
Name der Forschungsstelle(n)

IGF-Vorhaben-Nr. / GAG

Bewilligungszeitraum

Schlussbericht für den Zeitraum :

zu dem aus Haushaltsmitteln des BMWi über die



geförderten IGF-Forschungsvorhaben

Normalverfahren

Fördervariante ZUTECH

Forschungsthema :

Für ein ZUTECH-Vorhaben sind folgende zusätzliche Angaben zu machen:

Der fortgeschriebene Plan zum Ergebnistransfer in die Wirtschaft

ist beigefügt

liegt bereits vor

wird fristgerecht nachgereicht

Ort, Datum

Unterschrift der/des Projektleiter(s)

AIF- Abschlußbericht

Projekt 14550 N

Entwicklung eines Testsystems zur Bestimmung von
Proteinase A- Aktivitäten in Bier zur Kontrolle der
Bierschaumqualität

Zusammenfassung

Im Lipidtransferprotein (LTP1) sollten Spaltstellen für Proteinase A (PrA) identifiziert werden. Auf dieser Grundlage sollten fluoreszenzmarkierte Peptidsubstrate mit spezifischen PrA- Spaltsequenzen synthetisiert werden. Diese sollten dann weiter optimiert und getestet werden. Für die Reinigung von LTP1 aus Bier und Bierschaum konnte erfolgreich eine Reinigungsprozedur etabliert werden, die aus einer Ionenauschromatographie und Gelfiltration besteht. Da seit 2007 Sigma keine Proteinase A (PrA) mehr vertreibt, wurde auf eigene Kosten mit Versuchen zur Reinigung von PrA begonnen. Die ersten Reinigungsschritte der PrA-Reinigung, HIC und Gelfiltration, konnten erfolgreich etabliert werden. Die Optimierung der Reinigung von PrA mittels IEX wurde mit Proteinreinigungsexperten u.a. der Firma GE Healthcare diskutiert. Im Ergebnis der durchgeführten Versuche konnte keine zufriedenstellende Lösung gefunden werden. PrA wird stark an das verwendete IEX- Säulenmaterial gebunden und kann nur durch Verwendung von 2M NaOH oder 70% -igem Ethanol von der Säule eluiert werden.

Im Weiteren sollten PrA-Spaltstellen im LTP1-Molekül mittels Microarray identifiziert werden. Der Microarray brachte keine Ergebnisse. Für eine Wiederholung lag nicht ausreichend PrA vor. Aus den Ergebnissen des Protease-Substrat-Sets (PrSS) konnten anhand von Häufigkeits- und Motivanalyse Top-Substrate bestimmt werden. Weitere Test wurden dann mit drei Top-Substraten durchgeführt, die Homologien zur LTP1-Sequenz aufweisen. Außerdem wurde ein Substratsequenz getestet, die für den Nachweis saurer Proteasen bestimmt ist (Kondo- Substrat). Es wurden verschiedene Fluorophor/ Quencher- Paare getestet: Dabsyl/ EDANS- und MOCAC/ Dnp- System sowie ein von JPT entwickeltes perfektes Fluorophor/ Quencher- Paar (Coumaryl- Alanin/ JPT-Quencher). Beim Nachweis von Pepsin- Aktivitäten waren nur mit dem Kondo- Substrat Konzentrationen von 0,01 µg/ ml zu bestimmen. Bei der Bestimmung des Einflusses der Substratsequenz ergaben sich ebenfalls für die Peptidsequenz des Kondo- Substrates mit Phe-Phe im Vergleich zu anderen Peptidsequenzen die höchsten Fluoreszenzsignale. Beim Vergleich der Fluoreszenz in Abhängigkeit vom Fluorophor/ Quencher- System ergaben sich für das von JPT entwickelte Fluorophor/ Quencher- Paar (Coumaryl- Alanin/ JPT- Quencher) die höchsten Fluoreszenzsignale.

Die Untersuchungen haben ebenfalls gezeigt, dass ein Fluoreszenznachweis für den Einsatz in der Industrie ungeeignet ist. Die Anschaffungskosten für einen Fluoreszenzmessgerät belaufen sich auf ca. 30 T€, außerdem ist eine Zentrifuge für Mikrotiterplatten notwendig, da vor jeder Messung die Proben zentrifugiert werden müssen. Bereits kleinste Gasblasen stören einen Fluoreszenznachweis empfindlich. Messergebnisse mit fluoreszenzmarkierten Substraten sind schwer reproduzierbar, da viele Faktoren eine Fluoreszenzmessung beeinflussen können.

Somit waren die Ziele des Projektes nur teilweise erreichbar.

Für einen praxisrelevanten Nachweis würde nach dem heutigen Stand der Forschung ein chromogenmarkiertes Peptidsubstrat geeigneter sein. Weiterentwickelte Farbstoffe sind ähnlich sensitiv wie Fluoreszenzfarbstoffe. Weitere Vorteile gegenüber Fluoreszenzfarbstoffen sind, dass die Meßwerterfassung mit einem Photometer, das in vielen Betrieben bereits vorhanden ist, erfolgen kann und damit kostengünstiger ist und das keine störende Eigenfluoreszenz auftritt.