gerendás, 2002).

Es konnte festgestellt werden, dass bei einer Schwefelversorgung mit 0 mg, 6 mg und 20 mg pro Topf die allgemein bekannten Symptome des Schwefelmangels auftraten (Abbildung 13). Dieser Schwefelmangel führte zu Symptomen wie vermindertes Wachstum und Chlorosen, die typischerweise an den jungen Blättern auftraten (vergleiche Herschbach et al., 2002). Dieses konnte man besonders gut bei den Sojapflanzen feststellen (Abbildung 12 und 13).

Erbsen weisen im Vergleich zu Soja einen mäßigen Gehalt an Proteinen auf, der aber immerhin doppelt so hoch ist wie im Getreide (20-30% der Trockenmasse im Samen) und wie alle Samenproteine aus Leguminosen mangelt es an Cystein und Methionin im Protein. Wahrscheinlich reicht der im Saatgut gespeicherte Schwefel aus, um die benötigten Stoffwechselaktivitäten aufrecht zu erhalten, d.h., dass genügend Cystein bzw. Methionin und somit Enzyme synthetisiert werden können, die mindestens für einen funktionierenden Stoffwechsel benötigt werden.

Die Ursachen für die verminderten Chlorophyllgehalte bei Soja ergeben sich aus der Tatsache, dass bei Schwefelmangel die Synthese von Enzymen und Struktur-Proteinen gehemmt ist, was auf einen Mangel an den Aminosäuren Cystein und Methionin zurückzuführen ist (vergleiche Anderson, 1990). Eine drastische Abnahme im Chlorophyllgehalt der Blätter ist eine typische Eigenschaft bei Schwefelmangel (Burke et al., 1986; Dietz, 1989). Dies ist zu erwarten, da in Blättern ein hoher Anteil von Proteinen in den Chloroplasten lokalisiert ist, wo die Chlorophyllmoleküle prosthetische Gruppen des Chromoproteidkomplexes enthalten (Marschner, 1995).

Das verminderte Wachstum ist das Ergebnis der Stoffwechselstörungen, die durch Schwefelmangel ausgelöst werden. Bekanntlich sind Kohlenstoff-, Stickstoff- und Schwefelstoffwechsel aufs engste miteinander verknüpft (Tabe et al., 2002).

Allerdings konnte hier kein Einfluss der Schwefelmangelversorgung auf den Samenertrag bei Soja und Erbse festgestellt werden (Abbildungen 10 und 16). Tabe und Droux (2001) erwähnten nämlich, dass bei ausreichender Stickstoffversorgung mit zunehmender Schwefelversorgung nicht nur der Samenertrag, der Proteingehalt und -ertrag ansteigt, sondern auch die ernährungsphysiologische Qualität der Speicherproteine infolge steigender Methionin-Gehalte.

Dass der Ertrag mit zunehmender Schwefelversorgung bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuchen nicht angestiegen ist, wurde bereits erwähnt. Die Schwefelsteigerung zeigte aber auch keine signifikanten Unterschiede im Gehalt des Rohproteins bei Soja und Erbse (siehe N-Gehalte Abbildungen 35 und 37). Der Methionin-Gehalt bei den Soja-Albuminen ließ sich bei einer Schwefelversorgung mit 70 mg je Topf

signifikant erhöhen (Abbildung 26). Dieser verringerte sich jedoch wieder nach einer Schwefelversorgung von 350 mg je Topf signifikant. Unter 70 mg Schwefel je Topf (von 0 mg auf 70 mg) ließ sich im Gegensatz zu den Albuminen der Gehalt an Methionin bei den Globulinen signifikant steigern. Allerdings hat eine noch höhere Schwefelversorgung keinen weiteren Einfluss mehr auf die Globuline in Soja, in denen die Cystein-Gehalte trotz unterschiedlicher Schwefelversorgung relativ konstant sind. Dies legt den Schluss nahe, dass sich die Proteinqualität in Soja durch noch höhere Schwefelgaben nicht weiter verbessern lässt und man somit von einem Schwefel-Gleichgewicht (Schwefel-Homeostase) sprechen kann.

Es werden alle Speicherproteine der Leguminosensamen in den Cotyledonen synthetisiert (Macnicol, 1983). In Studien (Flinn et al., 1968; Kapoor und Gupta, 1977; McKee et al., 1955), die auch die freien Aminosäuren mit einschlossen, wurden ganze Samen, inklusive Samenschale, untersucht. Veränderungen in den Cotyledonen waren immer einhergehend mit Veränderungen der Mengen an freien Aminosäuren in der Samenschale, die ein wesentliches Reservoir für freie Aminosäuren darstellen [...].

Für das Methionin ist bei einer Schwefelgabe von 160 mg je Topf die physiologische Obergrenze der Methioninkonzentration im gesamten Samen erreicht, die sich auch durch eine Schwefelgabe von 350 mg je Topf nicht weiter erhöhen ließ. Trotzdem wurde ein viel höherer Methionin-Gehalt im ganzen Samen gemessen (Abbildung 28) als nur in den Speicherproteinen des Embryos ($42,56 \mu\text{mol g}^{-1}$ TM im ganzen Samen und $22,48 \mu\text{mol g}^{-1}$ TM in den Speicherproteinen, ergo: $20,08 \mu\text{mol g}^{-1}$ Methionin, die nicht im Speicherprotein des Embryos enthalten sind). D.h., dass immerhin durch eine ausreichenden Schwefelversorgung der Gehalt an Methionin entweder in der Samenschale oder im restlichen Embryo noch weiter gesteigert werden kann, obwohl dieses in den Speicherproteinen ab einem bestimmten Punkt nicht mehr möglich ist.

Dass die Albumine sich im Gegensatz zu den schwefelarmen Globulinen durch einen vergleichsweise hohen Gehalt an schwefelhaltigen Aminosäuren auszeichnen (Shewry et al., 1995; Müntz et al., 1999), konnte hier bestätigt werden (Tabelle 7, Abbildungen 26 und 27), vor allen Dingen konnte bestätigt werden, dass bei den Albuminen nicht das Methionin, sondern eher das Cystein für die relativ hohen Schwefelgehalte verantwortlich ist (Abbildung 26). Wieso der Gehalt an Methionin bei der Schwefelstufe mit 70 mg je Topf größer ist als der Gehalt an Cystein, wirft einige Fragen auf. Es könnte natürlich sein, dass man sich bei einer Schwefelversorgung von 70 mg an der Grenze zwischen Unterversorgung oder Mangel und einer ausreichenden Versorgung befindet. Es scheint, dass die Synthese von Cystein ein wenig rückständig ist und der Einbau desselben in das Albumin im Gegensatz zum eingebauten Methionin vielleicht gehemmt ist und sich das Verhältnis Cystein/Methionin (siehe Tabelle 7) ab einer höheren Schwefelgabe wieder umkehrt.

5.2. Trennsäulenvergleich

Es wurden drei RP-Säulen, die mit Material unterschiedlicher Firmen gefüllt sind, miteinander verglichen (wesentliche Eigenschaften und Spezifikation der Säulen: siehe Kapitel 3.7.2.5.).

Die durchschnittliche Anzahl der Peaks (siehe Tabelle 6) ist bei der Grom Saphir C₁₈ am höchsten (Abbildung 18), unterscheidet sich aber nicht sehr stark von der Vydac C₁₈ (Abbildung 20). Die Nucleosil C₁₈ (Abbildung 19) hat die geringste Anzahl an Peaks von den drei Trennsäulen. Man muss aber beachten, dass sich die Peak-Form der Nucleosil C₁₈ im Gegensatz zur Vydac C₁₈ durch eine erheblich geringere Peakverbreiterung und geringeres Tailing auszeichnet. Im Gegensatz zur Grom Saphir C₁₈ weist sie aber ein stärkeres Tailing auf. Aufgrund der größeren Partikel bei der Vydac C₁₈ kann man eine Peak-Verbreiterung erkennen, die auf eine erhöhte Diffusion des Analyten in der mobilen Phase zurückzuführen ist (Abbildung 20 und 21). Ein weiterer Effekt ist das Absinken des Druckes aufgrund der größeren Partikel. Hier könnte mit einer höheren Fließgeschwindigkeit gearbeitet werden, wobei sich die Analysenzeit erheblich verkürzen würde.

Der wichtigste Unterschied bei allen Säulen ist in der Trenneigenschaft ab einer Retentionszeit von 26 min zu erkennen (hoher organischer Anteil in der mobilen Phase). Hier sticht die Grom Saphir C₁₈ mit einer erhöhten Peak-Anzahl (Tabelle 6) und definierter Peak-Form (siehe Abbildung 18) heraus.

Zu dieser Retentionszeit werden hauptsächlich die hydrophoberen Globuline eluiert (siehe Abbildung 18). Man kann sicherlich an dieser Stelle den Gradienten für die Nucleosil C₁₈ und Vydac C₁₈ anpassen und vielleicht auch die Durchflussrate erhöhen, um eine bessere Trenneigenschaft in diesem Bereich zu gewährleisten. Da aber aus Gründen der Aktualität die Grom-Säule bevorzugt wurde, wurden diesbezüglich keine weiteren Schritte mehr unternommen.

5.3. Zusammensetzung der Protein-Peaks

Man kann im Elektropherogramm (Abbildung 25) erkennen, dass die Fraktionen Proteinbanden gleichen Molekulgewichts aufweisen, was auf die annähernd gleiche Komposition der Banden hindeutet. Da das Elektropherogramm unter reduktiven Bedingungen entwickelt wurde, kann man davon ausgehen, dass die Banden aus Protein-Untereinheiten bestehen. Die Banden weisen jedoch verschiedene Intensitäten in der Stärke auf. Wahrscheinlich sind hier Glycinin und β -Conglycinin in verschiedenen Mengen miteinander gemischt und eluieren von der Säule deshalb zu verschiedenen Zeiten (vergleiche Buehler et al., 1988 u. 1989; Wolf et al., 1961).

Es sollte aber darauf hingewiesen werden, dass verschiedene Gene leicht unterschiedliche Peptid-Sequenzen codieren können, die trotzdem identische Molekülmassen besitzen (Louis et al., 2004). So können Peptid-Sequenzen an den Enden der Primärstruktur prozessiert werden, die sich im Aminosäuremuster leicht voneinander unterscheiden und zudem auch unterschiedliche Ladungen aufweisen können. Dies führt bei der chromatographischen Trennung zu mehreren Peaks mit unterschiedlichen Retentionszeiten. Bei der Identifizierung dieser Peaks könnte die Massenspektrometrie in Verbindung mit der LC weiteren Aufschluss geben (ESI-MS oder MALDI-TOF).

5.4. Auswirkungen auf die Aktivität und den Gehalt an Enzym-Inhibitoren

Das Samenprotein von Leguminosen enthält eine Reihe weiterer Komponenten, die als unerwünscht oder ernährungsphysiologisch nicht geeignet gelten (Lectine, Phytate, etc.). Proteinöse Komponenten, die der Albuminfraktion angehören, haben eine günstigere Aminosäure-Zusammensetzung als die Globuline hinsichtlich der schwefelhaltigen Aminosäuren. Vor allen Dingen ist die Summe der schwefelhaltigen Aminosäuren im 2S-Albumin höher ($11,5 \mu\text{mol g}^{-1}$ Cystein und $14,27 \mu\text{mol g}^{-1}$ Methionin gegenüber $5,02 \mu\text{mol g}^{-1}$ Cystein und $15,71 \mu\text{mol g}^{-1}$ bei einer S-Versorgung von 70 mg S pro Topf). Die Cystein-Konzentration ist im Albumin doppelt so hoch als im Globulin. Es ist bemerkenswert, dass allein der Bowman-Birk Inhibitor sieben Disulfid-Brücken aufweist, die durch Cysteinmoleküle gebildet werden. Also kann man davon ausgehen, dass die Zunahme des Cysteins auch mit der Zunahme des Inhibitors korreliert. Diese Inhibitoren zählen zu einer Gruppe wasserlöslicher Proteine mit besonderer biologischer Aktivität, welche die Aktivität proteolytischer Enzyme wie Trypsin und Chymotrypsin hemmen (Norton et al., 1985; Jansman, 1996). Hier wird die Ambivalenz der schwefelreichen 2S-Albumine klar.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass bei einer Schwefelsteigerung sich zwar der Proteingehalt nicht steigerte, aber signifikante Änderungen in der Aktivität der Trypsin-Inhibitoren bei Soja und Erbse zu verzeichnen waren.

Dies bestätigt immerhin, dass eine Schwefeldüngung im Falle der Ackerbohne auf einem Mangelstandort den Proteingehalt der Samen zwar geringfügig steigert (103-104%), v.a. die Gehalte an Trypsin-Inhibitoren hingegen deutlich erhöht (121-222%) (Elsheikh et al., 1999). Die Schwefelsteigerung zeigte zudem signifikante Änderungen im Gehalt der Trypsin-

Inhibitoren bei Soja (der Gehalt in den Erbsen wurde nicht auf Inhibitoren im 2S-Albumin bestimmt).

Immerhin weisen unbehandelte Sojamehle TIA zwischen 18 und 30 auf (Smith et al., 1980). Diese Aktivitäten entsprechen ungefähr den Varianten, die mit 6 mg und 20 mg Schwefel pro Topf versorgt wurden. Dies sind Varianten, die schon ausgeprägten S-Mangel aufwiesen. D.h., dass die Varianten, die im Rahmen dieses Projektes als ausreichend versorgte Pflanzen ausgewiesen wurden (70 bis 350 mg S pro Topf), eine Erhöhung der TIA um 258-280% aufweisen.

Ganz klar konnte gezeigt werden: Je mehr Schwefel der Pflanze angeboten wurde desto höher war die gemessene Aktivität. Man darf nicht vernachlässigen, dass Erbsen eine viel geringere Aktivität aufweisen als Soja. Aber das Muster ist ähnlich.

Das heißt aber, dass die Pflanze in der Lage ist, den erhaltenen Schwefel für die Synthese von Cystein bzw. Methionin zu verwenden, den sie wiederum für die Synthese der Inhibitoren verwenden kann.

Soja hat aber bei 160 mg Schwefel je Topf ein Maximum erreicht. Die Pflanzen sind somit an einer Grenze der Sättigung angelangt, da eine Erhöhung um 190 mg Schwefel (350 mg Schwefel je Topf) nur einen Anstieg der Aktivität um 4,89 hervorgerufen hat.

Bei den Erbsen konnte ein Unterschied zwischen den letzten beiden Stufen von 0,92 gemessen werden, zwischen der 70 mg und der 160 mg Stufe sind es 0,54. Bei der höchsten Stufe wurde eine TIA von 3,78 gemessen. Dies lässt vermuten, dass sich die Aktivität mit zunehmender Schwefelernährung bei Erbsen noch weiter erhöhen lässt. Dann bleibt natürlich die Frage, ob dies sinnvoll wäre. Wie weiter unten ausführlicher erwähnt wird, führt die Anwesenheit von TI zu einer Hypersekretion von Trypsin, zu Hypertrophie des Pankreas und wiederum zu einem erhöhten Bedarf an S-haltigen Aminosäuren, die auch im Trypsin enthalten sind. Obwohl TI in Erbsen im Gegensatz zu Soja-TI als weniger effektive Inhibitoren betrachtet werden, ist alleine die Anwesenheit von etwas höheren Konzentrationen ein Grund zur Besorgnis. Immerhin hat sich die Verdaulichkeit bei jungem Geflügel signifikant verbessert, wenn Erbsen mit geringer TIA verwendet wurden als die nahen isogenen Gegenspieler mit hoher TIA (siehe auch nächstes Kapitel). Die Differenz in der TI-Konzentration beeinflusste auch die Gesamt-Konzentration der Aminosäuren im Samen nicht (Wiseman et al., 2003). Dieses Ergebnis wurde hier bestätigt, da zumindest keine Hinweise bestehen, dass auch bei einer mehr als adequaten Schwefelversorgung keine signifikante Zunahme des Proteingehaltes zu verzeichnen war (siehe N-Gehalte Abbildungen 35 und 37).

Für je 31 Ackerbohnen- und Erbsensorten wurden mittlere Trypsin-Inhibitor Aktivitäten (TIA) von 1,41-5,4 TIU mg⁻¹ TS bzw. 0,52-12,5 TIU mg⁻¹ TS analysiert. Dabei wiesen buntblühende Sorten niedrigere TIA als weißblühende Sorten auf (Gatel, 1994). Für je zwei Erbsensorten mit niedriger (2,9 und 2,4 TIU mg⁻¹ TS) bzw. hoher Trypsin-Inhibitor Aktivität (9,7 und 12,8 TIU mg⁻¹ TS) beliefen sich die scheinbaren ilealen Rohproteinverdaulichkeiten auf 70 und 80 bzw. 61% (Jondreville et al., 1992).

Das entspricht 5,51 und 4,56 bzw. 18,43 und 24,32 mg gehemmtes Trypsin pro g TM.

Für die hier verwendete Sorte Grana wurde bei ausreichender Schwefelversorgung ein TIA von 3,78 gemessen (siehe Abbildung 31). Gemäß Belitz et al. (2001) kann inhibitorhaltiges Material zu Ernährungsstörungen führen. So wurde bei Ratten und Hühnern nach

Verfütterung von rohem Sojamehl eine Hyperplasie des Pankreas beobachtet. Die Folge der vermehrten Sekretion von Pankreassaft ist eine vermehrte Stickstoffausscheidung mit den Faeces. Weiterhin treten Wachstumsstörungen auf, die durch Methionin, Threonin und Valin zu beheben sind. Aus diesem Befund ist zu schließen, dass die Ursache der Wachstumsverzögerung in einem Defizit an bestimmten Aminosäuren zu sehen ist, das wiederum Folge der erhöhten N-Ausscheidung ist [...]. Einige Studien konnten zeigen, dass der Bowman-Birk Inhibitor eine relativ hohe thermische Stabilität sowie eine Resistenz gegenüber den sauren Bedingungen und den Verdauungsenzymen des gastrointestinalen Traktes aufweist (Birk, 1985; Yavelow et al., 1983). Kakade et al. (1973) konnten demonstrieren, dass Proteinase-Inhibitoren für ca. 40% der Wachstumsdepression und Pankreas-Vergrößerung verantwortlich sind, die bei Ratten beobachtet wurden, welche mit Sojabohnen gefüttert wurden.

Weiterhin wurde erwähnt (Belitz et al., 2001), dass Humantrypsin durch Inhibitoren aus Leguminosen im Allgemeinen im gleichen Umfang oder etwas weniger gehemmt wird als Rindertrypsin. Humanchymotrypsin wird dagegen von den meisten Leguminosen stärker gehemmt [...]. Die Stabilität eines Inhibitors bei der Magenpassage muss für die Beurteilung einer potentiellen Wirkung ebenfalls in Rechnung gestellt werden. So wird z.B. der Kunitz-Inhibitor der Sojabohne durch Magensaft des Menschen völlig inaktiviert, der Bowman-Birk Inhibitor aus der gleichen Quelle dagegen nicht. Aus den verfügbaren Daten folgt, dass die vom Menschen durchschnittlich produzierte Tagesmenge an Trypsin und Chymotrypsin durch Extrakte aus 100 g rohen Sojabohnen oder 200 g Linsen bzw. anderen Hülsenfrüchten vollständig hemmbar ist [...]. Im Allgemeinen sind die Inhibitoren thermolabil, so dass sie durch geeignete Erhitzungsverfahren (Dämpfen von Sojabohnen über 9 min bei 100°C) mehr oder weniger weitgehend inaktiviert werden können [...]. Eine Abnahme kann auch durch Einweichen erreicht werden. Ein anschließender thermischer Schritt kann dann unter milderen Bedingungen erfolgen.

Die laut Literatur angegebenen (Belitz et al., 2001) in Sojabohnen gefundenen Mengen an Proteinase-Inhibitoren liegen bei ca. 20 mg g⁻¹, was als besonders hohe Konzentration bezeichnet wird. Bei der Quantifizierung mittels RP-HPLC im Rahmen dieser Arbeit wurden 16,65 mg g⁻¹ des Trypsin-Inhibitors bei einer Schwefelversorgung von 160 mg je Topf gefunden (siehe Abbildung 30).

Bei den Sojabohnen wurde eine bis zu 20fach höhere Aktivität als bei den Erbsen gemessen. Erhitztes Sojamehl weist immer noch eine TIA von 21,6 auf (Smith et al., 1980). Das ist immer noch die 5fache Aktivität wie in unerhitzten Erbsen. Wahrscheinlich kann man bei den Sojabohnen wegen den oben genannten gesundheitlichen Einschränkungen nicht auf eine thermische Behandlung verzichten.

Bei den geringen Aktivitäten, die Erbsen aufzuweisen haben, steht eine thermische Behandlung außer Frage. Hier kann allerdings über mögliche andere Effekte diskutiert werden.

Clemente et al. (2005) berichten, dass neueste wissenschaftliche Erkenntnisse darauf hindeuten, dass Proteinase-Inhibitoren der Bowman-Birk Familie sehr vielversprechend als chemopräventive Mittel im Kampf gegen Krebs sind. Es hat sich herausgestellt, dass der Bowman-Birk Inhibitor der Sojabohne schützende oder unterdrückende Funktion auf carcinogene Prozesse in Tiermodelsystemen *in vitro* und *in vivo* besitzt.

Hier muss man abwägen, ob die Vorteile, die durch Inhibitoren hinsichtlich der Krebsprävention gegeben sind, nicht durch die Nachteile wie Pankreasvergrößerungen aufgehoben werden. Inzwischen hat die Suche nach chemopräventiven Mitteln im Kampf gegen Krebs in der Naturstoffchemie und anderen Disziplinen einen großen Umfang angenommen. Dabei werden auch immer häufiger Wirkungen bei Substanzen postuliert, die vor einiger Zeit noch als absolut schädlich für den menschlichen oder tierischen Organismus galten. Es können sich auch sogenannte Toleranzen entwickeln. Beispielsweise wurde die Frage weiterhin unterschiedlich beurteilt, ob der negative Effekt des Phytins auf die Mineralstoffausnutzung nur während kurzer Zeit wirksam ist und sich nach längerfristiger Aufnahme eine „Phytintoleranz“ entwickelt. Hierfür sprechen Ergebnisse, bei denen sich trotz konstanter Phytinzufuhr bei primär negativer Bilanz (Kalzium) nach einigen Wochen unter konstanten Bedingungen wieder eine positive Bilanz einstellte (Kasper, 2004). So kann es sein, dass der Nutzen der Inhibitoren bei Soja, ohne thermischer Behandlung, für solche gesundheitsfördernden Effekte indiskutabel ist, nach der Erhitzung aber die Aktivität nicht zu hoch ist, um auch gesundheitsfördernde Effekte oder Toleranzen zu erzielen. Die moderate TIA in Erbsen könnte schon angemessenere Effekte erzielen, wobei die TIA bei Erbsen mit der von thermisch behandeltem Soja vergleichbar ist (vgl. Wiseman et al., 2003 u. 2006). Es gibt aber noch keine klaren Aussagen über Dosis/Wirkungs-Beziehungen, d.h. auch welche Konzentration des Inhibitors gesundheitsförderlich ist und bei welcher Konzentration die antinutritiven Effekte überwiegen.

Hieraus ist zu folgern, dass eine Erhöhung der Schwefelernährung sich auf der einen Seite positiv für die Proteinqualität auswirken kann, auf der anderen Seite aber auch eine Erhöhung in der Aktivität unerwünschter Protease-Inhibitoren mit sich bringen kann.

Die Konzentration an Methionin erhöht sich zwar durch mehr Schwefel, dieses aber kann wiederum aufgrund der Trypsin-Inhibitoren nicht vollständig verwertet werden.

5.5. Auswirkungen der Schwefelernährung auf NIL-Erbesen

Bei der LA5-Linie hat eine Versorgung mit und auch ohne Schwefel keinen signifikanten Einfluss auf die Aktivität der in ihr enthaltenen Trypsin-Inhibitoren. Die Aktivitäten sind annähernd gleich. Anders verhält es sich mit den Linien LC8, HA5 und HC8. Bei ihnen wurden erheblich unterschiedliche Aktivitäten gemessen. Bei den Linien LC8 und HA5 wurde mit einer Schwefelernährung im Gegensatz zur Mangelernährung eine Aktivitätssteigerung von 1,75 gemessen. Die TIA bei der Linie HA5 ist aber insgesamt höher. Die höchste Aktivitätssteigerung verzeichnet die Linie HC8 mit 3,96. Bei ihr wurde eine TIA von 5,52 gemessen, trotz Schwefelmangelernährung.

Die Steigerung des Gesamt-S in den nahen isogenen Linien (Abbildung 38), lässt vermuten, dass mit der Steigerung des TIA wiederum der Gehalt an schwefelhaltigen Aminosäuren gesteigert wurde, was ja eigentlich eine Verbesserung der nutritiven Eigenschaften der Erbsen bedeutet (falls die TI keinen größeren Einfluss auf die Verdauung besitzen). Auch hier lässt der Gehalt an Gesamtstickstoff (Abbildung 40) bei allen Linien erkennen, dass der Rohproteingehalt zwischen den Varianten, die auf S-reichem Substrat angebaut wurden, und den Varianten, die auf S-armem Substrat angebaut wurden, sich nicht signifikant steigern ließ. An dieser Stelle fehlen jedoch Daten über den Gehalt an Cystein und Methionin in den NIL-Erbesen, um diesen Sachverhalt zu erhärten. Durch die Ergebnisse bei Soja hinsichtlich der Zunahme des Gehaltes an schwefelhaltigen Aminosäuren bei einer S-Steigerung, kann man aber Analoges in Betracht ziehen.

Auch hier konnte bestätigt werden (siehe Abbildung 39), dass der Sulfatgehalt in Mangelpflanzen (S-Stufe 0 mg Schwefel pro Topf) extrem gering ist und wiederum deutlich ansteigt (S-Stufe mit 160 mg Schwefel pro Topf), wenn die Schwefelernährung für optimales Wachstum ausreichend ist.

Weitere Untersuchungen über die Verdaulichkeit dieser isogenen Erbsenlinien könnten Aufschluss darüber geben, inwiefern sich eine Verwendung bei variabler Schwefelernährung leistungssteigernd oder antinutritiv auf Mastvieh auswirkt.

Bei der Linie HC8 mit einer TIA von 9,47 wäre eine Verfütterung an Mastvieh eher leistungsmindernd. Sie gehört damit schon zu einer Erbsensorte, die laut Jondreville et al., (1992) zu einer Sorte mit hoher TIA gehört. Selbst bei einer Schwefelmangelernährung würde die Linie noch in diese Kategorie fallen. Wohingegen eine Verfütterung der Linie LA5 mit einer TIA von 1,72 eher bedenkenlos wäre.

Demgegenüber steht der verminderte Eigenschutz der Pflanze und der vielleicht damit verbundene Einsatz von Pflanzenschutzmitteln.

Antinutritive Faktoren, zu denen u.a. TI zählen (weitere wären Lectine, Hämagglutinine, Phytate, etc.) können in der Mast durch Futtermischungen und supplementierten Aminosäuren zu höherer Akzeptanz beim Mastvieh führen (Abel, 1996).

Bei der LC8-Linie wäre ein Anbau auf Schwefelmangelboden wahrscheinlich ungünstig, da diese Linie mit einer gemessenen TIA von 0,56 wohl weniger Schutz gegen Fraßfeinde bieten kann. Hier wäre die Anwendung einer Schwefeldüngung oder die Verwendung von Pflanzenschutzmitteln obligatorisch. Inwiefern die Inhibitoren überhaupt einen gravierenden

Einfluss auf den Befall von Fraßfeinden oder Krankheitserregern haben, sollte vorher geklärt werden und könnte Gegenstand zukünftiger Versuche werden.

Vermutlich sind die im Vergleich zu Sommererbsensorten höhere Trypsin-Inhibitor Aktivität und weitere antinutritive Faktoren von Wintersorten für deren niedrigere scheinbare Verdaulichkeit (ileal bzw. fäkal) des Rohproteins, der Stärke und der Energie verantwortlich (Perez und Bourdon, 1992). Extrudieren führt zur Zerstörung der TIA von Erbsen und zur Steigerung der ilealen Verdaulichkeit des Rohproteins und der Stärke (Aumaitre et al., 1992) [...]. Abel (1996) erwähnt die Protease-Inhibitoren als Substanzen, die sich leistungsmindernd auf den tierischen Stoffwechsel auswirken. Sie werden als antinutritive Faktoren (ANF) bezeichnet [...]. Futtermischungen mit höheren Anteilen roher Erbsen können bei Ferkeln Akzeptanzprobleme verursachen, die jedoch durch Verwendung von ANF-ärmeren Sommersorten, wie in diesem Fall die Linien LA5 und LC8, vermindert werden (Gatel und Grosjean, 1990) und durch Warmbehandlungsverfahren (z.B. Extrudieren) vollständig beseitigt sind (Gatel, 1992; Bengela Freire et al., 1989). Wenn aber der Einsatz eines Warmbehandlungsverfahrens schon diskutiert wird, dann könnten auch solche Linien wie HA5 oder HC8 zum Einsatz in Futtermischungen kommen. Hierbei wäre ein Einfluss der TI weitestgehend ausgeschlossen und durch den damit verbundenen höheren TI-Gehalt eine Steigerung der schwefelhaltigen Aminosäuren und eine Verbesserung der Proteinqualität gewährleistet (vgl. Wiseman et al., 2003). Praxisorientierte Untersuchungen zeigen außerdem, dass bei entsprechender Aminosäureergänzung Mischungsanteile bis zu 30% im Alleinfutter für Aufzuchtferkel ohne Leistungseinbußen möglich sind (Böhme 1988). Allerdings weisen französische Ergebnisse darauf hin, dass mit Getreide/Soja-Mischungen vergleichbare Leistungen nur mit den üblichen Versorgungsempfehlungen liegenden Aminosäureergänzungen erreicht werden (Gatel und Grosjean, 1990).

5.6. Schwefelsteigerung und Gehalt an Gesamt- bzw. Sulfatschwefel

Bei den Daten für den Gesamtschwefel (Abbildung 34) in Sojasamen kann man vermuten, dass sich der Schwefelgehalt ab 350 mg Schwefel je Topf nicht mehr weiter steigern lässt, da keine weitere signifikante Zunahme ab der 160 mg Stufe erkennbar ist. Es wurde nur eine Zunahme des Sulfatschwefels festgestellt, der vielleicht darauf hindeutet, dass bereits Schwefelmetabolite (kein Sulfat) aus den Samen in andere Teile der Pflanze verfrachtet wurden. Hier könnten vielleicht auch die Sulfatester eine Rolle spielen (vgl. Tabe et al., 2002), die aber verhältnismäßig wenig in der Pflanze enthalten sind. Um Aussagen über eine S-Homeostasis zu erhalten, würde eine Quantifizierung dieser Sulfatester hilfreich sein. Allerdings muss man beachten, dass schon der Sulfatschwefelgehalt sogar weniger als 1/10 des Gesamtschwefels ausmacht und damit schon fast im Bereich des Messfehlers für den Gesamtschwefel-Messwert liegt. Trotzdem kann man erkennen, dass sich die Pflanzen bei 160 mg Schwefel pro Topf im Gesamtschwefelgehalt von den mit 350 mg Schwefel versorgten Pflanzen nicht signifikant unterscheiden, also der Gehalt an reduziertem Schwefel gleich bleibt. Hingegen nimmt der Gehalt an oxidiertem Schwefel (Sulfat) von der höchsten bis zur zweithöchsten Schwefelstufe signifikant ab. Hier scheint die Pflanze einen höheren

Gehalt an Gesamtschwefel durch eine Abnahme oxidierten Schwefels zu kompensieren, was auf eine S-Homeostasis hindeuten kann. Dass der Sulfatgehalt in Mangelpflanzen (S-Stufen 0 mg bis 20 mg Schwefel pro Topf) extrem gering ist und wiederum markant ansteigt (von der S-Stufe mit 70 mg auf 160 mg Schwefel pro Topf), wenn die Schwefelernährung für optimales Wachstum ausreichend ist, konnte hier bestätigt werden (siehe Abbildung 34).

Der Sulfatgehalt in Pflanzen ist dafür ein empfindlicherer Indikator des Schwefelernährungsstatus als der Gesamtschwefelgehalt (Freney et al., 1978; Spencer und Freney, 1980).

Bei den Erbsen ist Ähnliches zu erkennen (siehe Abbildung 36). Der Gehalt an Gesamtschwefel nimmt bei den oberen beiden Schwefelstufen nicht mehr signifikant zu. Im Gegensatz dazu nimmt der Gehalt an Sulfatschwefel weiter zu (Abbildung 36). Ob durch einer Relokalisation ein Transport des Sulfats aus den Samen in die Blätter erfolgte, ist fraglich und würde auch nicht die weitere Zunahme des Gehalts an Sulfat in den Samen begründen. Ob eine weitere Zunahme des Sulfatgehalts bei gleichbleibendem Gesamtschwefel durch Erhöhung des Schwefelangebots über 350 mg je Topf besteht, könnte Gegenstand weiterer Untersuchungen werden. Vielleicht besteht eine Annahme, dass die aus Sulfat in den Samen gebildeten Metabolite über die Samenschale (ein Sink für freie Aminosäuren, vergleiche Macnicol, 1983) in andere Teile der Pflanze verfrachtet werden können, wo sie benötigt werden. Die Translokation des Sulfats erfolgt von den vollentwickelten Blättern über das Phloem zu anderen Sinks in der Pflanze (Smith und Lang, 1987). Der Transport des Sulfats über weite Distanzen erfolgt über das Xylem und hat viele gemeinsame Eigenschaften mit der Nitrat-Assimilation (Marschner, 1995).

Pflanzen nehmen Schwefel primär als Sulfat (SO_4^{2-}) aus dem Boden auf. Es wird aktiv in die Wurzeln transportiert und dann meistens unmetabolisiert über den Xylem-Strom in die Blätter der gesamten Pflanze verteilt (siehe Abbildung 5). Schwefel kann in einer von zwei Oxidationszuständen (+VI und -II) assimiliert werden. SO_4^{2-} kann an eine Hydroxylgruppe eines organischen Moleküls addiert werden. Cystein enthält Schwefel in reduzierter Form, der aus SO_4^{2-} in einem mehrstufigen Stoffwechselweg hervorgeht, bei dem acht Elektronen hinzugefügt werden, um Sulfid (S^{2-}) zu bilden (Leustek und Saito, 1999).

Dass es bei Schwefelmangel zu einer Abreicherung schwefelreicher und einer Anreicherung schwefelarmer Proteine kommt (Blagrove et al., 1976; Chandler et al., 1984; Schroeder, 1984; Kawiani et al., 2006) kann man sehr gut am Gesamtgehalt der schwefelhaltigen Aminosäuren bei Soja erkennen (Abbildung 28), da sich gleichzeitig bei einer S-Steigerung der N-Gehalt (Abbildung 35 und 37) in den Pflanzen nicht verändert und man auf einen gleichbleibenden Proteingehalt bei allen S-Stufen schließen kann. D.h., dass bei Schwefelmangel (siehe Abbildungen 12-15) die S-haltigen Aminosäuren gegen Aminosäuren ausgetauscht werden, die keinen Schwefel enthalten.

6. Ausblick

Wie in der Diskussion schon an einigen Stellen erwähnt wurde, sind auch Fragen aufgetaucht, die in der zukünftigen Betrachtung der Proteinqualität bei Leguminosen von zusätzlicher Relevanz sind. Hierzu zählt auch die Frage, ob eine weitere Zunahme des Sulfatgehaltes in Erbsen bei gleichbleibendem Gesamtschwefel durch Erhöhung des S-Angebots über 350 mg je Topf besteht. Es wäre auch interessant zu wissen, wie hoch die Konzentration an schwefelhaltigen Aminosäuren nach einer S-Steigerung bei den Erbsen ist. Dieses Interesse besteht auch bei den NIL-Erbsen.

Nun ist schon viel Forschung betrieben worden, besonders was die Speicherproteine in Sojabohnen betrifft. Jahrzehnte lang wurde die genaue Zusammensetzung der 12S, 7S und 2S Speicherproteine bei sich wechselnden Umweltbedingungen, d.h. Mangel und Überangebot an Makro- und Mikronährstoffen, der Einfluss anderer Metabolite wie z.B. Glutathion mit Techniken wie Gelelektrophorese, HPLC, Gelpermeationschromatographie (SE-HPLC), etc. bestimmt. Mit Fluoreszenzsondentechnik wurde bestimmt, inwiefern sich die Hydrophobizität bei derivatisierten Speicherproteinen verändert. Mit hydrodynamischen Methoden wie die Kapillarviskosimetrie, der analytischen Ultrazentrifugation oder der dynamischen Lichtstreuung ist man befähigt Konformationsänderungen bei Proteinen zu messen. Die circular dichroitische Spektroskopie kann Aussagen über die Struktur (Sekundär oder Tertiärstruktur) in Lösung geben. Bei dieser Methode nutzt man die Eigenschaft, dass links- bzw. rechts circular polarisiertes Licht unterschiedlich stark absorbiert wird. Gerade die eben aufgeführten Methoden finden Anwendung bei der Charakterisierung von Speicherproteinen, um diese technologisch wirksam oder zum Zwecke von Zusatzstoffen zu verwenden. Bei solchen Forschungsvorhaben ging es nicht um die Proteinqualität im Sinne der Ernährung, sondern häufiger um technologische Zwecke.

Aktuell werden auf der Basis von Proteomics und der Proteome-Datenbank und mit Hilfe der MALDI-TOF-Massenspektrometrie Untersuchungen durchgeführt, um die Vorgänge während der Samenfüllung bei der Sojabohne oder anderen Leguminosen zu studieren (Hajduch et al., 2005). Immer mehr finden Microarray-Analysetechniken Verwendung, um Gen-Expressionen zu analysieren, insbesondere während der Samenfüllung (Girke et al., 2000; Ruuska et al., 2002). Solche Techniken erfordern im Moment aber auch noch das nötige Budget, da sie nicht sehr kostengünstig sind und eine gewisse Qualitätssicherung dabei gewährleistet sein muss. Das Einsparen von Mitteln würde hierbei nur zu mangelnder Reproduzierbarkeit führen.

Trotzdem wäre es interessant zu erfahren, wie die Auswirkungen einer Schwefelsteigerung unter dem Gesichtspunkt der eben genannten Methoden zu analysieren und zu bewerten sind.

Des Weiteren wurde in der Literatur (Azzouz et al., 2005) die Frage erörtert, ob transgene Pflanzen, die Proteinase-Inhibitoren der Bowman-Birk Familie (oder auch andere) expressionieren, eine erhöhte Resistenz gegenüber Schädlingen versprechen.

Außerdem wäre es interessant zu wissen, welche Beziehung zwischen dem Expressionsmuster der die Trypsin-Inhibitoren kodierenden Gene sowie der Abundanz ihrer Proteine bzw. Aktivität in Abhängigkeit vom Schwefelangebot besteht.

In dieser Hinsicht könnten Versuche unternommen werden, durch die man herausbekommen könnte, ob sich eine Schwefelsteigerung auch günstig für Leguminosen auswirkt, die absichtlich mit Krankheitserregern oder Fraßfeinden beimpft wurden.

Hier könnte man ergänzend auch die Auswirkung der Schwefelsteigerung auf Erbsen-Sorten mit höherer TIA untersuchen.

Auf der anderen Seite wurde von Clemente et al. (2005) berichtet, dass neueste wissenschaftliche Erkenntnisse darauf hin deuten, dass Proteinase-Inhibitoren der Bowman-Birk Familie sehr vielversprechend als chemopräventive Mittel im Kampf gegen Krebs sind. Es hat sich herausgestellt, dass der Bowman-Birk Inhibitor der Sojabohne schützende oder unterdrückende Funktion auf carcinogene Prozesse in Tiermodellsystemen *in vitro* und *in vivo* besitzt. Hier scheint ein noch größerer Forschungsbedarf zu bestehen.

Hinsichtlich der nahen isogenen Erbsenlinien könnten weitere Untersuchungen über die Verdaulichkeit dieser Linien Aufschluss darüber geben, inwiefern sich eine Verwendung bei variabler Schwefelernährung leistungssteigernd oder antinutritiv auf Mastvieh auswirkt. In welchem Maße beeinflusst die durch unterschiedliche Schwefelversorgung hervorgerufene Veränderung der Proteinzusammensetzung und der Trypsininhibitoraktivität die *in vitro*-Verdaulichkeit des Proteins von Erbsen?

Nun wäre es auch interessant zu erfahren, ob eine Schwefelsteigerung einen Effekt auf die Abundanz des PA1 und PA2 in Erbsen hat, da Bestrebungen bestehen, die Proteinqualität zu verbessern, indem Proteine mit unerwünschten Charakteristiken reduziert oder gar beseitigt werden (Wang et al., 2003). Zeigen transgene Erbsen, welche eine zusätzliche Kopie des cysteinreichen PA1-Proteins enthalten, einen erhöhten PA1-Gehalt und eine Schwefel-Homöostasis unter Berücksichtigung des Aminosäure- und Sulfatschwefels?

Zu guter Letzt besteht die Frage, ob sich die unter kontrollierten Bedingungen gewonnen Erkenntnisse zum Einfluss der Schwefelversorgung auf Speicherproteinfraktionen, Aminosäuregehalte und TIA unter Freilandbedingungen reproduzieren lassen.

7. Zusammenfassung

Schwefel ist einer der sechs Makronährstoffe, die von Pflanzen benötigt werden. Er ist Bestandteil der Aminosäuren Cystein und Methionin und weiteren Stoffwechselprodukten. Im Vergleich zu den Getreideproteinen zeigen die Leguminosenproteine einen geringeren Schwefelgehalt auf. Die Ursache ist ein verminderter Gehalt an den schwefelhaltigen Aminosäuren Methionin und Cystein, die auch die biologische Wertigkeit der Proteine begrenzen. Aufgrund der großen Bedeutung der schwefelhaltigen Aminosäuren wird seit langem versucht, insbesondere den Methioningehalt zu erhöhen. Die globulären Speicherproteine in Leguminosen werden in zwei Hauptgruppen aufgeteilt: die hexameren legumin- und die trimeren vicilinartigen Speicherproteine mit Sedimentationskonstanten von 12S (Legumin) und 7S (Vicilin und Convicilin bei Erbse). Bei der Sojabohne werden die 12S-Speicherproteine Glycinin und die 7S-Speicherproteine β -Conglycinin genannt. Man hat herausgefunden, dass bei Zunahme oder Abnahme des Gehalts an Methionin in den Speicherproteinen der Sojabohne dieses durch die relative Abundanz der β -Kette des β -Conglycinins bedingt wird, und ein Mangel an freien schwefelhaltigen Aminosäuren die Synthese des Glycinins beschränkt. Die Albumine zeichnen sich im Gegensatz zu den schwefelarmen Globulinen durch einen vergleichsweise hohen Gehalt an schwefelhaltigen Aminosäuren aus. Jedoch ist bei den Albuminen nicht das Methionin, sondern eher das Cystein für die relativ hohen Schwefelgehalte verantwortlich. Das Samenprotein von Leguminosen enthält eine Reihe weiterer Komponenten, die als unerwünscht oder ernährungsphysiologisch nicht geeignet gelten. Diese Proteine verleihen den Pflanzen eine Resistenz gegen Krankheitserreger und Schutz gegen Fraßfeinde (samenfressende Insekten). Unter diesen sind die Enzym-Inhibitoren die reichhaltigste. Die Inhibitoren der Bowman-Birk Familie sind die am weitesten verbreiteten und intensivst erforschte Gruppe. Sie kommen besonders reichhaltig in Leguminosensamen vor. Neueste wissenschaftliche Erkenntnisse deuten darauf hin, dass Proteinase-Inhibitoren der Bowman-Birk Familie sehr vielversprechend als chemopräventive Mittel im Kampf gegen Krebs sind, obwohl bisher überwiegend negative Effekte der Trypsin-Inhibitoren bekannt waren (Wachstumsdepression, Pankreasvergrößerung). Es hat sich herausgestellt, dass der Bowman-Birk Inhibitor der Sojabohne schützende oder unterdrückende Funktionen auf carcinogene Prozesse im Tiermodelsystem *in vitro* und *in vivo* besitzt.

Diese Studie vergleicht die Unterschiede der Proteinqualität hinsichtlich der Gehalte an schwefelhaltigen Aminosäuren wie Methionin und Cystein in Leguminosen, die durch den Einfluss einer gesteigerten Schwefelversorgung entstehen. Durch Bestimmung des Aminosäuremusters und der Stickstoff- und Schwefelgehalte wurde geprüft, in welchem Maß Anpassungsmechanismen bestehen. Es sollte auch neben dem Gesamt-S-Gehalt auch der Gehalt an oxidiertem Schwefel bestimmt werden, um Aussagen zur S-Homeostasis zu erhalten. Es wurde außerdem an ausgewähltem Material der Einfluss des Schwefelversorgungsgrades auf die Aktivität an Proteinase-Inhibitoren bestimmt, um die Auswirkung eines variablen Schwefelangebots auf die ernährungsphysiologische Qualität zu charakterisieren. Interesse bestand auch darin, ein geeignetes Diagnoseverfahren für die S-

Versorgung zu finden. In Gefäßversuchen im Gewächshaus wurde der Einfluss des Schwefelangebots auf die Proteinqualität der Samen von Erbse und Sojabohne untersucht. Dabei wurden Soja und Erbse sowie nahe isogene Erbsenlinien bei einer sechsstufigen Sulfatschwefelernährung gezogen, die eine Schwefelmangelversorgung (0, 6 und 20 mg Schwefel je Topf) genauso wie eine ausreichende Schwefelversorgung beinhalten sollte (70, 160 und 350 mg Schwefel je Topf).

Mittels RP-HPLC wurden die Speicherproteine im Sojasamen fraktioniert, wobei die mengenmäßig bedeutsamen Hauptfraktionen, die Albumine und Globuline, auf den Gehalt an schwefelhaltigen Aminosäuren Methionin bzw. Cystein untersucht wurden. Da es nicht mehr möglich war, Standardmaterial von den Proteinfractionen über den Handel zu beziehen, wurden nach der Methode von Thanh und Shibasaki (1976) präzipitierte Soja-Globuline (Glycinin- und β -Conglycinin-Fractionen) mittels RP-HPLC analysiert. Diese Methode wurde aufgrund der Trennung der Albumin-Fraktion von der Globulin-Fraktion durchgeführt, um ein Referenzchromatogramm für die Globulin-Fraktion zu erstellen. Anschließend wurden diese Protein-Fractionen einer sauren Hydrolyse (6 M HCl, 110°C, 22h) unterzogen und auf die darin enthaltenen schwefelhaltigen Aminosäuren Methionin und Cystein analysiert. Die schwefelhaltigen Aminosäuren Methionin, Cystein bzw. Cystin sind zu instabil für eine saure Hydrolyse und neigen dazu sich in Derivate umzuwandeln. Deshalb werden Methionin und Cystein erst bestimmt, nachdem sie einer Oxidation mit Perameisensäure unterzogen wurden und zu Methioninsulfon und Cysteinsäure derivatisiert. Es wurden drei RP-Säulen, die mit Material unterschiedlicher Spezifikation gefüllt sind, miteinander verglichen. Dabei hat sich die moderne Grom Saphir C₁₈ als die leistungsfähigste und für dieses Vorhaben am besten geeignete Trennsäule herausgestellt. Im weiteren Vergleich befanden sich eine Nucleosil C₁₈ und eine Vydac C₁₈-Säule.

Es konnte kein Einfluss einer variablen S-Versorgung auf den Samenertrag bzw. Gehalt an Speicherprotein bei Soja und Erbse in Gewächshausversuchen festgestellt werden. Der ermittelte Rohproteingehalt bei Soja reichte von 406,3 bis 431,3 g kg⁻¹ TM, der Rohproteingehalt bei Erbsen von 225,0 bis 243,8 g kg⁻¹ TM. Es waren keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich des Rohproteingehalts jeder Schwefelstufe zu erkennen. Symptome des Schwefelmangels (niedrige Chlorophyllgehalte, vermindertes Wachstum, Chlorosen) traten bei einer Supplementierung von 0 mg, 6 mg, 20 mg Schwefel pro Topf bei Soja auf. Erbsen zeigten nicht diese ausgeprägten Mangelsymptome.

Der Methionin-Gehalt in den mittels RP-HPLC gewonnenen Proteinfractionen bei Soja reichte von 6,8 bis 14,26 $\mu\text{mol g}^{-1}$ TM im Albumin und von 10,98 bis 15,71 $\mu\text{mol g}^{-1}$ TM im Gobulin. Der Cystein-Gehalt reichte von 7,32 bis 16,35 $\mu\text{mol g}^{-1}$ TM im Albumin und von 4,04 bis 5,86 $\mu\text{mol g}^{-1}$ TM im Globulin.

Der Methionin-Gehalt bei den Soja-Albuminen ließ sich bei einer Versorgung mit 70 mg Schwefel pro Topf signifikant erhöhen, bei den Globulinen ließ sich der Methionin-Gehalt bei den Stufen mit weniger als 70 mg Schwefel pro Topf signifikant steigern (von 0 mg auf 70 mg). Eine ausreichende Schwefelversorgung wurde mit einer Gabe von 160 mg erreicht; ein darüber hinaus gehendes S-Angebot hatte keinen Einfluss mehr auf den Gehalt an Methionin und Cystein in den Albuminen und Globulinen.

Allerdings konnte man eine weitere Zunahme im Gehalt an Methionin und Cystein im gesamten Samen, zu dem auch die Samenschale zählt, beobachten. Hier wurden Methionin-

Gehalte von 20,73 bis 42,57 $\mu\text{mol g}^{-1}$ TM und Cystein-Gehalte von 17,34 bis 52,68 $\mu\text{mol g}^{-1}$ TM gemessen.

Im Gegensatz zu den Aminosäuren ließ sich der Gehalt an Gesamt- bzw. Sulfatschwefel im Soja weiter steigern. Es wurde ein Gesamtschwefelgehalt von 0,8 bis 3 g kg^{-1} TM und ein Sulfatschwefelgehalt von 7,72 mg kg^{-1} TM bis 239 mg kg^{-1} TM bezogen auf die Schwefelstufen ermittelt. Auch in den Erbsen wurden signifikante Unterschiede diesbezüglich beobachtet.

Wie bereits erwähnt hatte die Schwefelsteigerung keinen Einfluss auf den Proteingehalt. Aber es konnten signifikante Änderungen in der Aktivität der schwefelreichen Trypsin-Inhibitoren (TIA) bei beiden Pflanzenarten beobachtet werden. Die ermittelten Aktivitäten reichten von 13,41 bis 84,16 $\text{mg gehemmtes Trypsin pro g Probe}$. Auch eine signifikante Zunahme der Abundanz (von 0,53 mg g^{-1} bis 16,65 mg g^{-1} TM) des Bowman-Birk Inhibitors (BBI) bei Soja aufgrund der Schwefelsteigerung konnte mittels RP-HPLC nachgewiesen werden.

Auch hier deutet eine Versorgung mit 160 $\text{mg Schwefel pro Topf}$ auf eine Sättigungsgrenze hin, wobei über diese Grenze aufgenommenes Sulfat nicht weiter im Aminosäurestoffwechsel metabolisiert wurde. Bei den Erbsen deutet allerdings einiges daraufhin, dass sich die TIA mit einer höheren Schwefelversorgung als 350 mg pro Topf noch weiter steigern ließe. Hier wurden Aktivitäten von 0,34 bis 3,78 $\text{mg gehemmtes Trypsin pro g Probe}$ ermittelt.

Auf züchterischem Wege wurden nahe isogene Linien (NIL) von Erbsen gewonnen, die sich nur im *Tri*-Locus unterscheiden, der die quantitative Variation in der TIA kontrolliert. Für den Gefäßversuch wurden nur zwei S-Stufen (mg S/Gefäß : 0 und 160) mit jeweils vier Wiederholungen gewählt. Bei den verwendeten vier Linien, mit Ausnahme einer Linie, konnten durch Mangelversorgung und ausreichende Ernährung deutliche Unterschiede in der Aktivität nachgewiesen werden. Diese Unterschiede beliefen sich auf 0,56 bis 5,52 $\text{mg gehemmtes Trypsin pro g Probe}$ in den Schwefelmangelvarianten und 1,37 bis 9,48 in den Varianten, die ausreichend mit Schwefel versorgt wurden. Ähnliche Ergebnisse, bis auf wenige Ausnahmen, wurden auch bezüglich des Gehalts an Gesamt- und Sulfatschwefel gefunden.

8. Summary

Sulphur is one of the six macro nutrients which are required by plants. It is a component of the amino acids cysteine and methionine and further metabolites. In comparison to grain proteins the proteins of legumes contain less sulphur. One reason is a decreased content of methionine and cysteine which also limits the biological value of the proteins. Due to the great importance of the sulphur-containing amino acids one tries to increase the content of methionine in particular. The globular storage proteins in legumes are divided in two main groups: the hexameric legumine-like and trimeric vicilin-like storage proteins with sedimentation constants of 12S (legumine) and 7S (viciline and convicine in pea). In soybean the 12S storage proteins are named glycinine and the 7S storage proteins β -conglycinine. Previous work indicates that increase or decrease of the concentration of methionine in storage proteins of soybean affects the relative abundance of the β -chain of β -conglycinine and a lack of sulphur-containing amino acids limits the synthesis of glycinine. Contrary to the sulphur-poor globulines the albumine is characterised by a comparatively high concentration of sulphur-containing amino acids. However in albumines not the methionine but the cysteine is responsible for the relatively high sulphur content. The seed proteins of legumes contain further components which are considered as anti-nutritive factors. These proteins serve as a resistance against diseases and pathogenes as well as protection against herbivorous enemies. Among these components the enzyme inhibitors are the most abundant. The inhibitors of the Bowman-Birk family are the most common and intensively investigated group. Legumes are rich in these inhibitors. Recent investigations indicate that Bowman-Birk Inhibitors (BBI) are very promising as chemopreventive agents against cancer, although predominant negative effects are known until now (growth depression, pancreatic hypertrophy). The BBI from soybean has been shown to be capable of preventing or suppressing carcinogenic processes in a wide variety of *in vitro* and *in vivo* animal model systems.

This study compares the differences of protein quality with regard to the content of the amino acids methionine and cysteine in legumes resulting from the influence of an increased sulphur-supply. Due to estimations of amino acids and concentration of nitrogen and sulphur it was proven in what extent adjustment mechanisms exist. In addition to that the influence of S-supply on the activity of protease-inhibitors was analysed in order to characterise the effects of a variable S-supply in terms of nutritional physiology. Furthermore the seed concentration of total sulphur and sulphate were determined to obtain informations about sulphur-homeostasis. The influence of S-supply on protein quality of soy and pea seeds was determined by pot trials in a greenhouse. Soybean, pea and also two pairs of near isogenic lines of peas with low and high concentrations of trypsin inhibitor were developed in a six-level S-supply spanning from 0 to excessive S-supply (0, 6, 20 mg S per pot and 70, 160, 350 mg S per pot). Storage proteins from soybean were fractionated by RP-HPLC whereas the quantitatively important main fractions, the albumine- and globuline-fractions, were analysed for the concentration of methionine and cysteine.

Three RP-columns with different specifications and different origin were compared with each other. Whereas the Grom Saphir C₁₈ turned out as the most efficient and for this project best

suitable column. In addition to this column a Nucleosil C₁₈ and a Vydac C₁₈ were compared to each other. It was not possible to receive standard material from protein fractions. Thus according to the method of Thanh and Shibasaki (1976) precipitated soy globuline was analysed by RP-HPLC (glycinine- and β -conglycinine-fractions). This method was conducted due to the separation of the albumine fraction from the globuline fraction in order to provide a reference chromatogram for the globuline fraction. Subsequently these protein fractions were hydrolysed (6 M HCl, 110°C, 22h, N₂-Atmosphere) and the concentration of sulphur-containing amino acids was determined. Methionine and cysteine are not stable under these conditions and tend to convert to other derivatives. Therefore an oxidation with performic acid is necessary to convert these amino acids to methioninesulfone and cysteic acid.

No influence of marginal S-supply on seed yield and concentration of storage proteins in soybean and pea was assessed. The concentration of crude protein ranged from 406,3 to 431,3 g kg⁻¹ DM in soybean and 225,0 to 243,8 g kg⁻¹ DM in peas. There was no significant difference regarding the content of crude protein of each sulphur-level. Symptoms of sulphur-deprivation in soybean (low chlorophyll content, growth retardation and chlorosis) occurred at the levels of 0 mg, 6 mg and 20 mg sulphur per pot. Peas did not show these distinct symptoms. The methionine concentration in fractions which were obtained by RP-HPLC ranged from 6,8 to 14,26 $\mu\text{mol g}^{-1}$ DM in albumines and 10,98 to 15,71 $\mu\text{mol g}^{-1}$ in globulines; the cysteine concentration ranged from 7,32 to 16,35 $\mu\text{mol g}^{-1}$ DM in albumines and 4,04 to 5,86 $\mu\text{mol g}^{-1}$ DM in globulines. Methionine concentration in soybean albumines increased significantly due to a supplement with 70 mg S per pot, in globulines with even less than 70 mg S per pot (from 0 mg to 70 mg). For an adequate S-supplement 160 mg was sufficient and did not influence the concentration of methionine and cysteine in albumines and globulines compared to 350 mg S-supply. However a further increase of methionine and cysteine in the entire seed was observed. A concentration of methionine from 20,73 to 42,57 $\mu\text{mol g}^{-1}$ DM and a concentration of cysteine from 17,34 to 52,68 $\mu\text{mol g}^{-1}$ DM was determined.

Contrary to the amino acids it was possible to enhance the concentration of total sulphur and sulphate in soybean. Here a concentration of total sulphur from 0,8 to 3 g kg⁻¹ DM and a concentration of sulphate from 7,72 to 239 mg kg⁻¹ DM was determined relating to the S-levels. In this regard also in peas a significant difference was observed.

As previously mentioned a S-increase had no influence on protein content. But there were significant changes in the activity of trypsin inhibitors (TIA) in both plant species. The estimated activities ranged from 13,41 to 84,16 mg pure trypsin per g of sample. Even a significant increase in the concentration of BBI was estimated by RP-HPLC (from 0,53 mg g⁻¹ to 16,65 mg g⁻¹ DM) in soybean. Also a supplement with 160 mg S per pot indicates a limit of saturation. Whereas an additional supplement of sulphate above this limit did apparently not affect amino acids metabolism. In peas results suggest that it is possible to enhance the TIA with a higher supplement than 350 mg per pot. Here TIAs were estimated which ranged from 0,34 to 3,78 mg pure trypsin per g of sample.

Near isogenic lines (NIL) of peas which differ only in TIA were obtained by plant-breeding. For greenhouse experiments only two levels of S-supply with four replications were chosen (0 mg and 160 mg per pot). With exception of one pea-line it was possible to detect a clear

differentiation between a deficient and a sufficient S-supply in all pea-lines. These differentiations in TIA ranged from 0,56 to 5,52 in the sulfur-deficient varieties and from 1,37 to 9,48 in S-sufficient varieties. Similar results, besides some exceptions, were obtained in total sulphur and sulphate content. These results indicate the direct influence of a variable S-supply on the activity of the sulphur-rich trypsine inhibitors.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Synergistische biotechnologische Annäherungen, um den Methioningehalt in höheren Pflanzen zu erhöhen. SMM, S-Methylmethionin; SAM, S-Adenosylmethionin; APR, APS-Reduktase; SAT, Serinacetyltransferase; α -TS, Antisense-Threonin-Synthase; CgS, Cystathionin- γ -Synthase (nach Hesse et al., 2004).....	11
Abbildung 2: (A) Elektronisches Mikrogramm eines einzelnen Globulin-Komplexes (weiß: Protein; schwarz: Färbemittel). (B) Dreidimensionales Model erhalten aus Einzelpartikel-Analysen (Marcone et al., 1999).....	13
Abbildung 3: Schematische Struktur des Sojabohnen Bowman-Birk Inhibitors. Die Abbildung zeigt die beiden aktiven Seiten (Lys-Ser und Leu-Ser) (Odani und Ikenaka, 1973).	18
Abbildung 4: Schematische Darstellung des Einflusses von Schwefel auf die Biosynthese von Pflanzenmetaboliten oder physiologische Funktionen (nach Nikiforova et al., 2004).	19
Abbildung 5: Model der Schwefelaufnahme und -verlagerung in der gesamten Pflanze (Abbildung links); Transmembranbewegung des Sulfates, treibende Kraft und Potentialmechanismus (Abbildung rechts) (Buchner et al., 2004).	20
Abbildung 6: SO_4^{2-} Transport und Assimilation (nicht vollständig) (Leustek und Saito, 1999).	21
Abbildung 7: (A) Phenotypische Symptome des Schwefelmangels bei <i>Arabidopsis thaliana</i> . Die Pflanze auf der linken Seite wächst in einem Medium mit ausreichender Schwefelversorgung (nach einer Woche Wachstum), wurde dann auf ein Schwefelmangelmedium übertragen (nach 22 Tagen Wachstum). Schwefelmangel äußert sich in gehemmtem Wachstum, frühzeitiges Blütenstadium, verstärktes Wurzelwachstum, Anthocyanin-Akkumulation, veränderte Morphologie der Blätter und Chlorosen. (B) zeigt die Unterschiede des Wachstums der Wurzel bei ausreichender Schwefelversorgung (links) und Schwefelmangel (rechts) (Nikiforova et al., 2004).	22
Abbildung 8: Oxidation der Aminosäuren (A) Methionin zu Methioninsulfon und (B) Cystein zu Cysteinsäure.....	33
Abbildung 9: RP-HPLC der Prolamine von (A) Weizen (Sorte „Kolibri“), (B) Roggen (Sortenmischung), (C) Gerste (Sorte „Aura“) und (D) Hafer (Sorte „Alfred“) (Wieser und Belitz, 1989).....	38
Abbildung 10: Durchschnittliche Anzahl der Samen pro Topf bei S-Steigerung und Hülsen pro Topf bei S-Steigerung (Schwefelstufen 0, 6, 20, 70, 160 und 350 mg Schwefel pro Topf). Die Mittelwerte von jeweils vier Wiederholungen (\pm SD) weisen keine signifikanten Unterschiede bei $p < 0.05$ gemäß Tukey's Studentized Range (HSD) Test auf.....	43
Abbildung 11: Durchschnittliche Trockenmasse (TM) der Samen pro Topf bei jeweiliger Schwefelstufe. Die Mittelwerte von jeweils vier Wiederholungen (\pm SD) weisen keine signifikanten Unterschiede bei $p < 0.05$ gemäß Tukey's Studentized Range (HSD) Test auf.....	44
Abbildung 12: SPAD-Werte des jüngsten vollentwickelten Blattes in der Zeit der frühen Blüte. Die Mittelwerte von jeweils vier Wiederholungen (\pm SD) mit demselben Buchstaben weisen keine signifikanten Unterschiede bei $p < 0.05$ gemäß Tukey's Studentized Range (HSD) Test auf.....	45
Abbildung 13: A) links eine Sojapflanze, die keinen Schwefel (0 mg Schwefel pro Topf) erhalten hat, rechts eine Sojapflanze mit ausreichender S-Versorgung (160 mg Schwefel pro Topf). B) links im Bild Sojablätter einer Pflanze mit ausreichender Schwefelversorgung (160 mg Schwefel pro Topf), rechts eine Schwefelmangelvariante (0 mg Schwefel pro Topf), mit Zollstock als Maßstab.	45

Abbildung 14: Kritische Nährstoffkonzentration im Sojablatt. Abgeleitet aus Samen-Ertrag und Schwefelkonzentration im Blatt.....	46
Abbildung 15: Kritische Nährstoffkonzentration im Sojasamen. Abgeleitet aus Samen-Ertrag und Schwefelkonzentration im Samen.	47
Abbildung 16: Durchschnittliche Anzahl der Erbsensamen pro Topf bei S-Steigerung und Hülsen pro Topf bei S-Steigerung (Schwefelstufen 0, 6, 20, 70, 160 und 350 mg Schwefel pro Topf). Die Mittelwerte von jeweils vier Wiederholungen (\pm SD) weisen keine signifikanten Unterschiede bei $p < 0.05$ gemäß Tukey's Studentized Range (HSD) Test auf.....	48
Abbildung 17: Durchschnittliches Gewicht der Erbsensamen pro Topf bei jeweiliger Schwefelstufe. Die Mittelwerte von jeweils vier Wiederholungen (\pm SD) weisen keine signifikanten Unterschiede bei $p < 0.05$ gemäß Tukey's Studentized Range (HSD) Test auf.....	49
Abbildung 18: Sojaprotein-Chromatogramm der Grom Saphir C ₁₈ (5 μ m, 250 \times 4 mm, 300 Å). Die Trenneigenschaften bei der Retentionszeit ab 26 Minuten (hoher organischer Anteil im Fließmittel) sind im Gegensatz zu den anderen Trennsäulen verbessert.	50
Abbildung 19: Sojaprotein-Chromatogramm der Nucleosil C ₁₈ (5 μ m, 250 \times 4 mm, 300 Å). Man erkennt deutlich, dass die hydrophoberen Proteine, die ab 26 Minuten retardieren fast keine Trennung aufweisen.	51
Abbildung 20: Sojaprotein-Chromatogramm der Vydac C ₁₈ (10 μ m, 250 \times 4 mm, 300 Å). Aufgrund der Partikelgröße von 10 μ m kann man hier eine Peakverbreiterung erkennen, die auf eine erhöhte Diffusion des Analyten in der mobilen Phase zurückzuführen ist.	51
Abbildung 21: Vergleich der Peakform von Peaks identischer Proteinfraction (aber unterschiedlicher Retentionszeit). RT = Retentionszeit.....	52
Abbildung 22: Chromatogramm der Soja-Globuline. Bei dem nach etwa 8 Minuten detektierten Peak handelt es sich um ein β -Conglycinin-Fragment, während ab 26 Minuten hauptsächlich Glycinin-Komponenten eluieren.	53
Abbildung 23: Chromatogramm eines Gesamtprotein-Extrakts aus Sojabohnen. Die Peaks zwischen 15 Minuten und 26 Minuten können der Albumin-Fraktion zugeordnet werden.	54
Abbildung 24: Oben: Gleiches Chromatogramm wie in Abbildung 20. Der eingerahmte Bereich markiert die Peaks, die einzeln fraktioniert wurden. Unten: Ausschnitt aus dem Chromatogramm (Retentionszeit: 26-35 Minuten). Zu erkennen sind Globulin-Peaks bestehend aus Glycinin- und β -Conglycinin-Einheiten.	55
Abbildung 25: Elektropherogramm der RP-HPLC-Fractionen. Man kann in allen Fractionen Proteinbanden gleichen Molekulgewichts erkennen. Die Zahlen am rechten Rand bezeichnen die Molekulgewichte in kilo-Dalton (kDa).	56
Abbildung 26: Methionin- und Cystein-Gehalt der Albumin-Fraktion von Sojabohnen aus drei Schwefelstufen. Der Aminosäure-Gehalt (AS-Gehalt) ist in μ mol g ⁻¹ Trockenmasse (TM) angegeben. Die Mittelwerte von jeweils vier Wiederholungen (\pm SD) mit demselben Buchstaben in einer Reihe weisen keine signifikanten Unterschiede bei $p < 0.05$ gemäß Tukey's Studentized Range (HSD) Test auf.	58
Abbildung 27: Methionin- und Cystein-Gehalt der Globulin-Fraktion von Sojabohnen aus drei Schwefelstufen. Der Aminosäure-Gehalt (AS-Gehalt) ist in μ mol g ⁻¹ Trockenmasse (TM) angegeben. Die Mittelwerte von jeweils vier Wiederholungen (\pm SD) mit demselben Buchstaben in einer Reihe weisen keine signifikanten Unterschiede bei $p < 0.05$ gemäß Tukey's Studentized Range (HSD) Test auf.	58
Abbildung 28: Methionin- und Cystein-Gehalt (AS-Gehalt) in μ mol g ⁻¹ TM der ganzen Sojasamen aus allen Schwefelstufen (0, 6, 20, 70, 160 und 350 mg Schwefel pro Topf). Die Mittelwerte von jeweils vier Wiederholungen (\pm SD) mit demselben Buchstaben in einer Reihe weisen keine signifikanten	

Unterschiede bei $p < 0.05$ gemäß Tukey's Studentized Range (HSD) Test auf.....	59
Abbildung 29: Trypsin-Inhibitor-Aktivität (TIA) von Sojabohnen in mg gehemmtm Trypsins pro g Probe aller Schwefelstufen (0, 6, 20, 70, 160 und 350 mg Schwefel pro Topf). Die Mittelwerte von jeweils vier Wiederholungen (\pm SD) mit demselben Buchstaben weisen keine signifikanten Unterschiede bei $p < 0.05$ gemäß Tukey's Studentized Range (HSD) Test auf.....	60
Abbildung 30: Menge des Trypsin-Inhibitors in mg pro g TM im Sojabohnensamen der jeweiligen Schwefelstufen. Die Mittelwerte von jeweils vier Wiederholungen (\pm SD) mit demselben Buchstaben weisen keine signifikanten Unterschiede bei $p < 0.05$ gemäß Tukey's Studentized Range (HSD) Test auf.....	61
Abbildung 31: Menge des Inhibitors in mg g^{-1} und TIA ($\text{mg gehemmtes Trypsin pro g Probe}$). Mittelwerte von jeweils vier Wiederholungen (\pm SD). Logarithmische Regression.	62
Abbildung 32: Trypsin-Inhibitor-Aktivität (TIA) von Erbsen in mg gehemmtm Trypsin pro g Probe aller Schwefelstufen (0, 6, 20, 70, 160 und 350 mg Schwefel pro Topf). Die Mittelwerte von jeweils vier Wiederholungen (\pm SD) mit demselben Buchstaben weisen keine signifikanten Unterschiede bei $p < 0.05$ gemäß Tukey's Studentized Range (HSD) Test auf.....	63
Abbildung 33: TIA-Bestimmung in Nahen Isogenen Erbsenlinien (NIL) mit den Bezeichnungen LA5, LC8, HA5 und HC8. Die linke Säule beschreibt jeweils die TIA bei Erbsen, die in schwefelreichem Substrat angebaut wurden, die rechte Säule jeweils die TIA bei Erbsen, die in schwefelarmem Substrat angebaut wurden. Die Mittelwerte von jeweils vier Wiederholungen (\pm SD) mit demselben Buchstaben weisen keine signifikanten Unterschiede bei $p < 0.05$ gemäß Bonferoni-Prozedur auf.....	64
Abbildung 34: Sojabohnen: Gesamtschwefel in g kg^{-1} TM im Diagramm dargestellt mit großen schraffierten Balken, Sulfatschwefel in mg kg^{-1} TM als schmale Balken davor. Die Mittelwerte von jeweils vier Wiederholungen (\pm SD) mit demselben Buchstaben in einer Reihe weisen keine signifikanten Unterschiede bei $p < 0.05$ gemäß Tukey's Studentized Range (HSD) Test auf.....	65
Abbildung 35: Gehalt an Gesamtstickstoff in g kg^{-1} TM in den Samen von Soja nach Schwefelsteigerung. Die Mittelwerte von jeweils vier Wiederholungen (\pm SD) mit demselben Buchstaben weisen keine signifikanten Unterschiede bei $p < 0.05$ gemäß Tukey's Studentized Range (HSD) Test auf.....	66
Abbildung 36: Erbsen: Gesamtschwefel in g kg^{-1} TM im Diagramm dargestellt mit großen schraffierten Balken, Sulfatschwefel in mg kg^{-1} TM als schmale Balken davor. Die Mittelwerte von jeweils vier Wiederholungen (\pm SD) mit demselben Buchstaben in einer Reihe weisen keine signifikanten Unterschiede bei $p < 0.05$ gemäß Tukey's Studentized Range (HSD) Test auf.....	67
Abbildung 37: Gehalt an Gesamtstickstoff in g kg^{-1} TM in den Samen von Erbsen nach Schwefelsteigerung. Die Mittelwerte von jeweils vier Wiederholungen (\pm SD) mit demselben Buchstaben weisen keine signifikanten Unterschiede bei $p < 0.05$ gemäß Tukey's Studentized Range (HSD) Test auf.....	68
Abbildung 38: Gesamt-S in g kg^{-1} TM in Nahen Isogenen Erbsenlinien (NIL) mit den Bezeichnungen LA5, LC8, HA5 und HC8. Die Mittelwerte von jeweils vier Wiederholungen (\pm SD) mit demselben Buchstaben weisen keine signifikanten Unterschiede bei $p < 0.05$ gemäß Bonferoni-Prozedur auf.....	69
Abbildung 39: Sulfatschwefelgehalt in mg kg^{-1} bei NIL-Erbsen. Die Mittelwerte von jeweils vier Wiederholungen (\pm SD) mit demselben Buchstaben weisen keine signifikanten Unterschiede bei $p < 0.05$ gemäß Bonferoni-Prozedur auf.....	69

Abbildung 40: Gehalt an Gesamtstickstoff in mg kg^{-1} TM in den Samen von NIL-Erbсен.
Die Mittelwerte von jeweils vier Wiederholungen (\pm SD) mit demselben
Buchstaben weisen keine signifikanten Unterschiede bei $p < 0.05$ gemäÙ
Bonferoni-Prozedur auf. 70

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zusammensetzung des Soja-Proteins (nach www.protinov.com).....	14
Tabelle 2: Zusammensetzung der Speicherglobulinstruktur einiger Sojabohnensorten und einer Fababohnensorte in $\text{g} \times (100 \text{ g TM})^{-1}$ (nach El-Shemy et al., 2000)	15
Tabelle 3: Schwefelgehalt in den Pflanztöpfen.....	27
Tabelle 4: Nährstoffzusammensetzung für alle Versuchsglieder.....	28
Tabelle 5: Puffersystem für die Aminosäure-Chromatographie	36
Tabelle 6: Trennsäulenvergleich.	52
Tabelle 7: Methionin- und Cystein-Verhältnisse (Cys/Met) der Albumin- bzw. Globulin-Fraktion von Sojabohnen aus drei Schwefelstufen. Alb= Albumin; Glob= Globulin. Schwefelgehalt pro Topf: 0, 70, 350 mg.	57

Literatur

Abel HJ (1996): Potentiale und Perspektiven des Körnerleguminosenanbaus in Deutschland. Union zur Förderung von Oel- und Proteinpflanzen e.V.. Heft 3.

Ahmad A., Abdin M.Z. (1999): NADH-nitrate reductase and NAD(P)H: nitrate reductase activities in mustard seedlings. *Plant Science* 143, 1-8.

Ahmad A., Abdin M.Z. (2000): Photosynthesis and its related physiological variables in the leaves of *Brassica* genotypes as influenced by sulphur fertilization. *Physiologia Plantarum* 110, 144-149.

Ahmad A., Abraham G., Abdin M.Z. (1999): Physiological investigation on the impact of nitrogen and sulfur application on seed and oil yield of rapeseed (*Brassica campestris* L.) and mustard (*Brassicajuncea* [L.] Czern. und Coss.) genotypes. *Journal of Agronomy and Crop Science* 183, 19-25.

Aragao F.J.L., Barros L.M.G., Sousa M.V. de, Sa M.F.G. de, Almeida E.R.P., Gander E.S., Rech E.L. (1999): Expression of a methionine-rich storage albumin from Brazil nut (*Bertholletia excelsa* H.B.K., *Lecythidaceae*) in transgenic bean plants (*Phaseolis vulgaris* L., *Fabaceae*). *Genetics and Molecular Biology* 22, 445-449.

Anderson J.W. (1990): Sulphur metabolism in plants. In: Mifflin B.J., Lea P.J. (Hrsg.) *The Biochemistry of Plants*. Vol. 16, Academic Press, New York. 327-381.

Aumaitre A., Peiniau J., Bengala Feire J., Seve B. (1992): Sensitivity of the weaned piglet of pea antinutritional factors effect of technological treatments. *Proceedings of the 1st European Conference on Grain Legumes*, Angers, France, 487-488.

Azzouz H., Cherqui A., Campman E.D., Rahbe Y., Duport G., Jouanin L., Kaiser L., Giordanengo P. (2005): Effects of plant protease inhibitors, oryzacystatin I and soybean Bowman-Birk inhibitor, on the aphid *Macrosiphum euphorbiae* (Homoptera, Aphididae) and its parasitoid *Aphelinus abdominalis* (Hymenoptera, Aphelinidae). *J. Insect Physiol.* 51, 75-86. In: MEROPS <http://merops.sanger.ac.uk/>

Bengala Freire J., Hulin J.C., Peiniau J., Aumaitre A. (1989) : Effect de la cuisson extrusion du pois de printemps sur la digestibilité des aliments de sevrage précoce du porcelet et conséquences sur les performances jusqu'à l'abattage. *Journ. Rech. Porcine France* 12, 215-226.

Bergmann W. (1976): *Pflanzen diagnose und Pflanzenanalyse zur Ermittlung von Ernährungsstörungen und des Ernährungszustandes der Kulturpflanzen*. Jena, Fischer-Verlag.

Belitz H.-D., Grosch W., Schieberle A. (2001): *Lehrbuch der Lebensmittelchemie*. 5. Aufl. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York.

Bech-Andersen S., Mason V., Dhanoa M. (1990): Hydrolysate preparation for amino acid determinations in feed constituents. *J. anim. Physiol. Anim. Nutr.* 63, 188-197.

Biesalski, H.K., Grimm, P., *Taschenatlas der Ernährung*, Georg Thieme Verlag Stuttgart, 1999.

Birk Y. (1985): The Bowman-Birk inhibitor. Trypsin and chymotrypsin inhibitor from soybeans. *Int. J. Pept. Protein Res.* 25, 113-131.

Bietz J.A. (1983): Separation of cereal proteins by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 255, 219-238.

- Bietz J.A. (1986): High performance liquid chromatography of cereal proteins. In: Advances in Cereal Science and Technology 8, 105-170, Pomeranz Y., ed. AACC, St. Paul, MN.
- Blagrove R.J., Gillespie J.M., Randall P.J. (1976): Effect of sulphur supply on the seed globulin composition of *Lupinus augustifolius*. Aust. J. Plant Physiol. 3, 173-184.
- Blake-Kalff M.M.A., Hawkesford F.J., Zhao F.J., McGrath S.P. (2000): Diagnosing sulfur deficiency in field-grown oilseed rape (*Brassica napus* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.). Plant and Soil 225, 95-107.
- Bowman D.E. (1946): Differentiation of soybean antitrypsin factors. Proceedings of the Society of Experimental Biology and Medicine 63, 547-550. In: Seed Proteins, 25, 587-615, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht 1999.
- Böhme H. (1988): Untersuchungen über die Eignung von Ackerbohnen (*Vicia faba*), Felderbse (*Pisum sativum*) und Süßlupinen (*Lupinus luteus*) als Eiweißfuttermittel in der Ferkelaufzucht. Landbauforschung Völkenrode 38, 353-358.
- Bradshaw T. (2000): A User's Guide: Introduction to Peptide and Protein HPLC (Volume 1). Phenomenex.
- Bruton C. (1986): Fully automated amino acid analysis using pre-column derivatization. Int. Lab. 1986, June, 30-38.
- Buchner P., Takahashi H., Hawkesford M.J. (2004): Plant sulphate transporters: co-ordination of uptake, intracellular and long-distance transport. Journal of Experimental Botany 55, No. 404, 1765-1773.
- Buehler R.E., Vantoai T.T., McDonald JR M.B. (1988): The optimisation of elution and extraction conditions for the separation of soybean seed proteins using RP-HPLC. Seed Sci. & Technol., 17, 193-204.
- Buehler R.E., McDonald JR M.B., Vantoai T.T., St. Martin S.K. (1989): Soybean cultivar identification using high performance liquid chromatography of seed proteins. Crop Sci. 29, 32-37.
- Buehler R.E., Vantoai T.T., McDonald JR M.B. (1989): The optimization of elution and extraction conditions for the separation of soybean seed proteins using RP-HPLC. Seed Sci. Technol. 17, 193-204.
- Burke J.J., Holloway P., Dalling M.J. (1986): The effect of sulfur deficiency on the organization and the photosynthetic capability of wheat leaves. J. Plant Physiol. 125, 371-375.
- Casey R., Domoney C., Ellis N. (1986): Legume storage proteins and their genes. Oxford Surveys of Plant Molecular and Cell Biology 3, 1-95. In: Seed Proteins, 8, 159-169, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht 1999.
- Chandler P.M., Spencer D., Randall P.J., Higgins T.J.V. (1984): Influence of sulfur nutrition on development of some major pea seed proteins and their mRNAs. Plant Physiol. 75, 651-657.
- Cheftel, J.C., Cuq, J.L., Lorient, D.: Lebensmittelproteine: Biochemie, funktionelle Eigenschaften, Ernährungsphysiologie, chemische Modifizierung. 1. Auflage, Behrs Verlag Hamburg, 1992.
- Clarke E.J., Wiesman J. (2000): Developments in plant breeding for improved nutritional quality of soybeans I. Protein and amino acid content. Journal of Agricultural Science, Cambridge 134, 111-124.

Clemente A., Gee J.M., Johnson I.T., Mackenzie D.A., Domoney C. (2005): Pea (*Pisum sativum* L.) Protease Inhibitors from the Bowman-Birk Class Influence the Growth of Human Colorectal Adenocarcinoma HT29 Cells *in Vitro*. J Agric. Food Chem. 53, 8979-8986.

Coates J.B., Medeiros J.S., Than V.H., Nielsen N.C. (1985): Characterization of the subunits of β -conglycinin. Arch. Biochem. Biophys., 243, 184-194.

Cooper A.J.L., Hanson A.D. (1998): Advances in enzymology of the biochemical sulfur cycle. Chemtracts-Biochem. Mol. Biol. 11, 729-747.

Daniellson C.E. (1949): Seed globulins of the *graminae* and *leguminosae*. Biochemical Journal 44, 387-400. In: Seed Proteins, 9, 171-208, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht 1999

Darmoul D., Gratio V., Devaud H., Lehy T., Laburthe M. (2003): Aberrant expression and activation of the thrombin receptor protease-activated receptor-1 induces cell proliferation and motility in human colon cancer cells. Am. J. Pathol. 162, 1503-1513. In Clemente *et al.* (2005), J Agric. Food Chem. 53, 8979-8986.

Derbyshire E., Wright D.J., Boulter D. (1976): Legumin and vicilin, Storage proteins of legume seeds. Phytochem. 15, 3-24.

Dietz K.J. (1989): Recovery of spinach leaves from sulfate and phosphate deficiency. J. Plant Physiol. 134, 551-557.

Dijkshoorn W., van Wijk A.L. (1967): The sulphur requirement of plants as evidenced by sulphur-nitrogen ratio in the organic matter. A review of published data. Plant Soil 26, 129-157.

Duncan M, Poljak A. (1988): Amino acid analysis of peptides and proteins on the femtomole scale by gas chromatography/mass spectrometry. Anal. Chem. 70, 890 896.

EC (1998): Establishing Community methods of analysis for the determination of amino-acids, crude oils and fats, and olaquinox in feedingstuffs, and amending Directive 71/393/EEC. Commission Directive 98/64/EC, Off. J. Eur. Communities L257, 19.09.98, 14-23.

Edelbauer A. (1980): Auswirkung von abgestuften Schwefelmangel auf Wachstum, Substanzbildung und Mineralstoffgehalt von Tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) in Nährlösungskultur. Die Bodenkultur 31, 229-241.

Elsheikh E.A.E., El-Tinay A.H., Fadul I.A. (1999): Effect of nutritional status of faba bean on proximate composition, anti-nutritional factors and *in vitro* protein digestibility (IVPD). Food Chemistry 67, 379-383.

El-Shemy H.A., Yamana H., Saneoka H., Fujita K. (2000): Phylogenetic comparative analysis of storage protein structure in legume seeds. Application Note. Faculty of Applied Biological Science. Hiroshima University.

Energy and Protein Requirements, Report of the Joint FAO/WHO/UNU Expert Consultation. Technical Report Series No. 724, 1985.

Ergle D.R., Eaton F.M. (1951): Sulfur nutrition of cotton. Plant Physiol. 26, 639-654.

Fahey J.W., Zhang Y.S., Talalay P. (1997): Broccoli sprouts: an exceptionally rich source of inducers of enzymes that protect against chemical carcinogens. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 10367-10372.

FDA. Food labeling; general provisions; nutrition labeling; label format; nutrient content claims; health claims; ingredient labeling; state and local requirements; and exemptions; final rules. Food and Drug Administration, Fed Reg 1993; 58 (3):2101-2106.

Flinn A.M., Pate J.S. (1968): Biochemical and physiological changes during maturation of fruit of the field pea (*Pisum arvense* L.). Ann. Bot. 32, 479-495.

Fontes E.P.B., Moreira M.A., Davies C.S., Nielsen N.C. (1984): Urea-elicited changes in relative electrophoretic mobility of certain glycinin and β -conglycinin subunits. Plant Physiol. 76, 840-842.

Franzke C. (1990): Lehrbuch der Lebensmittelchemie. Akademie-Verlag Berlin.

Frauen M. (1989): Entwicklung von frühreifen Ackerbohnenlinien unter besonderer Berücksichtigung der Botrytis-Resistenz. Schriftenreihe des Bundesministers für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten. Reihe A, Angewandte Wissenschaft 367, 301-302.

Frenay J.R., Spencer K., Jones M.B. (1978). The diagnosis of sulphur deficiency in wheat. Aust. J. Agric. Res. 29, 727-738.

Fürst P., Pollack L., Graser T., Godel H., Stehle P. (1990): Appraisal of four pre-column derivatization methods for the high-performance liquid chromatographic determination of free amino acids in biological materials. J. Chromatogr. 499, 557-569.

Fukushima D (1991): Structures of plant storage proteins and their function. Food Reviews International 7(3), 353-381.

Furtini-Neto A.E., Fernandes L.A., Faquin V., Silva I.R., Accloly A.M., da Silva I.R. (2000): Response of bean cultivars to sulfur. Pesquisa-Agropecuaria-Brasileira 35, 567-573.

Gatel F. (1994): Protein quality of legume seeds for non-ruminant animals: a literature review. Anim. Feed Sci. Technol. 45, 317-348.

Gatel F., Grosjean F. (1990): Composition and nutritive value of peas for pigs: a review of european results. Livestock Prod. Sci. 26, 155-175.

Gaylor G.C., Sykes G.E. (1985): Effects of nutritional stress on storage proteins of soybeans. Plant Physiol. 78, 582-585.

Giami S.Y., Chibor B.S., Edebiri K.E., Achinewhu S.C. (1999): Changes in nitrogenous and other chemical constituents, protein fractions and *in vitro* protein digestibility of germinated fluted pumpkin (*Telfairia occidentalis* Hook) seed. Plant Foods for Human Nutrition 53, 333-342.

Gilbert M.A., Robson A.D. (1984): the effect of sulfur supply on the root characteristics of subterranean clover and annual ryegrass. Plant Soil 77, 377-380.

Girke T., Todd J., Ruuska S., White J., Benning C., Ohlrogge J. (2000): Microarray analysis of developing *Arabidopsis* seeds. Plant Physiol. 124, 1570-1581.

Hajduch M, Ganapathy A., Stein J.W., Thelen J.J. (2005): A Systematic Proteomic Study of Seed Filling in Soybean. Establishment of High-Resolution Two-Dimensional Reference Maps, Expression Profiles, and an Interactive Proteome Database. Plant Physiology 137, 1397-1419.

Haynes P., Sheumack D., Greig L., Kibby J., Redmond J.(1991): Applications of automated amino acid analysis using 9-fluorenylmethylchloroformate. J. Chromatogr. 588, 107-114.

Herschbach C. (2002): Whole plant regulation of sulfur nutrition of deciduous trees – influences of the environment. *Plant Biol.*, 5, 233-244.

Hesse H., Kreft O., Maimann S., Zeh M., Hoefgen R. (2004): Current understanding of the regulation of methionine biosynthesis in plants. *J. Exp. Bot.* 55, No. 404, 1799-1808.

Holowach L.P., Thompson J.F., Madison J.T. (1984a): Effects of exogenous methionine on storage protein composition of soybean cotyledons cultured *in vitro*. *Plant Physiol.* 74, 576-583.

Holowach L.P., Thompson J.F., Madison J.T. (1984b): Storage protein composition of soybean cotyledons grown *in vitro* in media of various sulfate concentrations in the presence and absence of exogenous L-methionine. *Plant Physiol.* 74, 584-589.

Holowach L.P., Madison J.T., Thompson J.F. (1986): Studies on the mechanism of regulation of the mRNA level for a soybean storage protein subunit by exogenous L-methionine. *Plant Physiol.* 80, 561-567.

Horwitz W. (1970): *Official Methods of Analysis for the AOAC*. Washington D.C., Eleventh Edition.

Hughes S.A., Murphy P.A. (1983): Varietal influence on the quantity of glycinin in soybeans. *J. Agric. Food Chem.* 31, 376-387.

Inglis A.S., Liu T.Y. (1970): The stability of cysteine and cystine during acid hydrolysis of proteins and peptides. *J. Biological Chemistry*, 1, 112–116.

Imsande J., Schmidt J.M. (1998): Effect of N source during soybean pod filling on nitrogen and sulfur assimilation and remobilization. *Plant soil*, 202, 41-47.

Jansman A.J.M. (1996): Bioavailability of proteins in legume seeds. *Grain Legumes (AEP)* 11, 19.

Jondreville C., Peyronnet C., Grosjean F. (1992): Effect of variety on the digestibility of pea components in pigs: influence of trypsin inhibiting activity. *Proceedings of the 1st European Conference on Grain Legumes*, Angers, France, 485-486.

Kakade M.L., Hoffa D.E., Liener I.E. (1973): Contribution of trypsin inhibitors to the deleterious effects of unheated soybeans fed to rats. *J. Nutr.* 103, 1772-1778.

Kakade M.L., Rackis J.J., McGhee J.E., Puski G. (1974): Determination of trypsin inhibitor activity of soy products: A collaborative analysis of an improved procedure. *Cereal chemistry*, 51, 376-382.

Kapoor A.C., Gupta Y.P. (1977): Changes in proteins and amino acids in developing soybean seed and effects of phosphorus nutrition. *J. Sci. Food Agric.* 28, 113-120.

Karmoker J.L., Clarkson D.L., Saker L.R., Rooney J.M., Purves J.V. (1991): Sulphate deprivation depresses the transport of nitrogen to the xylem and the hydraulic conductivity of barley (*Hordeum vulgare* L.) roots. *Planta* 185, 269-278.

Kennedy A.R. (1998): Chemopreventive agents: Protease inhibitors. *Pharmacol. Ther.* 78, 167-209. In: Clemente *et al.*, *J. Agric. Food Chem.* 53, 8979-8986.

Kim H., Hirai M.Y., Hayashi H., Chino M., Naito S., Fujiwara T. (1999): Role of O-acetyl-L-serine in the coordinated regulation of the expression of a soybean seed storage-protein gene by sulfur and nitrogen nutrition. *Planta* 209, 282-289.

Kneen E., Sandstedt R.M. (1943): An amylase inhibitor from certain cereals. *J. American Chemical Society* 65, 1247. In: *Seed Proteins*, 25, 587-615, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht 1999.

- Kunitz M. (1945): Crystallization of trypsin inhibitor from soybean. *Science* 101, 668-669. In: *Seed Proteins*, 25, 587-615, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht 1999.
- Laemmli U.K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lambert N., Plumb G.W., Wright D.J. (1987): Application of high-performance liquid chromatography to the assessment of subunit heterogeneity in plant 11S storage globulins. *J. Chromatography*, 402, 159-172.
- Lambert N, Yarwood J.N. (1992): Engineering legume seed storage proteins. In: Shewry P.R., Guteridge S., *Plant protein engineering* (pp. 167-187). London, UK: Cambridge University Press.
- Laskowski M.J., Kato I. (1980): Protein inhibitors of proteinases. *Annu. Rev. Biochem.* 49, 593-626. In: MEROPS <http://merops.sanger.ac.uk/famcards/summary/i12.htm>
- Lappartient A.G., Vidmar J.J., Leustek T., Glass A.M.D., Touraine B. (1999): Inter-organ signaling in plants: regulation of ATP sulfurylase and sulfate transporter genes expression in roots mediated by phloem-translocated compounds. *Plant J.* 18, 89-95.
- Lappartient A.G., Touraine B. (1997): Glutathione-mediated regulation of ATP sulphurylase activity, SO_4^{2-} uptake, and oxidative stress response in intact canola roots. *Plant Physiology* 114, 177-183.
- Lee S.L., Dickson R.B., Lin C.Y. (2000): Activation of hepatocyte growth factor and urokinase/plasminogen activator by matriptase, an epithelial membrane serine protease. *J. Biol. Chem.* 275, 36720-36725.
- Lee S., Leustek T. (1999): The effect of cadmium on sulfate assimilation enzymes in *Brassica juncea*. *Plant Sci.* 141, 201-207.
- Leustek T., Saito K. (1999): Sulfate Transport and Assimilation in Plants. *Plant Physiology* 120, 637-643.
- Louis S., Delobel B., Gressent F., Rahioui I., Quillian L., Vallier A., Rahbé Y. (2004) : Molecular and biological screening for insect-toxic seed albumins from four legume species. *Plant Science* 167, 705-714.
- Macnicol P.K. (1983): Developmental Changes in the Free Amino acid Pool and Total Protein Amino Acids of Pea Cotyledons (*Pisum sativum* L.), *Plant Physiol.* 72, 492-497.
- Marcone M.F. (1999): Biochemical and biophysical properties of plant storage proteins: a current understanding with emphasis on 11S globulins. *Food Research Int.* 32, 79-92.
- Maier H.G. (1990): *Lebensmittel- und Umweltanalytik*. Steinkopff Verlag Darmstadt.
- Maruyama N, Adachi M., Takahashi K., Yagasaki K., Kohno M., Takenaka Y., Okuda E., Nakagawa S., Mikami B., Utsumi S. (2001): Crystal structures of recombinant and native soybean β -conglycinin β homotrimer. *Eur. J. Biochem.* 268, 3595-3604.
- McGrath S.P., Zhao F.J., Withers P.J.A. (1996): Development of sulfur deficiency in crops and its treatment. *Proceedings of the Fertilizer Society*, No.379, The Fertilizer society, Petersborough.
- McKee H.S., Nestel L., Robertson R.N. (1955): Physiology of pea fruits. II. Soluble nitrogenous constituents in the developing fruit. *Aust. J. Biol. Sci.* 8, 467-475.

- Meinke D.W., Chen J., Beachy R.N. (1981): Expression of storage protein genes during soybean seed development. *Planta*, 153, 130-139.
- Miziorko H.M., Lorimer G.M. (1988): Ribulose-1,5-bisphosphat carboxylase/oxygenase. *Annual Review of Biochemistry* 52, 507-535.
- Moore S., Stein W. (1951): Aminoacid determination, methods and techniques. *J. Biol. Chem.* 192, 663-670.
- Moss H.J., Wrigley C.W., MacRichie R., Randall P.J. (1981): Sulphur and nitrogen fertilizer effects on wheat. II. Influence on grain quality. *Australian J. Agric. Res.* 32, 213-226.
- Moss H.J., Randall P.J., Wrigley C.W. (1983): Alteration to grain, flour and dough quality in three wheat types with variation in soil sulfur supply. *Journal of Cereal Science* 1, 255-264.
- Müntz K., Christoph V., Jung R., Saalbach G., Waddel D., Pickardt T., Schieder O. (1997): Genetic engineering of high methionine proteins in grain legumes. *Sulfur Metabolism in Higher Plants*. Pp. 71-86 Cram et al. (Hrsg.) Backhuys Publishers, Leiden, The Netherlands.
- Müntz K., Christoph V., Saalbach G., Saalbach I., Waddel D., Pickardt T., Schieder O., Wüstenhagen T. (1998): Genetic engineering for high methionine grain legumes. *Nahrung* 42, 125-127.
- Müntz K., Horstmann C., Schlesier B. (1999): *Vicia globulins*. In: *Seed Proteins*, 259-284, Kluwer Academic Publ., Dordrecht, Niederlande.
- Munshi S.K., Reena J. (2001): Effect of sulphur on nitrogen assimilation, carbohydrates in nodules as well as leaves and lipids in kernels of peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Journal of Plant Biology* 28, 189-198.
- Murphy P.A., Resurreccion A.P. (1984): Varietal and environmental differences in soybean glycinin and β -conglycinin content. *J. Agric. Food Chem.* 32, 911-915.
- Naito S., Inaba-Higano K., Kumagai T., Kanno T., Nambara E., Fujiwara T., Chino M., Komeda Y. (1994): Maternal effects of mto1 mutation, that causes over-accumulation of soluble methionine, on the expression of soybean β -conglycinin gene promoter-GUS fusion in transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.*, 35, 1057-1063.
- Nakano H., Makino A., Mae T. (1997): The effect of elevated partial pressures of CO₂ on the relationship between photosynthetic capacity and N content in rice leaves. *Plant Physiology (Rockville)* 115(1), 191-198.
- Nasathien S., Israel D.W., Wilson R.F., Kwanyuen P. (2000): Regulation of Seed Protein Concentration in Soybean by Supra-Optimal Nitrogen Supply. *Crop Science* 40, 1277-1284.
- Nikiforova V.J., Gakière B., Kempa S., Adamik M., Willmitzer L., Hesse H., Hoefgen R. (2004): Towards dissecting nutrient metabolism in plants: a systems biology case study on sulphur metabolism. *J. Experimental Botany* 55, 1861-1870.
- Norton G., Bliss F.A., Bressani R. (1985): Biochemical and nutritional attributes of grain legumes. In: Summerfield R.J., Robertson R.H.. *Grain Legumes Crops*. Collins, London. 73-114.
- Odani S., Ikenaka T. (1973): Studies on soybean trypsin inhibitors VIII. Disulfide bridges in soybean Bowman-Birk type inhibitors. *Journal of Biochemistry* 74, 697-715.
- Oomah B.D., Voldeng H., Fregeau-Reid J.A. (1992): Characterization of soybean proteins by HPLC. *Plant Foods for Human Nutrition (Dordrecht)*, 45(3), 251-263.

- Osborne T.B.(1924): The vegetable proteins. Monographs in Biochemistry, Longmans, Breen & Co., London.
- Osborne T.B., Campbell G.F. (1898): Proteids of the pea. Journal of the American Chemical Society 20, 348-362. In: Seed Proteins, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht 1999.
- Osborne T.B., Campbell G.F. (1898): Proteids of the soybean. Journal of the American Chemical Society 20, 348-362. In: Seed Proteins, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht 1999.
- Ou K., Wilkins M., Yan J., Gooley A., Fung Y., Sheumack D., Williams K. (1996): Improved high-performance liquid chromatography of amino acids derivatized with 9-fluorenylmethylchloroformate. J. Chromatogr. A 723, 219-225.
- Paek N.C., Imsande J., Shoemaker R.C., Shibles R. (1997): Nutritional control of soybean seed storage protein. Crop Science, 37, 498-503.
- Paek N.C., Sexton P.J., Naeve S.L., Shibles R. (2000): Differential accumulation of soybean seed storage protein subunits in response to sulfur and nitrogen nutritional sources. Plant Prod. Sci., 3, 268-274.
- Perez J.M., Bourdon D. (1992): Energy and protein value of peas for pigs: synthesis of french results. Proceedings of the 1st European Conference on Grain Legumes, Angers, France, 489-490.
- Pernollet J.C., Mossé J. (1983): Structure and location of legume and cereal seed storage proteins. In: Dassaunt J., Mossé J., Vaughan J., Seed proteins, 155-191. London, UK: Junk Publication.
- Peterson R.E., Wolf W.J. (1988): Scale-up from analytical to preparative reversed-phase-high-performance liquid chromatography of soybean glycinin. J. Chromatogr., 444, 263-268.
- Petterson D., Mackintosh J.B. (1994): The chemical composition of lupin seed grown in Australia. Proceedings of the 1st Austral. Lupin Techn. Symp., Perth, 39-48.
- Pusztai A., Croy R.R.D., Grant G., Stewart J.C. (1983): Seed lectins: distribution, location and biological role. In: Dassaunt J., Mossé J., Vaughan J., Seed proteins, 53-82. London, UK: Elsevier Science.
- Randall P.J., Thomson J.A., Schroeder H.E. (1979): Cotyledonary storage proteins in *Pisum sativum* IV. Effects of sulfur, phosphorus, potassium and magnesium deficiencies. Aust. J. Plant Physiol. 6, 11-24.
- Reuter D.J., Robinson J.B. (1988): Plant Analysis. An Interpretation Manual. Inhata Press, Melbourne, Sydney.
- Robson A.D., Osborne L.D., Snobball K., Simmons W.J. (1995): Assessing sulfur status in lupins and wheat. Aust. J. Exper. Agric. 35, 79-86.
- Ruuska S.S., Girke T., Benning C., Ohlrogge J.B. (2002): Contrapuntal networks of gene expression during *Arabidopsis* seed filling. Plant Cell 14, 1191-1206.
- Saalbach I., Pickardt T., Machemehl F., Saalbach G., Schieder O., Müntz K. (1992): Expression of the sulfur-rich brazil nut 2S albumin in transgenic *Vicia narbonensis* plants. 1st conference europeenne sur les proteagineux, Angers, 119-120.
- Saalbach I., Waddel D., Pickardt T., Heimbeck W., Fontane J., Horstmann C., Schieder O., Müntz K. (1995): Stable expression of the sulfur-rich 2S albumin gen in transgenic *Vicia narbonensis* increases the Methionine content of seeds. 2nd Conference on Grain Legumes 1995, Copenhagen pp.426.

- Saio K., Kamiya M., Watanabe T. (1969): Food processing characteristics of soybean 11S and 7S proteins. Part I. Effect of difference of protein components among soybean varieties on formation of tofu-gel. *Agric. Biol. Chem.* 33, 1301-1308.
- Sattelmacher B., Gerendás J. (2002): Verbesserung der Qualität pflanzlicher Produkte durch Optimierung der Nährstoffzufuhr. Vorträge zu Hochschultagung 2002 der Agrar- und Ernährungswissenschaftlichen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel. 75-83.
- Schnug E. (1991): sulfur nutritional status of european crops and consequences for agriculture. *Sulphur in Agriculture*, 15, 7-12.
- Scherer H.W., Lange A. (1996): N₂ fixation and growth of legumes as affected by sulphur fertilization. *Biol. Fertil. Soils* 23, 449-453.
- Schroeder (1984): Major albumins of *Pisum* cotyledons. *J. Sci. Food Agric.* 35, 191-198.
- Schwedt G. (1994): Chromatographische Trennmethoden. Wiley-VCH.
- Sebastiani F.L., Farrell L.B., Schuler M.A., Beachy R.N. (1990): Complete sequence of a cDNA of α subunit of β -conglycinin. *Plant Mol. Biol.* 15, 197-201.
- Sebastiani F.L., Farrell L.B., Vasquez M., Beachy R.N. (1991): Conserved amino acid sequences among plant proteins sorted to protein bodies and plant vacuoles. *Eur. J. Biochem.*, 199, 441-450.
- Seretti C., Schapaugh Jr W.T., Leffel R.C. (1994): Amino acid profile of seed protein soybean. *Crop Science*, 34, 207-209.
- Sexton P.J., Naeve S.L., Paek N.C., Shibles R. (1998): Sulfur availability, cotyledon N:S ratio and relative abundance of seed storage proteins of soybean. *Crop Sci.* 8, 983-986.
- Sharma S.B., Hancock K.R., Ealing P.M., White D.W.R. (1998): Expression of a sulfur-rich maize seed storage protein, delta-zein, in white clover (*Trifolium repens*) to improve forage quality. *Molecular-Breeding* 4, 5, 435-448.
- Shewry P.R., Casey R., (1999): *Seed Proteins*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Shewry P.R., Pandya (1999): The 2S albumin storage proteins. In: *Seed Proteins*, 563-586, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Shewry P.R., Naiser J.A., Tatham A.S. (1995): Seed storage proteins: structure and biosynthesis. *Plant Cell*, 7, 945-956.
- Shewry P.R., Tatham A.S. (1990): the prolamin storage proteins of cereal seeds: structure and evolution. *Biochemistry Journal* 267, 1-12.
- Simmaco M., de Biase D., Barra D., Bossa F. (1990): Automated amino acid analysis using precolumn derivatization with dansylchloride and reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 504, 129-138.
- Smith I. K., Lang A.L. (1987): Translocation of Sulfate in Soybean (*Glycine max* L. Merr). *Plant Physiol.* 86, 798-802.
- Smith C., Van Mengen W., Twaalfhoven L., Hitchcock C. (1980): Determination of trypsin inhibitor levels in foodstuff. *Journal of Science of Food and Agriculture*, 31, 341-350.
- Smith J. (1997): Developments in amino acid analysis using capillary electrophoresis. *Electrophoresis* 18, 2377-2392.

Souci S.W., Fachmann W., Kraut H. (1963-1979): Die Zusammensetzung der Lebensmittel, Wissenschaftliche Verlagsges., Stuttgart.

Spackman D.H., Stein W.H., Moore S. (1958): Chromatography of amino acids on sulfonated polystyrene resins. *Anal. Chem.*, 30, 1190.

Spencer D. (1984): The physiological role of storage proteins in seeds. *Philosophical Transactions of the Royal Society in London*, B304, 275-785.

Spencer K., Freney J.R. (1980): Assessing the sulfur status of field grown wheat by plant analysis. *Agronomy J.* 72, 469-472.

Spencer K., Jones M.B., Freney J.R. (1977): Diagnostic indices for S status of subterranean clover. *Austr. J. Agric. Res.* 28, 401-412.

Staswick P.E. (1988): Soybean Vegetative Storage Protein structure and Gene Expression. *Plant Physiol.* 87, 250-254.

Tabb L., Higgins T.J.V. (1998): Engineering plant protein composition for improved nutrition. *Trends Plant Science* 87, 250-254.

Tabb L., Hagan N., Higgins T.J.V. (2002): Plasticity of seed protein composition in response to nitrogen and sulfur availability. *Current Opinion in Plant Biology* 5, 212-217.

Tabb L.M., Droux M. (2001): Sulfur assimilation in developing lupin cotyledons could contribute significantly to the accumulation of organic sulfur reserves in the seed. *Plant Physiology* 126, 176-187.

Tabb L.M., Droux M. (2002): Limits to sulfur accumulation in transgenic lupin seeds expressing a foreign sulfur rich protein. *Plant Physiology* 128, 1137-1148.

Tabb L.M., Higgins C.M., McNabb W.C., Higgins T.J.V. (1993): Genetic engineering of grain and pasture legumes for improved nutritive value. *Genetica* 90, 2-3, 181-200.

Takahashi H., Yamazaki M., Sasakura N., Watanabe A., Leustek T., de Almeida-Engler J., Engler G., Van Montagu M., Saito K. (1997): Regulation of cysteine biosynthesis in higher plants: A sulfate transporter induced in sulfate-starved roots plays a central role in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 11, 102-107.

Than V.H., Shibasaki K. (1975): Isolation and characterization of the multiple 7S globulins of soybean proteins. *Plant Physiology* 56, 19-22. In: *Seed Proteins*, 13, 285-313, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht 1999.

Than V.H., Shibasaki K. (1976): Major proteins of soybean seeds. A straightforward fractionation and their characterization. *L. Agric. Food Chem.*, 24, 1117-1121.

Than V.H., Shibasaki K. (1978): Major proteins of soybean seeds. Subunit structure of β -conglycinin. *J. Agric. Food Chemistry* 26, 692-695. In: *Seed Proteins*, 13, 285-313, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht 1999.

Verzele M., Yang Y.B., Dewaele Ch., Berry Y. (1988): Gradient reversed-phase liquid chromatography of proteins on very short columns. Influence of particle size on peak dispersion. *Anal. Chem.* 60, 1329-1332.

Vioque J., Sanchez-Vioque R., Clemente A., Pedroche J., Bautista J., Millan F. (1999): Purification and partial characterization of chickpea 2S albumin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47, 1405-1409.

Wang T.L., Domoney C., Hedley C.L., Casey R., Grusak M.A. (2003): Can we improve the Nutritional Quality of Legume Seeds? *Plant Physiol.* 131, 886-891.

Wang X., Warkentin T.D., Briggs C.J., Oomah B.D., Campbell C.G., Woods Sheila (1998): Trypsin Inhibitor Activity in Field Pea (*Pisum sativum* L.) and Grass Pea (*Lathyrus sativus* L.). *J. Agric. Food Chem.* 46, 2620-2623.

Wathelet B. (1999): Nutritional analyses for proteins and amino acids in beans. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, 3 (4), 197-200.

Wieser H., Antes S., Seilmeier W. (1998): Quantitative determination of gluten protein types in wheat flour by reversed phase high-performance liquid chromatography. *Cereal Chemistry* 75, 644-650.

Wieser H., Seilmeier W. (1998): The influence of nitrogen fertilisation on quantities and proportions of different protein types in wheat flour. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 76, 49-55.

Wieser H., Belitz H.D. (1989): Amino acid composition of avenins separated by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Cereal Sci.* 9, 221-229.

Wiseman J., Al-Mazooqi W., Welham T., Domoney C. (2003): The apparent ileal digestibility, determined with young broilers, of amino acids in near-isogenic lines of peas (*Pisum sativum* L.) differing in trypsin inhibitor activity. *J. Sci. Food Agric.* 83, 644-651.

Wiseman J., Al-Mazooqi W., Hedley C., Wang T.L., Welham T., Domoney C. (2006): The effects of genetic variation at *r*, *rb* and *Tri* loci in *Pisum sativum* L. on apparent ileal digestibility of amino acids in young broilers. *J. Sci. Food Agric.* 86, 436-444.

Wolf W.J., Babcock G.E., Smith A.K. (1961): Ultracentrifugal differences in soybean protein composition. *Nature* 191, 1395-1396.

Yavelow J., Finley T.H., Kennedy A.R., Troll W. (1983): Bowman-Birk soybean protease inhibitor as an anticarcinogen. *Cancer Res.* 43, 2454-2459. In Clemente *et al.* (2005), *J. Agric. Food Chem.* 53, 8979-8986.

Zhao F.J., Salmon S.E., Withers P.J.A., Monaghan J.M., Evans E.J., Shewry P.R., McGrath S.P. (1999): Variation in the breadmaking quality and rheological properties of wheat in relation to sulphur nutrition under field conditions. *J. Cereal Science* 30, 19-31.

Zhao F.J., Hawkesford M.J., Warrilow A.G.S., McGrath S.P., Clarkson D.T. (1996): Responses of two wheat varieties to sulphur addition and diagnosis of sulphur deficiency. *Plant Soil* 181, 317-327.