

Manufacture, isolation and characterization of antibacterial peptides from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)

MSc (FH) Maleen Wald

1. Berichterstatterin: Prof. Dr. K. Schwarz

Aus den Nebenprodukten der Forellenzucht (inneren Organe) wurden antimikrobielle Peptide über eine enzymatische Hydrolyse mittels Forellenpepsin isoliert. Die erzeugten Hydrolysate wiesen eine antibakterielle Wirkung sowohl gegenüber gram-positiven als auch gram-negativen Bakterien auf. Es konnte aufgezeigt werden, dass der Hydrolysegrad die antibakterielle Wirksamkeit der Hydrolysate signifikant beeinflusste. Mit steigendem Hydrolysegrad konnte ein Anstieg der antibakteriellen Wirksamkeit (bis zu einer Hydrolysezeit von 150 min (Hydrolysegrad 25 %)) beobachtet werden. Je nach Bakterienart führte eine Peptidkonzentration von 47 mg/ml bis 2 mg/ml zu einer vollständigen Inhibierung des bakteriellen Wachstums (24 h $1-2 \times 10^6$ KBE/ml). Generell konnte eine höhere antibakterielle Wirksamkeit gegenüber Krankheitserregern der Fischzucht als gegenüber Lebensmittelverderbskeimen aufgezeigt werden. Für die Isolation der antibakteriellen Peptide aus dem Proteinhydrolysat wurde eine Kombination aus Ionen-Austauschchromatography und Gelfiltration angewandt. Die isolierten Peptide wiesen durchschnittlich eine 9-fach höhere antibakterielle Wirksamkeit verglichen zum Hydrolysat auf. Kationische Peptide mit einem Molekulargewicht < 1 kDa wiesen das breiteste antibakterielle Spektrum sowie den höchsten Gehalt an hydrophoben Aminosäuren (66 %) auf. Die antibakteriellen Peptide führten zu einer deutlichen Verlängerung der lag Phase des bakteriellen Wachstums.

Ein Nachteil der enzymatischen Hydrolyse liegt in den hohen Kosten der üblicherweise verwendeten mikrobiellen Enzyme. Die Verwendung der fischeigenen Protease Pepsin, welche derzeit keiner industriellen Nutzung unterliegt, würde daher zu einer deutlichen Kostenreduktion führen. Zur genauen Enzymcharakterisierung, welche die Voraussetzung für eine industrielle Anwendung darstellt, wurde die konventionelle Enzymisolationmethode (bestehend aus einer Ammoniumsulfat Fällung mit anschließenden Säulenchromatographien) angewandt. Drei Pepsinogenisolate (PG I-III) bestehend aus sieben Pepsinogen Isoformen konnten isoliert werden. Darüber hinaus wurde eine Isolationsmethode mit guter up-scaling Eigenschaft, hohen Enzymausbeuten und einem geringem Kosten- und Zeitaufwand entwickelt. Forellenpepsin wurde über eine wässrige 2-Phasen-Extraktion (20 % polyethylene glycol mit einem Molekulargewicht von 1500 und 20 % MgSO_4) mit anschließender Polyelektrolyt-Präzipitation mittels Pektin (2 % igen (w/v) Lösung) isoliert. Unter den sauren Milieubedingungen während der Präzipitation wurde Pepsinogen teilweise zu Pepsin umgewandelt.