

Schlußbericht zum Forschungsvorhaben

1. Forschungsthema

Proteinase A und Schaumstabilität – Biochemische Untersuchungen der Wechselwirkungen von Proteinase A aus *Saccharomyces cerevisiae* und schaumaktiven Lipidtransferprotein (LTP1).

2. Einleitung

Ein sehr wichtiges Qualitätskriterium in der Brauindustrie ist die Qualität des Bierschaums. Das Schaumpotential von Bier wird während des Mälz- und Brauprozesses definiert und durch zahlreiche positive und negative Faktoren beeinflusst. Fette, langkettige Alkohole, Aminosäuren und bspw. Proteinase zählen zu den schaumschädigenden Bierkomponenten. Zu den schaumfördernden Verbindungen zählen u.a. Bittersubstanzen aus Hopfen, Polysaccharide (Glukane), Melanoidine und Proteine. Aus Gerste stammende schaumpositive Proteine sind neben Hordein- und Glutelinfragmente das Protein Z und das Lipidtransferprotein (LTP1). Protein Z, ein 40 kDa großes Protein, und LTP1, ein 10 kDa großes Protein, sind die Hauptproteinkomponenten im Bier. Im Verlauf des Mälz- und Brauprozesses werden Protein Z und LTP1 aufgrund von Denaturation, Proteolyse und Glykosylierung durch Maillardreaktionen signifikant modifiziert. Denaturiertes LTP1 ist im Schaum angereichert und spielt eine zentrale Rolle bei der Schaumbildung. Frühere Ergebnisse (AiF – Forschungsvorhaben 11387N) zeigten, daß das im Bier vorkommende LTP1 durch Proteinase A abgebaut werden kann. Die Thematik dieses Projektes umfaßte die biochemische Untersuchung von Eigenschaften und Wechselwirkung des schaumpositiven Lipidtransferproteins aus der Gerste und der schaumnegativen Hefeproteinase A.

3. Zusammenfassung

Mit der Identifikation von endogenem LTP1 in Bier als Substrat für Proteinase A konnte die Wechselwirkung zwischen einer schaumnegativen Proteinase und einem schaumpositiven Protein eindeutig nachgewiesen werden. Weiterhin konnte gezeigt werden, daß der Proteinaseabbau eines in *E. coli* exprimierten rekombinanten (His)₆ – LTP1 – Fusionsproteins durch den Affinitätsstap (Histag), über den die chromatographische Reinigung des Proteins erfolgt, behindert wird. Es wurde ein neues Proteinexpressions- und Reinigungssystem

etabliert, um eine höhere Ausbeute an rekombinanten LTP1 zu erzielen. Für dieses rekombinante LTP1 konnte im Gegensatz zum rekombinanten (His)₆ - LTP1 – Fusionsprotein ein Abbau durch Proteinase A nachgewiesen werden. Parallel wurde erfolgreich ein immunoaffinitätschromatographisches Reinigungsverfahren für LTP1 entwickelt, mit dem LTP1 direkt aus Bier gewonnen wurde. Mit einer geeigneten Reverse - Phase - HPLC - Methode wurden LTP1 - haltige Proteinpräparate aus Gerste und Bier hinsichtlich ihres Verhaltens gegenüber Proteinase A untersucht. Dabei zeigte sich, daß natives LTP1 in Proteinpräparaten aus Gerste vollständig resistent gegenüber Proteinase A ist, hingegen LTP1 in Proteinpräparaten aus Bier abgebaut wird. Dieses Ergebnis wurde durch SDS - Gel - und Westernblotanalysen bestätigt und führt zu der Annahme, daß LTP1 aus der Gerste während des Mälz- und Brauprozesses zu einer proteinasesensitiven Form modifiziert wird. Aus dem Ergebnis läßt sich schlußfolgern, daß in der Aminosäuresequenz von LTP1 mindestens eine potentielle Spaltsequenz für Proteinase A vorhanden ist.

4. Forschungsergebnisse

4.1. Abbau von LTP1 in Bier durch Proteinase A

In vorangegangenen Arbeiten konnte der Abbau von LTP1 in Bier durch Proteinase A gezeigt werden (AiF Forschungsprojekt 11387N). Erste Versuche dieses Forschungsprojektes sollten diesen spezifischen Abbau von LTP1 bestätigen.

Pasteurisierte Bierproben wurden mit verschiedenen Konzentrationen Proteinase A inkubiert und die Proben parallel mit Hilfe von SDS - Gelelektrophorese und mit Antikörpern im Westernblot analysiert. In Abb. 1A sind in der proteinaseunbehandelten Probe zwei deutliche Banden mit einem Molekulargewicht von ca. 40 und 10 kDa zu erkennen (Abb. 1A, Bahn 1). Die 40 kDa Bande kann dem Protein Z zugeordnet werden, die 10 kDa Bande dem LTP1. Durch Westernblotanalyse mit anti - LTP1 - Antikörpern konnte bestätigt werden, daß es sich bei der 10 kDa großen Bande um LTP1 handelt (Abb. 1B, Bahn 5). Nach Inkubation mit Proteinase A konnte sowohl im SDS - Gel als auch im Westernblot die LTP1 spezifische Bande nicht detektiert werden (Abb. 1A, Bahn 2 und 3, Abb. 1B, Bahn 6 und 7). Mögliche Abbauprodukte konnten mit dem verwendeten SDS - Gelsystem und mittels Westernblot nicht nachgewiesen werden. Wiederholte Versuche belegen eindeutig, daß LTP1 spezifisch durch Proteinase A abgebaut wird.

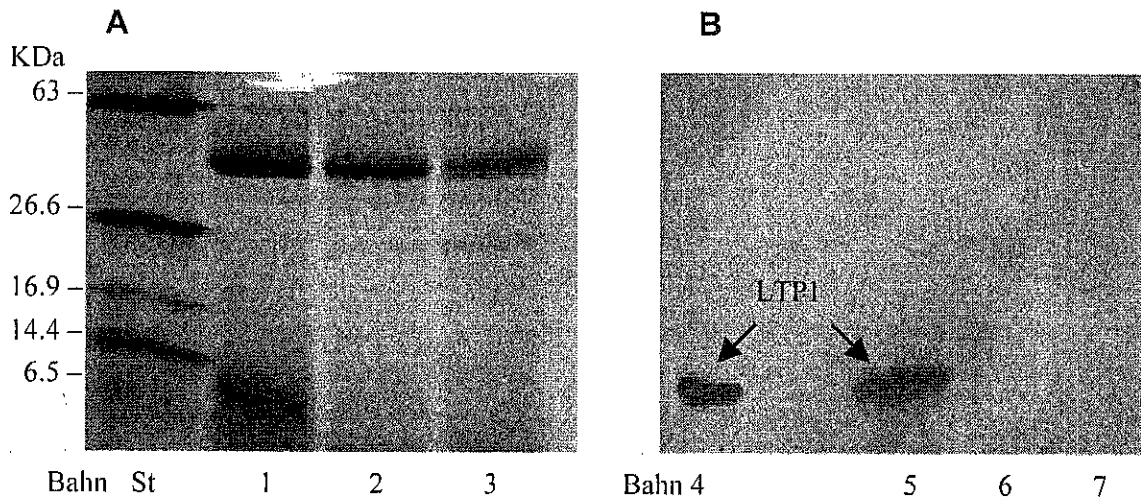


Abb. 1: (A) Bierproben nach Inkubation mit Proteinase A im SDS - Gel (Commassiefärbung). Bahn 1 – Probe ohne Proteinase A, Bahn 2 und 3 – nach Inkubation mit 4,9 µg/ml und 9,8 µg/ml Proteinase A (5 Tage bei RT). St – Polypeptidstandard + BSA. (B) Westernblotanalyse der selben Proben mit polyklonalen anti - LTP1 - Antikörpern. Bahn 5: Probe ohne Proteinase A. Bahn 6 und 7 - nach Inkubation mit 4,9 µg/ml und 9,8 µg/ml Proteinase A. Bahn 4 – LTP1-Standard gereinigt aus Gerste

4.2. Reinigung von rekombinatem (His)₆ - LTP1 – Fusionsprotein

Vorversuche ergaben, daß ein rekombinantes (His)₆ - LTP1 - Fusionsprotein aus *E. coli* im Gegensatz zum endogenen LTP1 in Bier nicht durch Proteinase A abgebaut wird (AiF - Forschungsprojekt 11387N). Die differentielle Sensitivität der beiden Proteine kann verschiedene Ursachen haben. Einerseits kann endogenes LTP1 in Bier so modifiziert vorliegen, daß die Proteinase A - Spaltsequenz im Gegensatz zum rekombinanten Protein für das Enzym zugänglich ist. In Frage kommen dafür unterschiedliche posttranslationale Modifikationen oder Proteinfaltungen in Gerste oder *E. coli*. Die Primär- bzw. Sekundärstruktur des endogenen LTP1 könnte auch durch chemische Modifizierungen bzw. thermische Prozesse während des Mälz- und Brauprozesses verändert werden. Andererseits kann die Behinderung des Abbaus durch die zusätzlich eingeführten Aminosäuren am N-Terminus des rekombinanten Proteins hervorgerufen werden.

Das in *E. coli* exprimierte Fusionsprotein wird über den (His)₆ - Rest (Histag), der spezifisch an eine Ni - NTA - Matrix bindet, affinitätschromatographisch gereinigt (Aufbau des Fusionsproteins siehe Abb. 2). Mit Hilfe einer Enterokinase (Peptidase) kann der Histag enzymatisch vom Fusionsprotein abgetrennt werden. Es wurden verschiedene Enterokinasen getestet. Ein Enzympräparat enthielt zusätzliche Proteinaseaktivitäten, die zu einem Abbau

des gesamten Fusionsproteins führten. Trotz zahlreicher Optimierungsversuche bei verschiedenen Reaktionsbedingungen (Puffer, pH) war es nicht möglich, LTP1 ohne Histag in ausreichender Menge für weiterführende Versuche zu gewinnen. Verluste traten sowohl beim affinitätschromatographischen Reinigungsprozeß als auch beim Umpuffern für die Abspaltung des Affinitätstag auf.



Abb. 2: Aufbau rekombinantes (His)₆ - LTP1 - Fusionsprotein. Affinitätschromatographische Reinigung des exprimierten Proteins erfolgt über N-terminalen Histag, der mittels Enterokinase abgespalten werden kann.

Aus den dargestellten Ergebnissen ergab sich die Notwendigkeit, eine geeignete Methode zur Reinigung von LTP1 in ausreichenden Mengen zu etablieren. Als alternative Möglichkeiten wurde ein Proteinreinigungssystem ohne zusätzlichen Peptidaseschritt sowie die direkte affinitätschromatographische Reinigung von LTP1 aus Bier mittels Antikörpern getestet.

4.3. Reinigung von rekombinatem LTP1 über selbst abspaltbaren Affinitätstag

Das IMPACTTM (Intein Mediated Purification with an Affinity Chitin - Binding Tag) nutzt die induzierbare Spleißaktivität eines Proteinspleißelements (Intein), um das Zielprotein vom Affinitätstag zu separieren. Der Aufbau des in *E. coli* exprimierten Fusionsproteins ist in Abb. 3 dargestellt. Die Chitinbindungsdomäne (CBD) ermöglicht durch Bindung an eine Chitinsäule die Affinitätsreinigung des Fusionsproteins. In der Gegenwart von Thiolverbindungen unterliegt das Intein einem spezifischen Spleißprozeß, infolge dessen LTP1 vom chitingebundenen Intein - CBD - Tag freigesetzt wird. Der Vorteil gegenüber dem zuvor verwendeten Expressionssystem: Die Reinigung des Proteins ist in einem Schritt ohne Verwendung einer Peptidase möglich. Durch die spezifische, Chitin - vermittelte, affinitätschromatographische Reinigung wird LTP1 in hoher Reinheit gewonnen. Nach zahlreichen Versuchen zur Optimierung der Proteinexpression und des Reinigungsprozesses (Zellkulturbedingungen, Induktionsbedingungen für die Expression, Zellyse, Induktionsbedingungen für den Proteinspleißprozeß) wurde eine maximale Ausbeute von 125 µg Protein

aus 100 ml Nährmedium erzielt. Geringe Proteinexpressionen und Verluste, z.B. während der Lagerung der Zellpellets bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, führten im Durchschnitt zu geringeren Ausbeuten von $\approx 50\text{ }\mu\text{g}/100\text{ ml}$.



Abb. 3: Aufbau rekombinantes Intein - LTP1 - Fusionsprotein. Affinitätschromatographische Reinigung des exprimierten Proteins erfolgt über C-terminale Chitinbindungsdomäne (CBD), die über einen induzierten, inteinvermittelten Proteinspleißprozeß abgetrennt werden kann.

Das gereinigte Protein wurde konzentriert und für die Proteinase A - Behandlung in Citratpuffer (pH 4,6) aufgenommen. Nach Inkubation mit Proteinase A wurden die Proben im SDS - Gel analysiert (Abb. 4). In der proteinasebehandelten Probe ist im Vergleich zur unbehandelten Probe keine Bande im Größenbereich von 10 kDa zu erkennen (Abb. 4, Bahn 1 und 2). Dieses Ergebnis belegt einerseits den Abbau des rekombinanten LTP1 durch Proteinase A, andererseits bestätigt es die Annahme, daß der Abbau des rekombinanten Histag - LTP1 - Fusionsproteins durch den Histag behindert wurde.

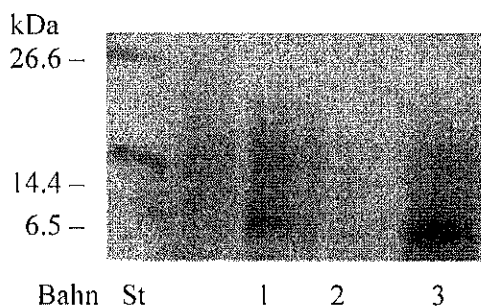


Abb. 4: Rekombinantes LTP1 nach Inkubation mit Proteinase A im SDS - Gel (Coomassiefärbung). Bahn 1 - Probe ohne Proteinase A; Bahn 2 - Probe nach Inkubation mit Proteinase A; Bahn 3 - LTP1-Standard.

Anhand der Ergebnisse war keine Aussage möglich, ob die differentielle Proteinase A - Sensitivität durch Unterschiede der Strukturausbildung von endogenem LTP1 (Modifizierungen in der Gerste und während des Mälz- und Brauprozesses) und rekombinanten LTP1 (Modifizierungen in *E. coli*) hervorgerufen wird. Rekombinantes LTP1 und endogenes LTP1 in Bier sind hinsichtlich ihrer Aminosäuresequenz identisch. Die in *E. coli* ausgebildeten Sekundär- und Tertiärstrukturen des rekombinanten Proteins können sich von denen in Gerste ausgebildeten des endogenen LTP1 unterscheiden und somit einen Einfluß auf den Abbau des rekombinanten LTP1 durch Proteinase A haben. Die beobachtete

Sensitivität des endogenen LTP1 in Bier gegenüber Proteinase A kann durch chemische Modifizierungen während des Mälz- und Brauprozesses erhöht bzw. hervorgerufen werden. Zur Klärung der Fragestellung, ob eine proteinasesensitive LTP1 - Form erst während des Mälz- und Brauprozesses entsteht, wurde der Abbau von endogenem LTP1 aus Gerste durch Proteinase A untersucht. Für die direkte Reinigung der für die Untersuchungen erforderlichen größeren Mengen LTP1 aus Bier und Gerste wurde im folgenden Projektabschnitt die Immunoaffinitätschromatographie etabliert.

4.4. Direkte Reinigung von LTP1 aus Bier mittels Immunoaffinitätschromatographie

Für die Herstellung einer immunoaffinitätschromatographischen Säule wurden polyklonale Kaninchen - anti - LTP1 - Antikörper (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. E. Evans, Adelaide, Australien) an CNBr aktivierte Sepharose gekoppelt. Zur Probenvorbereitung wurde Bier entgast, gefiltert und der pH für eine optimale Bindung von LTP1 an die Antikörper auf 7 – 7,5 eingestellt. In Abbildung 5 sind die gewonnenen Gesamtproteinmengen in Abhängigkeit der Volumina eingesetzten Bieres dargestellt. Es ist eine lineare Abhängigkeit zu beobachten. Die maximale Kapazität der Säule konnte nicht ermittelt werden. Die Proteinausbeute betrug durchschnittlich 60 µg Protein aus 100 ml Bier. In Tabelle 1 sind die Ausbeuten aller LTP1 - Reinigungsverfahren dargestellt, unter der Annahme, daß die jeweils ermittelte Gesamtproteinmenge der gereinigten LTP1 - Menge entspricht.

Tabelle 1: Vergleich von Proteinausbeuten verschiedener LTP1 - Reinigungsverfahren

Proteinausbeuten		
Histag – Reinigungssystem [(His) ₆ – LTP1 – Fusionsprotein/ Nährmedium]	Intein – Reinigungssystem [rekombinantes LTP1/ Nährmedium]	Immunoaffinitäts- chromatographie [endogenes LTP1/ Bier]
≈ 70 µg/ 100 ml	≈ 50 µg/ 100 ml	≈ 60 µg/ 100 ml

Das immunoaffinitätschromatographisch gewonnene LTP1 erwies sich bei 4 °C und –20 °C als bedingt lagerfähig und wurde vorrangig für HPLC - Versuche eingesetzt. Nach dem 18. Versuch war ein Zusetzen der Säule durch Bierinhaltsstoffe zu beobachten, was zu einer deutlichen Abnahme der Proteinausbeute führte. Da eine Regeneration der Säule nicht

möglich war und Kaninchen - Antikörper nicht in ausreichender Menge für die Herstellung einer neuen Säule zur Verfügung standen, wurde für weitere Untersuchungen eine neue Säule mit Schaf - anti - LTP1 - Antikörper (zur Verfügung gestellt von Dr. E. Evans) hergestellt. Zur Optimierung der Probenvorbereitung wurden Proteinpräparate aus Bier mittels fraktionierter Ammoniumsulfatfällung und anschließender Dialyse gewonnen. Trotz einer mittleren Kopplungseffizienz von ca. 50 % der Schaf - Antikörper an die Sepharosematrix, konnte mit der neuen Säule kein LTP1 gereinigt werden.

Die beschriebene immunoaffinitätschromatographische Methode unter Verwendung von Kaninchen – Antikörpern ist für eine relativ schnelle und einfache Reinigung von LTP1 aus Proben wie Bier, Würze oder Gerste mit gleichbleibenden zufriedenstellenden Ausbeuten geeignet.

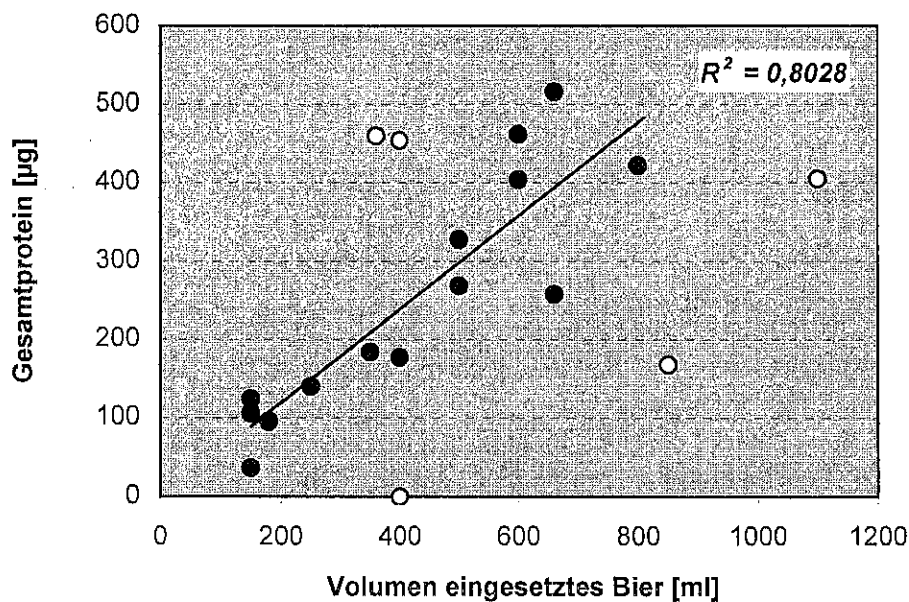


Abb. 5: Ausbeuten für immunoaffinitätschromatographische von LTP1 aus Bier in Abhängigkeit vom eingesetzten Volumen. Säulenmaterial: CNBr aktivierte Sepharose mit gekoppelten Kaninchen – anti – LTP1 – Antikörpern. Weiße Punkte – Meßwerte wurden nicht zur Berechnung des Bestimmungsmaß herangezogen.

4.5. Reverse Phase HPLC (RP-HPLC)

In Vorversuchen wurden verschiedene Säulen (C4 und C18) sowie verschiedene Elutionssysteme (Acetonitril/Wasser; Methanol/Wasser) getestet. Die unten beschriebenen Versuche wurde mit einem Dionex HPLC - System und einer Nucleosil 300-5 C4 MPN Säule (250 mm x 4 mm, Macherey und Nagel) durchgeführt. Als Eluenten wurden Methanol und Wasser (Gradient grad, Roth) mit 0,1% TFA verwendet, die Detektion erfolgte bei 220 und 280 nm.

Modifizierung von LTP während des Mälz- und Brauprozesses

Proteinpräparate aus Bier und Gerste wurden mittels fraktionierter Ammoniumsulfatfällung gewonnen, um die mögliche Transformation von LTP1 aus Gerste in eine proteinasesensitive Form während des Mälz- und Brauprozesses zu untersuchen. Die Auftrennung der Probengemische erfolgte über RP - HPLC, um verschiedene LTP1 - Formen unterscheiden zu können und eventuelle Proteinaseabbauprodukte zu detektieren.

LTP1 enthaltende Proteinpräparate aus Bier zeigten nach der Trennung einen breiten Peak von $R_t = 21$ bis 29 min (Abb. 6A). Drei Fraktionen des Peaks, B22, B24 und B26 wurden am Rotationsverdampfer eingeengt und mittels SDS – Gel und Westernblot hinsichtlich des Vorhandenseins von LTP1 untersucht. Eine deutliche Bande des 10 kDa großen Proteins ist in allen Fraktionen zu detektieren (Abb. 6B). In Fraktion 26 ist eine weitere Bande für das 40 kDa Protein erkennbar. Mittels Immunodetektion konnte in allen Fraktionen LTP1 nachgewiesen werden (Abb. 6C). Das Signal im Chromatogramm für LTP1 aus Bier ist ein breiter Peak der vermutlich aus verschiedenen LTP1 - Formen gebildet wird, die durch verschiedene Modifikationen während des Mälz- und Brauprozesses generiert werden können (Jegou et al. 2001).

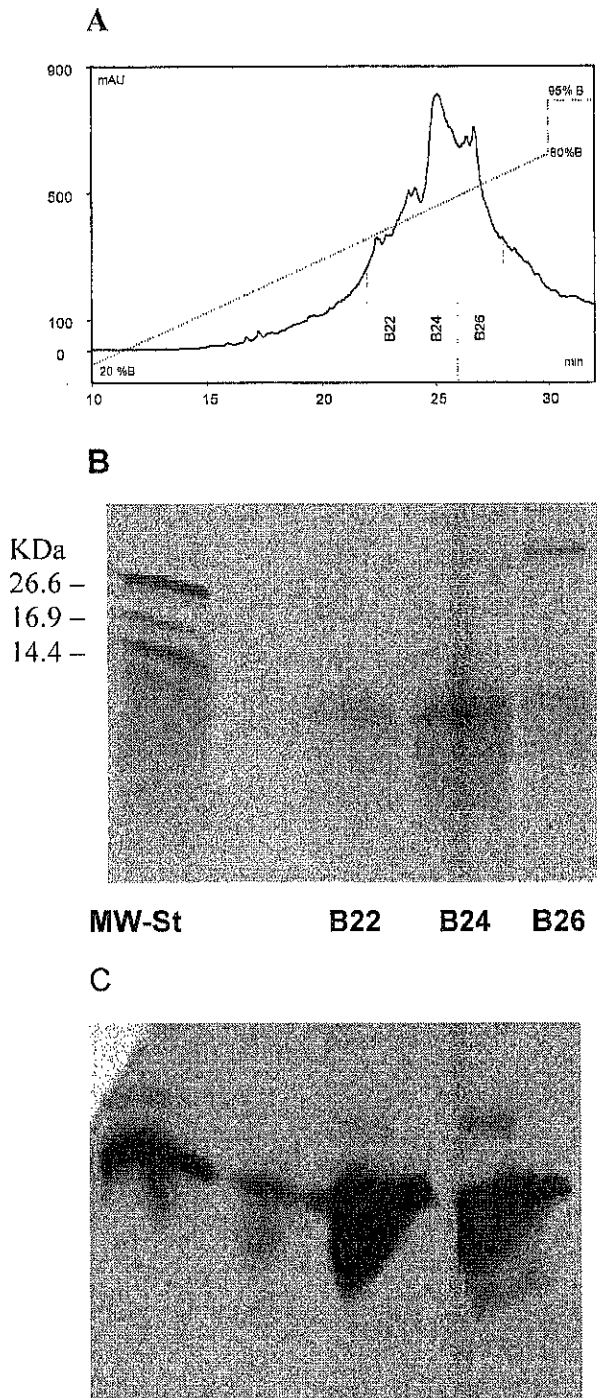


Abb. 6: (A) Chromatogramm für die semipräparative RP – HPLC - Trennung eines über Ammoniumsulfatfällung gewonnenen Proteinpräparats aus Bier. Detektion erfolgte bei 280 nm. Flußrate - 0,8 ml/min. Punktlinie – Wasser/Methanol Gradient. (B) SDS - Gel der gewonnenen Fraktionen B22, B24 und B26. (C) Westernblotanalyse der selben Proben mit polyklonalen Kaninchen - anti - LTP1 - Antikörpern. MW-St: Polypeptidmarker. LTP1-St: LTP1 - Standard gereinigt aus Gerste.

Die Auftrennung der LTP1 enthaltenden Proteinpräparate aus Gerste zeigt einen breiten Elutionspeak von $R_t = 19$ bis 22 min und distinkte Einzelpeaks bei $R_t = 22,5$; 25; 26 und 26,5 (Abb. 7A). In den Fraktionen G20 und G21 konnte mittels Westernblotanalyse (Abb. 7B) LTP1 bestimmt werden.

Das differenzierte Trennverhalten der beiden Proteinpräparate aus Bier und Gerste in der RP-HPLC ist auf unterschiedliche Modifikationen und damit verbundene veränderte chemische Eigenschaften der Hauptkomponente der Präparate, dem LTP1, zurück zu führen. Für LTP1 sind verschiedene Modifizierungen sowohl der Primär-, als auch der Sekundär- und Tertiärstruktur diskutiert worden (Jegou et al., 2000; Bech et al., 1995). Hervorgerufen können diese durch partielle oder vollständige Denaturierung bzw. Neuordnung von Disulfidbrücken, durch Hydrolyse sowie Glykosylierungen werden. Durch Veränderungen der Proteinstruktur können bestimmte chemische Reaktionen während des Mälz- und Brauprozesses begünstigt werden (z.B. Anlagerung verschiedener Zucker). So sind Lysinreste im denaturierten Proteinmolekül außen plaziert und können dort leicht mit reduzierenden Zuckercarbonylgruppen in Reaktion treten. Die bei hohen Temperaturen während der Mälz- und Brauprozesse stattfindende Glykosylierung (Maillardreaktion) unterschiedlich denaturierter LTP1 ergibt eine Mixtur verschiedener LTP1 – Formen. Diese Maillardprodukte verstärken nach Lusk et al. (1995) die positiven Schaumeigenschaften von Bierproteinen.

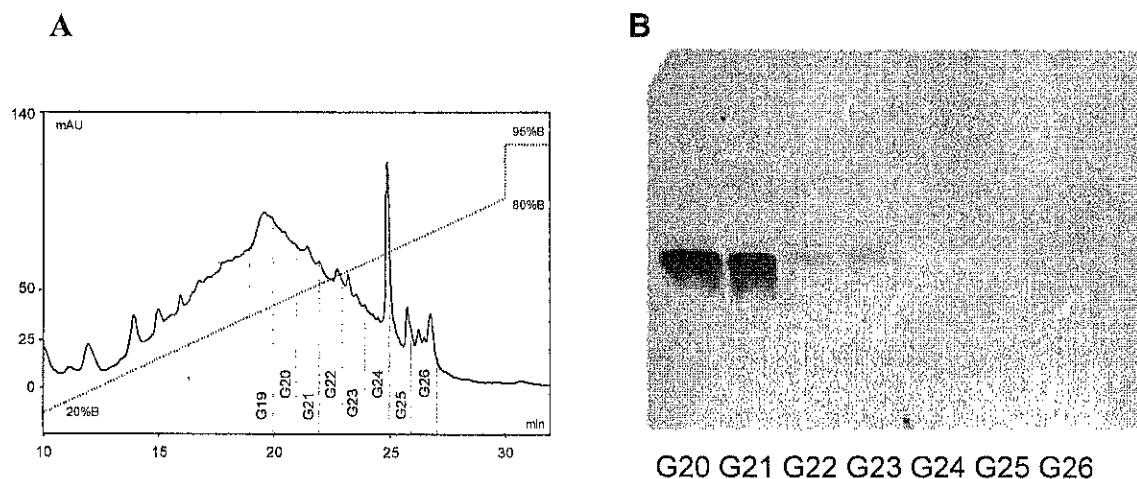


Abb. 7: (A) Chromatogramm für die semipräparative RP – HPLC - Trennung eines über Ammoniumsulfatfällung gewonnenen Proteinpräparats aus Gerste. Detektion erfolgte bei 280 nm. Flußrate – 0,8 ml/min. Punktlinie: Wasser/Methanol Gradient. (B) Westernblotanalyse der gewonnenen Fraktionen mit polyklonalen Kaninchen - anti - LTP1 - Antikörpern.

Abbau des rekombinanten LTP1 aus Bier durch Proteinase A und Resistenz des endogenen LTP1 aus Gerste

LTP1 enthaltende Proteinpräparate aus Gerste und Bier wurden mit Proteinase A (4.9 µg/ml) inkubiert und im SDS - Gel analysiert. Im Ergebnis fand sich, daß LTP1 aus Bier durch Proteinase A abgebaut und LTP1 aus Gerste nicht abgebaut wird (Abb. 8A, Bahn 1b und 2b). Das Ergebnis wurde im Westernblot bestätigt (nicht gezeigt). Der Proteinaseabbau LTP1 -haltiger Proteinpräparate aus Bier zeigte sich im HPLC – Chromatogramm (Abb. 8B) als abnehmende Peakfläche von P3 und P4. Gleichzeitig ist eine Zunahme der Peakflächen von P1 und P2 zu beobachten. Die Peaks P3 und P4 können aufgrund früherer Untersuchungen (Abb. 6A) als LTP1 -haltig charakterisiert werden. Das es sich bei den Peaks P1 und P2 ebenfalls um Proteine/ Peptide handelt belegen die 3D - Bilder des Dioden - Array - Detektors (Ergebnisse nicht dargestellt). Eine weitere Differenzierung oder Charakterisierung ist auf dieser Basis nicht möglich, da sich für alle Proteine im Dioden - Array - Detektor das gleiche Spektrum ergibt. Mögliche Abbauprodukte konnten im SDS – Gel bzw. Westernblot nicht nachgewiesen werden.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen für Proteinpräparate aus Bier (Abb. 8B) war für Proteinpräparate aus Gerste keine Ab- oder Zunahme von Peakflächen im Chromatogramm zu beobachten (Abb. 8C).

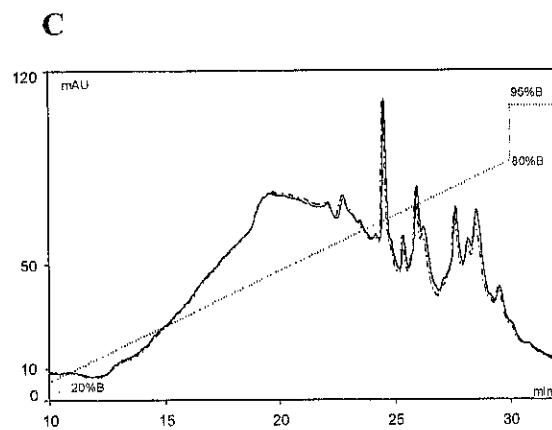
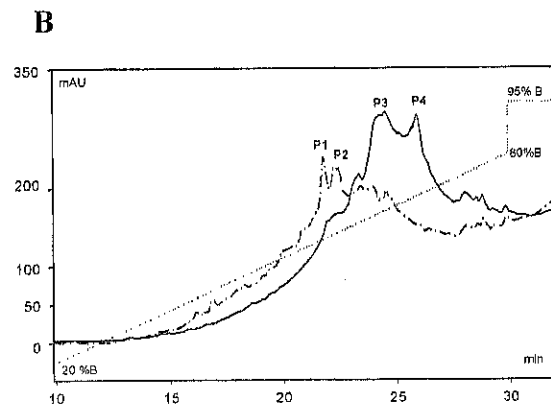
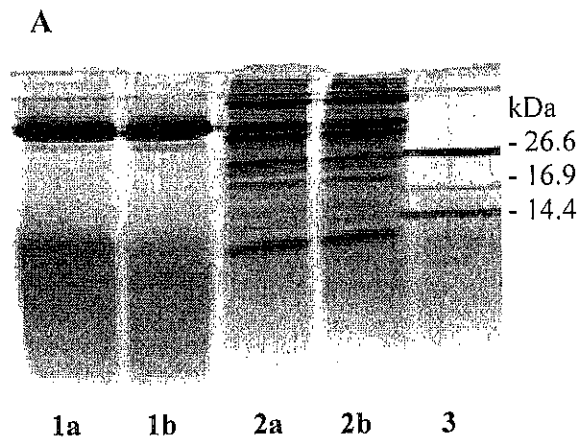


Abb. 8: (A) SDS – Gel für Proteinpräparate, gewonnen über Ammoniumsulfatfällung aus Bier (Bahn 1) und Gerste (Bahn 2) vor (Bahnen a) und nach Inkubation mit Proteinase A (Bahnen b). Bahn 3: Polypeptidmarker. (B+C) RP - HPLC - Chromatogramm eines Proteinpräparats aus Bier (B) und aus Gerste (C) mit (Strich-Punkt-Linie) und ohne (schwarze Linie) Proteinase A - Behandlung. Detektion erfolgte bei 280 nm (B) bzw. 220 nm (C). Flußrate – 0,8 ml/min. Punktlinie – Wasser/Methanol Gradient.

5. Schlußfolgerung und Diskussion

Ziel des Projektes war die detaillierte Untersuchung der Wechselwirkungen zwischen der schaumnegativen Proteinase A und dem schaumpositiven LTP1. Im Rahmen dieses Projektes konnte erstmals gezeigt werden, daß LTP1 in Bier spezifisch durch Proteinase A abgebaut wird.

Durch wiederholte Versuche und durch verschiedene Nachweise (SDS - Gel, Westernblot, RP - HPLC) wurde der spezifische Abbau von LTP1 in Bier durch Proteinase A belegt. Gleichzeitig wurde gezeigt, daß endogenes LTP1 aus Gerste resistent gegenüber Proteinase A ist. Daraus wurde geschlußfolgert, daß erst während des Mälz- und Brauprozesses, bspw. durch Glykosylierungen, eine proteinasesensitive Form von LTP1 generiert wird.

Dem während des Mälz- und Brauprozesses glykosylierten LTP1 wird im Gegensatz zum nativen Gerstenprotein eine schaumverstärkende Rolle zugeschrieben (Lusk et al., 1995). Andererseits kann die Glykosylierung von LTP1 auch die Ursache für die veränderte Sensitivität gegenüber sauren Proteinasen wie Proteinase A (eigene Ergebnisse) und Pepsin (Lindorff-Larsen et al., 2001) sowie gegenüber einer Endoproteinase (Davy et al., 1999) sein. Diese Annahme steht jedoch im Widerspruch zu Jegou et al. (2000), die die Glykosylierung von LTP1 für die Resistenz des Proteins gegenüber proteolytischen Enzymaktivitäten während des Mälz- und Brauprozesses verantwortlich machen.

Ein weiteres Ergebnis, das in diesem Zusammenhang diskutiert werden soll, ist der Abbau eines rekombinanten LTP1 durch Proteinase A. Dadurch wird zum einen belegt, daß der Proteinase A - Abbau eines (His)₆ - LTP1 – Fusionsproteins durch den Histag behindert wurde. Zum anderen verweist es auf eine vorhandene Proteinase A - Sensitivität des rekombinanten LTP1, die im Gegensatz zum LTP1 in Bier nicht durch brauprozessspezifische Modifikationen hervorgerufen wurde. Ursachen hierfür können durch die Expression in *E. coli* bedingte unvollständig ausgebildete Sekundär- und Tertiärstrukturen bzw. abweichende Modifizierungen (*E. coli*/Gerste) sein.

Inwiefern sich Brauprozesse, die zu einer proteinasesensitiven Form von LTP1 führen bzw. für eine schaumfördernde LTP1 - Form verantwortlich sind, unterscheiden ist ungeklärt. Aus dem Kenntnis dieser Prozesse und ihres Einflusses auf die Modifizierung von LTP1 ließen sich technologische Einflußmöglichkeiten ableiten.

In der Primärsequenz von LTP1 findet sich keine der bekannten Spaltsequenzen für Proteinase A. Aufgrund der Ergebnisse im SDS -Gel (Abb. 1A und 8A), Westernblot (Abb. 1B) und der zu beobachtenden Ab- und Zunahme von Peakflächen im Chromatogramm

(Abb. 8B), die einen spezifischen Abbau des LTP1 durch Proteinase A belegen, wird geschlußfolgert, daß in der Aminosäuresequenz von LTP1 mindestens eine potentielle Spaltsequenz für Proteinase A vorhanden ist. Daher wird angenommen, daß (i) durch Konformationsänderungen eine bisher nicht bekannte Spaltstelle für Proteinase A zugänglich wird bzw. (ii) durch Glykosylierungen in der Nachbarschaft eine Transformation einer nicht-potentielle Spaltstelle in eine potentielle Spaltstelle erfolgt. In diesem Zusammenhang wäre die Lokalisierung der potentielle Spaltsequenz im Molekül von Bedeutung, sowie der Einfluß des Modifizierungsgrades von LTP1 (vollständig oder partiell denaturiert) für einen Proteinase A – Abbau.

Die dargelegten Ergebnisse stellen einen Beitrag zur grundlegenden Klärung der biochemischen Abbaureaktionen des LTP1 durch die Hefeproteinase A dar, die eine Hauptursache für die während der Lagerung zu beobachtenden Schaumstabilitätsabnahmen sind. Detaillierte Kenntnisse dieser biochemischen Abbauprozesse sind für ein verbessertes Schaumqualitätsmanagement notwendig. Konsequenzen aus den dargelegten Ergebnissen wären (i) die Reduktion des schaumschädigenden Einfluß von Proteinase A bspw. durch KZE oder (ii) die Verstärkung des schaumstabilisierenden Effektes von LTP1 durch bpsw. gezielte Glykosylierung während des Mälz- und Brauprozesses. Für detaillierte Lösungsvorschläge sind weiterführende Untersuchung einzelner Schritte des Mälz- und Brauprozesses und der jeweilig stattfindenden Modifizierung des LTP1 notwendig, die u.a. klären sollten, ob unterschiedliche Prozesse zu einer schaumaktiven bzw. proteinasesensitiven LTP1 - Form führen. Verstärkte Aufmerksamkeit sollte Untersuchungen zur Proteinase A – Kinetik zuteil werden.

Mit der Identifizierung des schaumpositiven LTP1 als Substrat für Proteinase A bietet es sich an, die LTP1 - Spaltprodukte (hervorgegangen aus Proteinase A - Abbau) genauer zu charakterisieren, mit dem Ziel der Etablierung eines sensitiven Testsystems. Der Brauer hätte so die Möglichkeit, das fertige Bier auf Proteinase A - Aktivität zu untersuchen und falls erforderlich Gegenmaßnahmen, wie z.B. eine gezielte Hitzebehandlung, einzuleiten.

6. Literatur

- Bech, L. M., Vaag, P., Heinemann, B., and Breddam, K. Throughout the Brewing Process Barley Lipid Transfer Protein 1 (LTP1) is Transformed into a more Foam-Promoting Form. *EBC Congress* 1995, 561-568.
- Davy, A., Svendsen, I., Bech, L., Simpson, D. J., and Cameron-Mills, V. LTP is not a cysteine endoprotease inhibitor in barley grains. *Journal of Cereal Science* 1999, 30, 237-244.
- Jegou, S., Douliez, J. P., Molle, D., Boivin, P., and Marison, D. Purification and structural characterization of LTP1 polypeptides from beer. *J Agric Food Chem* 2000, 48, 5023-5029.
- Jegou, S., Douliez, J. P., Molle, D., Boivin, P., and Marion, D. Evidence of the glycation and denaturation of the LTP1 during the malting and brewing process. *J Agric Food Chem* 2001, 49, 4942-4949.
- Lindorff-Larsen, K. and Winther, J. R. Surprisingly high stability of barley lipid transfer protein, LTP1, towards denaturant, heat and proteases. *FEBS Lett.* 2001, 488, 145-148.
- Lusk, L. T., Goldstein, H., and Ryder, D. Independent role of beer proteins, melanoidins and polysaccharides in foam formation. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 1995, 53, 93-103.

Durchführende Forschungsstelle: Technische Universität Berlin, Forschungsinstitut für Mikrobiologie, Seestraße 13, 13353 Berlin

Berlin, 05. 11. 2002
Ort, Datum

Projektleiter: Prof. Dipl.-Ing. Dr. U. Stahl