



WISSENSCHAFTSFÖRDERUNG
DER DEUTSCHEN BRAUWIRTSCHAFT E.V.

BERICHT

zu Forschungsvorhaben

B72

Projekt-Nr.

Zwischenbericht Nr.: _____

Abschlußbericht

für den Zeitraum vom: **01. April 2002** bis: **30. September 2004**

THEMA:

Charakterisierung der genetischen Grundlagen sortenunterschiedlicher Lipoxygenase-Aktivitäten und Entwicklung eines molekularen Markersystems zur züchterischen Entwicklung lipoxygenasearmer Genotypen

Forschungsstelle:

Versuchs- und Lehranstalt für Brauerei in
in Berlin (VLB)

Leiter der Forschungsstelle:

Dipl.-Kaufmann Eberhard Weinmann

Projektleiter:

Dr. Frank Rath

Verfasser des Berichtes:

Dr. Michael Voetz

Datum:

15. März 2005

Abschlussbereich

Charakterisierung der genetischen Grundlagen sortenunterschiedlicher Lipoxygenase-Aktivitäten und Entwicklung eines molekularen Markersystems zur züchterischen Entwicklung lipoxygenasearmer Genotypen

I. Problemstellung und Projektziele

Die Gewährleistung einer gleichbleibend guten Qualität des Bieres ist eine wesentliche Voraussetzung für die Zufriedenheit des Kunden und seine langfristige Bindung an das Produkt. Höchste Anforderungen an die geschmackliche Stabilität des Bieres, seine chemisch-physikalische Haltbarkeit und mikrobiologische Stabilität sind daher von wachsender Bedeutung für die Erhaltung und Verbesserung der Wettbewerbsposition im nationalen und internationalen Biermarkt. Während durch höhere Hygienestandards und technologische Veränderungen in der Produktion die chemisch-physikalischen und mikrobiologischen Eigenschaften des Bieres deutlich verbessert wurden, konnte das Problem der Geschmacksstabilität bzw. Geschmacksinstabilität trotz intensiver Bemühungen - z.B. hohe Abdarrtemperaturen zur Inaktivierung von Lipasen und Lipoxygenasen, Schonung reduzierender Substanzen bei der Malzbereitung, Vermeidung des Sauerstoffeintrages während des Brauprozesses, sorgfältige Trubentfernung, niedrige Lagerkellertemperaturen u.a. - bisher nicht zufriedenstellend gelöst werden.

Eine unzureichende Geschmacksstabilität äußert sich in der Entwicklung von Fehl- aromen, die als typischer Alterungsgeschmack wahrgenommen werden. Mit zunehmender Bieralterung weicht das angenehme Hopfen- und Esteraroma des frischen Bieres (Miedaner, 1991) zunächst einem ‚Ribes-Aroma‘, im weiteren Verlauf der Bieralterung dem sog. ‚Cardboard-Flavour‘ und schließlich süßlich-malzigen bis hin zu sherryartigen Geschmackseindrücken (Kunze, 2004).

Zur Entstehung alterungsrelevanter Aromastoffe tragen insbesondere folgende chemische Vorgänge bei:

- Thermische Reaktionen von Zuckern untereinander (Caramelisierung),
- Reaktionen von Zuckern mit Aminoverbindungen (Maillard-Reaktion),
- Reaktionen von Aminosäuren mit reaktiven Dicarbonylverbindungen (Streckerabbau),
- Bildung höhermolekularer Verbindungen (Reduktone, Melanoidine) aus den Maillard-Produkten,

- Oxidation höherer Alkohole während der Gärung,
- Oxidation von Isohumulonen aus dem Hopfen,
- Aldolkondensation gesättigter, sowie Autoxidation ungesättigter Aldehyde und
- oxidativer Lipidabbau.

Die wichtigsten Quellen für die Bildung von Alterungsstoffen - meist Carbonylen - sind oxidative Prozesse. Für die Synthese von Alterungscarbonylen spielt der Lipidabbau mit seinen Folgereaktionen eine zentrale Rolle. Die entstehenden gesättigten und ungesättigten Carbonylverbindungen weisen zum Teil extrem niedrige Schwellenwerte auf und können die geschmackliche Stabilität des Bieres nachhaltig beeinträchtigen.

Der Lipidabbau beginnt mit der durch Lipasen katalysierten Freisetzung von Fettsäuren aus Glycerinsäureestern. Die Speicherlipide werden so schon zu Beginn der Keimung als Energiequelle genutzt. Ausgangssubstrate für die Bildung alterungsrelevanter Aromastoffe sind die längerkettigen Fettsäuren mit 14 und 16, besonders aber solche mit 18 Kohlenstoffatomen. Der Abbau dieser ungesättigten Fettsäuren kann autoxidativ, lichtkatalysiert oder enzymatisch durch das Enzym Lipoxygenase erfolgen.

Die Lipoxygenase (linoleate:oxygen oxidoreductase, EC 1.13.11.12) ist ein in der Natur weit verbreitetes Enzym, das in allen höheren Pflanzen, aber auch Pilzen und Tieren gefunden wurde. Der Lipoxygenase-Stoffwechselweg gehört neben der α -, β - und ω -Oxidation zu den vier wichtigsten Enzymsystemen, durch deren Wirkung Fettsäuren oxidativ modifiziert werden. Zwar wird der größte Teil der mehrfach ungesättigten Fettsäuren über den Weg der β -Oxidation verstoffwechselt und dient während der Keimung als wichtige Energiequelle, dennoch spielt der Fettsäureabbau über den Lipoxygenase-Stoffwechselweg eine bedeutende Rolle insbesondere für die industrielle Bierherstellung. Die Lipoxygenase katalysiert als erstes Enzym dieses Weges die Hydroperoxidation solcher Fettsäuren, die ein *cis,cis*-1,4-Pentadien-System beinhalten. Die gebildeten Hydroperoxide können wiederum in verschiedene Sekundärmetaboliten umgewandelt werden, zu denen auch die Carbonylverbindungen gehören. Das Produkt der durch das Lipoxygenase-Isoenzym LOX-1 katalysierten oxidativen Umsetzung des Substrates Linolsäure ist 9-Hydroperoxy-Octadecadiensäure (9-HPOD), während die Aktivität des Isoenzym LOX-2 vor allem zur Bildung von 13-HPOD führt.

Den Hydroperoxy-Octadecadiensäuren wird als *Precursor* eine große Bedeutung für die Entstehung alterungsrelevanter Geschmacks Komponenten im Bier zugeschrieben (Drost et al., 1974; Tressl et al., 1979; Drost et al. 1990; Lustig, 1996). Damit ist die Verringerung der Lipoxygenase-Aktivität ein erfolgversprechender Ansatzpunkt für die Vermeidung des Alterungsgeschmackes im Bier.

Neben technologischen Maßnahmen zur Verbesserung der Geschmacksstabilität bietet die Verminderung der Lipoxygenase-Aktivität in den Rohstoffen neue Perspektiven zur Lösung des Problems. Bisher stehen der Brau- und Malzindustrie keine Gerstensorten zur Verfügung, die im Züchtungsprozess gezielt auf niedrige LOX-Aktivität selektiert wurden, obwohl dieses Merkmal wegen seiner hohen Heritabilität (Baxter, 1982; Schwarz & Pylar, 1984; Yang & Schwarz, 1995; Braun, 1996) für eine züchterische Bearbeitung besonders geeignet scheint. Einerseits wurde die Geschmacksstabilität in der Vergangenheit noch nicht als vorrangiges Ziel der Braugerstenzüchtung definiert, andererseits sind geeignete Selektionsmethoden für das *Screening* der Lipoxygenase-Aktivität in großen Kreuzungspopulationen nicht verfügbar. Es kann deshalb nicht verwundern, dass die Lipoxygenase-Aktivitäten der heute verwendeten Braugerstensorten von vielen Brauern als zu hoch eingeschätzt werden (stellvertretend: Bellmer, 2000).

Voraussetzung für eine gezielte Züchtung lipoxygenasearmer Braugerstensorten zur Versorgung der Brau- und Malzindustrie sind:

- Untersuchung der genetischen Variabilität von Lipoxygenase-Aktivitäten in verschiedenen Genotypen als Basis für die gezielte Auswahl von Kreuzungseltern,
- Aufklärung der molekularen Ursachen unterschiedlicher Lipoxygenase-Aktivitäten,
- Verfügbarkeit einfacher PCR-Marker für die schnelle und kostengünstige Selektion lipoxygenasearmer Genotypen in Züchtungspopulationen, die auf aufwendige Enzymanalysen auf der Basis von Mälzung und Probesuden vollständig verzichten kann.

Ziel des Forschungsvorhabens war die Aufklärung der molekularen Ursachen unterschiedlicher Lipoxygenaseaktivitäten verschiedener Gerstengenotypen und ggf. die Umsetzung dieser Erkenntnisse in ein System molekularer Marker für die züchterische Selektion.

II. Wissenschaftlich-technische Ergebnisse

II.1 Etablierung eines Assaysystems zur quantitativen Bestimmung der Lipoxygenaseaktivität

Voraussetzung für die sortenvergleichende Bestimmung der Lipoxygenaseaktivitäten ist die Verfügbarkeit eines robusten Assaysystems. Ein solcher LOX-Assay wurde zu Beginn des Projektes im FORSCHUNGSINSTITUT FÜR ROHSTOFFE entwickelt. Das Prinzip des quantitativen Nachweises beruht dabei auf der enzymkatalysierten Umsetzung des Substrates Linolsäure. Diese ungesättigte Fettsäure wird durch die Aktivität der Lipoxygenase in das entsprechende Hydroperoxyprodukt umgewandelt, das photometrisch bei einer Wellenlänge von 234 nm quantifiziert werden kann. Es war von grundlegender Bedeutung, eine Vorgehensweise zu etablieren, die die Oxidation des Substrates durch Luftsauerstoff weitgehend ausschließt.

Das entwickelte Protokoll erlaubt die reproduzierbare Bestimmung der Lox-Aktivität in Gerste, Grünmalz und gedarrtem Malz und zeichnet sich insbesondere aus durch:

- Eine Anpassung der Puffermenge an den Trockensubstanzgehalt der untersuchten Probe (vorherige Bestimmung des Wassergehaltes/Weichgrades); Ziel ist eine Konzentration von 100 mg TS/1600 µl Puffer
- Die kontinuierliche Kühlung des Ansatzes von der Herstellung des Extraktes bis zur Messung
- Reihenfolge der Komponentenzugabe vor der enzymatischen Umsetzung in der Küvette (Substrat muss vorgelegt werden)
- Einzelmessungen der Absorptionszunahme über eine Dauer von 180 Sekunden
- Blindwertmessung vor jeder Probenmessung (das Verhalten des Puffers verändert sich durch verschiedene Einflüsse)

Die Ergebnisse der Enzymtests werden jeweils in Extinktionswerten angegeben, eine Umrechnung in *lipoxygenase units* erfolgte nicht, da ein Abgleich mit Literaturdaten aufgrund der fehlenden Vergleichbarkeit der Analysenvorschriften nicht gegeben ist. Der Assay erfasst die Aktivitäten der beiden Isoenzyme LOX-1 und LOX-2, eine Differenzierung ist aufgrund der gleichen Substratspezifität beider Isoformen nicht möglich.

II.2 Bestimmung der Lipoxygenaseaktivitäten verschiedener Sommergerstensorten

Ausgangsmaterial für die Bestimmung der Lipoxygenaseaktivitäten waren Grünmalze der Braugerstensorten *Barke*, *Pasadena* und *Annabell* sowie der Futtergerstensorten *Henni*, *Orthega*, *Otira*, *Eunova*, *Adonis* und *Danor*. Im FORSCHUNGSINSTITUT FÜR ROHSTOFFE wurden diese aus orthogonalen Sortenversuchen stammenden Gersten im Rahmen eines weiteren Projektes bereits umfassend untersucht. Schwerpunkt dieser Arbeiten war die sortenvergleichende Aktivitätsmessung zellwand- und stärkeabbauender Enzyme.

Zur Bestimmung der Lipoxygenaseaktivität wurden die ausgewählten Genotypen im Anschluss an eine konventionellen Gerstenanalytik kleinvermälzt. In regelmäßigen Abständen von 24 Stunden wurden den Ansätzen Grünmalzproben entnommen und die Aktivität der Lipoxygenase umgehend photometrisch bestimmt (siehe II.1).

Zwischen den untersuchten Sorten zeigten sich deutliche Unterschiede der Lipoxygenaseaktivitäten bereits 24 Stunden nach Wasseraufnahme. Das Aktivitätsniveau steigerte sich im Keimverlauf kontinuierlich, und nach 5 Tagen konnte eine eindeutige Rangfolge der Sorten festgestellt werden, die in unabhängigen Wiederholungen Bestätigung fand. Die drei Braugersten sind dabei durch grundsätzlich höhere Lipoxygenaseaktivitäten gekennzeichnet als die Futtergersten. Ein gleiches Phänomen konnte auch bei der Analyse der cytolytischen und amylytischen Enzymaktivitäten beobachtet werden. Im Gegensatz zu diesen Enzymen gilt die Lipoxygenase jedoch nicht als Gibberellinsäure-induziert. Höhere GA-Gehalte können also nicht für die erhöhte Aktivität in *Barke*, *Pasadena* und *Annabell* verantwortlich sein. Eine verzögerte Keimung oder eingeschränkte Vitalität der Futtergersten konnten nicht beobachtet werden und scheiden als mögliche Erklärung für die niedrigeren Enzymaktivitäten ebenfalls aus.

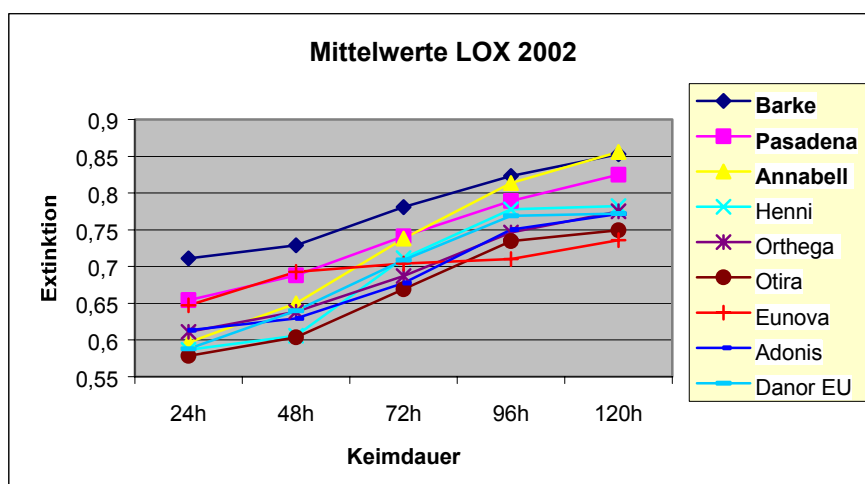


Abb.1
Lipoxygenaseaktivitäten in Grünmalzen verschiedener Brau- und Futtergersten.

II.3 Vergleichende Fettsäureanalytik

Für die Geschmacksstabilität des Bieres sind die Produkte der Lipoxygenaseaktivität, insbesondere die Di- und Trihydroxyfettsäuren, von wesentlicher Bedeutung. Eine Untersuchung der Fettsäuren sollte Aufschluss darüber geben, ob eine stärkere Enzymaktivität auch zu einer erhöhten Konzentration der relevanten Reaktionsprodukte führt. Auf der Grundlage der vorangegangenen Experimente wurden für die Fettsäureanalytik die Gerstensorten mit der höchsten bzw. niedrigsten Lipoxygenaseaktivität ausgewählt: *Annabell* und *Eunova*. Die gedarrten Malze dieser beiden Sorten dienten als Ausgangsmaterial für die Analyse der verschiedenen Fettsäuren mittels Kapillar-GC/MS. Ergänzt wurde diese Auswahl noch um das Malz einer ‚Low-Lox-Mutante‘. Hierbei handelt es sich um eine mutagenisierte Gerste der Sorte *Vintage*, die durch eine besonders niedrige Lipoxygenaseaktivität gekennzeichnet ist. Hervorgerufen wird die deutlich reduzierte Aktivität der Mutante durch die veränderte Besetzung einer einzelnen Aminosäureposition im LOX-1-Protein (Gly³⁶⁸→Asp³⁶⁸). Die Daten der Fettsäureanalytik wurden mit freundlicher Unterstützung von Herrn Dr. Leif-Alexander Garbe vom FORSCHUNGSINSTITUT FÜR CHEMISCH-TECHNISCHE ANALYSE der VLB Berlin erhoben. Die Ergebnisse können Tab. 1 entnommen werden.

Fettsäure	Eunova		Annabell		Mutante	
	Alkanphase	polare Phase	Alkanphase	polare Phase	Alkanphase	polare Phase
C14:0		6	28	20	22	21
C16:0	2430	1030	2180	1210	1730	1180
C18:0	131	40	145	62	130	63
C18:1	1510	500	1170	500	600	310
C18:2	7160	2920	6530	3400	4820	3240
C18:3	780	415	865	580	780	595
9-HOD	47	21	107	70	52	29
13-HOD	59	30	102	54	55	39
9,10-DHOE	1	<1	7	<1	1	<1
12,13-DHOE	2	<1	40	6	10	<1
THOE		67		15		25

Tab. 1 Vergleichende Fettsäureanalytik von Malzen mittels Kapillar-GC/MS

Die Quantifizierung der Fettsäuren in den Malzen zeigt deutlich, dass die Sorte *Eunova* erheblich geringere Gehalte der relevanten Hydroxyfettsäuren 9-HOD und 13-HOD aufweist als die Sorte *Annabell* und die Werte sogar noch unter denen der untersuchten Mutante liegen. Die Erwartung einer positiven Korrelation zwischen dem Aktivitätsniveau der Lipoxygenase im keimenden Korn und der Konzentration der Dihydroxyfettsäuren im gedarrten Malz wurde hiermit bestätigt. Der erhöhte Wert für die Trihydroxyfettsäure THOE in *Eunova* kann zur Zeit noch nicht erklärt werden .

II.3 Expressionsstudien der Lipoxygenasegene

Genotypenabhängige Unterschiede hinsichtlich der Lipoxygenaseaktivität in keimenden Körnern können verschiedene qualitative oder quantitative Ursachen haben. Es besteht die Möglichkeit, dass die geringere Aktivität in der Gerstensorte *Eunova* aus einer gegenüber *Annabell* reduzierten Verfügbarkeit des Enzyms resultiert. Diese wiederum könnte ihre Ursache in einer herabgesetzten Transkription der entsprechenden Gene haben. Im FORSCHUNGSINSTITUT FÜR ROHSTOFFE konnte beispielsweise gezeigt werden, dass eine Mutationen im Promotor des β -Amylase-Gens in einigen Wintergersten die Transkriptionsrate des entsprechenden Gens negativ beeinflusst und letztendlich zu einer messbaren Reduktion der β -Amylase-Aktivität in den Körnern führt (Voetz, 2004).

Die Messung der Transkriptionsintensität (Genexpression) der Lipoxygenasegene erfolgte über die Quantifizierung der mRNA im LightCycler. Zu diesem Zweck wurde zunächst mRNA aus den Grünmalzen nach 72-stündiger Weich-/Keimzeit aufgereinigt. Auch für diesen experimentellen Ansatz repräsentierten die Sorten *Annabell* und *Eunova* Genotypen mit besonders hoher bzw. niedriger Lipoxygenaseaktivität. Das Design selektiver Oligonukleotid-Primer ermöglichte die differenzierte Betrachtung der beiden Isoformen Lox-1 und Lox-2 (Abb.2).

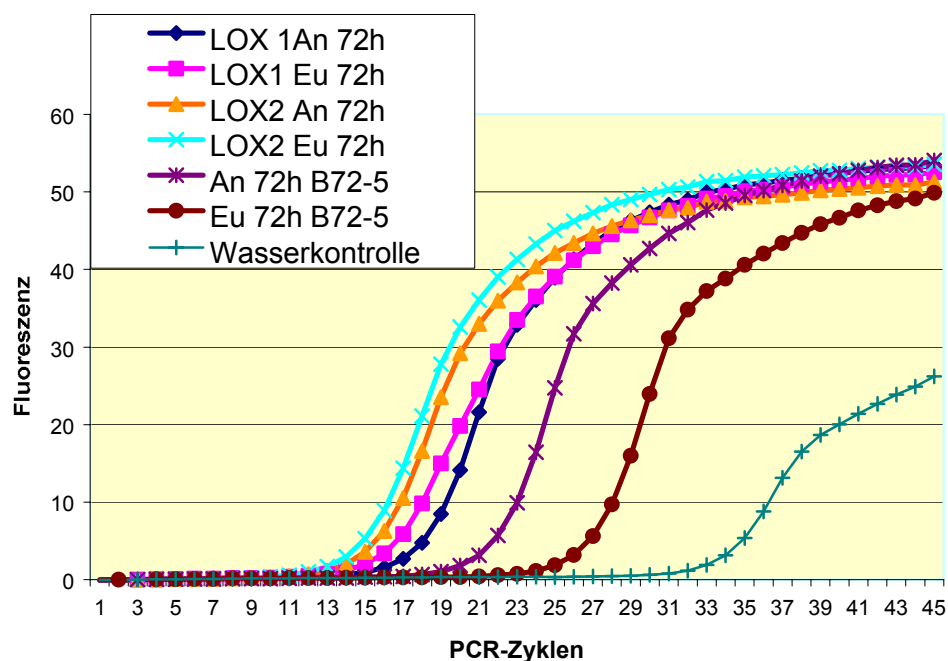


Abb. 2 Real Time rtPCR zur quantitativen Bestimmung der Lox-1 - und Lox-2 mRNAs aus den Sorten *Annabell* und *Eunova*. B72-5 Transkripte dienen als Beispiel einer differentiellen Genexpression.

Das Gen B72-5 dient als Kontrollbeispiel für eine differentielle Expression in keimenden Körnern der beiden untersuchten Gerstensorten.

Am Ende eines jeden Amplifikationszyklus lagert sich der eingesetzte Fluoreszenzfarbstoff in die synthetisierte doppelsträngige DNA (PCR-Produkt) ein. In Abhängigkeit von einer im Ansatz vorhandenen Menge der zu quantifizierenden Ziel-RNA bzw. -cDNA wird die Detektionsgrenze in einem früheren oder späteren PCR-Zyklus erreicht. Die Zunahme der Fluoreszenz wird dann in einer Kurve abgebildet (Abb. 2). Die Auswertung des vorliegenden Experimentes ergab, dass

- in keimenden Körnern beider Sorten 72 Stunden nach Wasseraufnahme die Konzentration der Lox-2 mRNAs höher ist als die der Lox-1 mRNAs,
- in keimenden Körnern der Sorte *Annabell* keine höhere Konzentration an Lox-1 mRNAs als in *Eunova* nachgewiesen werden konnte,
- keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden untersuchten Sorten hinsichtlich der Lox-2 Transkripte bestehen und somit
- die Transkriptionsraten der Lox-Gene keine zentrale Bedeutung für die unterschiedliche Ausprägung der Lipoxygenaseaktivitäten haben.

II.4 Untersuchung des Temperatureinflusses auf die Lipoxygenase-Aktivität

Die Fettsäureanalytik hat gezeigt, dass sich die Gehalte der relevanten Monohydroxysäuren genotypenabhängig erheblich unterscheiden (Tab. 1). Der in *Eunova*-Malz gemessene 9-HOD-Wert beträgt weniger als ein Drittel des Wertes, der für Malz der Sorte *Annabell* bestimmt wurde. Dies ist insofern überraschend, als dass sich die Lipoxygenaseaktivitäten in den Grünmalzen der beiden Sorten über den gesamten Keimverlauf nur um maximal 25% unterscheiden (Abb. 1).

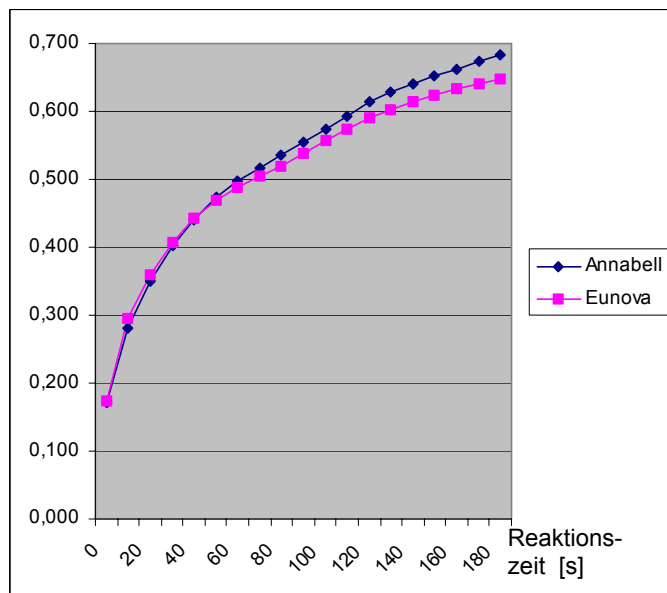
Der Prozessschritt vom Grünmalz zum Darmmalz ist durch eine zunehmende thermische Belastung der während der Keimung aktiven Enzymsysteme gekennzeichnet. Eine Ursache für die hohen 9-HOD- und 13-HOD-Gehalte im *Annabell*-Malz könnte daher eine ausgeprägte Thermostabilität der Lipoxygenase(n) sein. Während der Keimung erfolgt der natürliche Substratumsatz bei 16°C, einer Temperatur, die unterhalb des Optimums liegt. Es ist also zu erwarten, dass die enzymkatalysierte Fettsäureoxidation in der Schwelkphase erheblich zur Produktion der Hydroxyfettsäuren beiträgt, insbesondere wenn die Lipoxygenase ihre Aktivität bei Temperaturen bis über 50°C aufrecht erhalten kann.

Grünmalzextrakte der Sorten *Annabell* und *Eunova* wurden in unabhängigen Experimenten einer zweiminütigen Temperatureinwirkung ausgesetzt und anschliessend die verbliebenen Lipoxygenaseaktivitäten bestimmt. Es wurden die Enzymaktivitäten nach Temperaturbehandlung bei 30°C, 40°C, 50°C, 60°C und 70°C gemessen. Das

Aktivitätsniveau sinkt in den *Annabell*-Extrakten bis zu einer Temperatur von 60°C nur leicht ab, in den *Eunova*-Extrakten steigt es sogar leicht an. Erst bei einer Temperatur von 70 °C können für beide Sorten deutliche Aktivitätsverluste beobachtet werden. *Annabell* und *Eunova* sind jedoch nicht durch signifikant unterschiedliche Thermostabilitäten ihrer Lipoxygenasen gekennzeichnet.

II.5 Bestimmung der Lipoxygenase-Aktivitäten in Gerstenextrakten

Das Isoenzym Lox-1 liegt bereits in der ungekeimten Gerste vor, während Lox-2 vorwiegend während der Keimung *de novo* synthetisiert wird. Neben der Bestimmung der Lipoxygenaseaktivitäten in Grünmalzextrakten ist daher auch die Untersuchung von Extrakten aus ungekeimter Gerste notwendig.



In *Annabell* kann im Vergleich zu *Eunova* nach einem dreiminütigen Enzymassay eine leicht erhöhte Aktivität festgestellt werden (Abb. 3). Die Extinktionen erreichen in beiden Gerstensorten ähnliche Werte, wie nach 24-stündiger Weichzeit. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass ein wesentlicher Teil der unterschiedlichen Lipoxygenaseaktivitäten auf das Isoenzym Lox-1 zurückzuführen sind.

Abb. 3 Messung der Lipoxygenaseaktivität in Extrakten aus ungekeimter Gerste

II.6 Vergleichende Sequenzierung der Lipoxygenase-Gene

In einem ersten Schritt beschränkte sich die Ermittlung der DNA-Sequenzen auf das Gen, welches für das Isoenzym Lox-1 codiert. Dieses Gen besteht aus sieben Exons, die von sechs Introns unterbrochen werden (Abb. 4). Insgesamt ergibt sich daraus ein proteincodierender Bereich von ca. 2660 bp. Auf der Basis einer publizierten Referenzsequenz (*Vintage*) wurden zunächst Oligonukleotid-Primer entwickelt, mit deren Hilfe eine PCR-gestützte Amplifikation der codierenden Sequenzabschnitte möglich ist. Insgesamt waren fünf unabhängige PCR-Ansätze notwendig, um den gesamten relevanten Sequenzbereich abzudecken. Ausgangsmaterial für die PCR war genomische DNA, die aus jungen Blättchen der ausgewählten Gerstensorten aufgereinigt wurde. Die PCR-Produkte wurden anschliessend kloniert und die

DNA-Sequenzen ermittelt. Es wurden die Lox-1-Gensequenzen der Sorten *Annabell*, *Eunova*, *Cree* sowie des Züchterstammes *LP68* entschlüsselt und mit der bereits publizierten Sequenz der Sorte *Vintage* verglichen. *Annabell* und *Eunova* repräsentieren Genotypen mit hoher bzw. niedriger Lipoxygenaseaktivität (II.2). Die amerikanische Gerstensorte *Cree* wurde in der Literatur als Genotyp mit niedriger Aktivität beschrieben (Wu et al., 1997), für den Zuchtstamm *LP68* wurde ebenfalls eine reduzierte Lipoxygenaseaktivität vermutet.

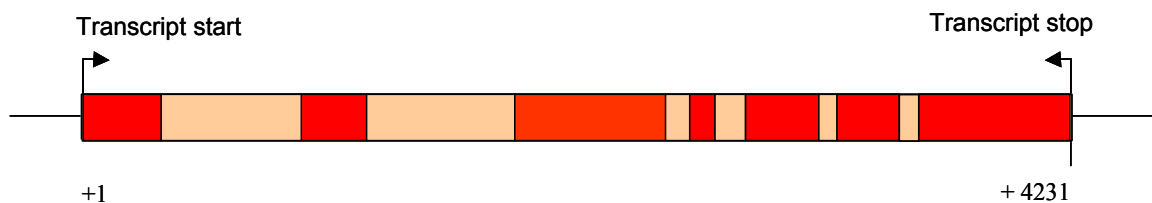


Abb. 4 Mosaikstruktur des Lox-1-Gens

Die codierenden Bereiche der Lox-1 Gene aus den genannten Genotypen sind identisch, es konnten keine Sequenzpolymorphismen identifiziert werden. Zwar konnten nach der Sequenzierung der PCR-Produkte einzelne Basenaustausche zwischen den Sorten festgestellt werden, in einer Wiederholung konnten diese Polymorphismen jedoch nicht verifiziert werden. In solchen Fällen muss von einer fehlerhaften Synthese durch die Taq-Polymerase während der PCR ausgegangen werden.

Die vergleichende Sequenzierung wurde im zweiten Schritt auf das Gen für das Isoenzym Lox-2 ausgedehnt. Hier liegt als Referenzsequenz eine cDNA aus der alten Braugerstensorte *Triumph* vor. Mit vier unabhängigen PCR-Ansätzen konnte der gesamte codierende Bereich abgedeckt werden. Als Ausgangsmaterial für die PCR-gestützte Vervielfältigung diente mRNA, die aus keimenden Körnern der ausgewählten Sorten aufgereinigt wurde. Im Gegensatz zu Lox-1 konnten innerhalb des Lox-2 Gens zehn DNA-Polymorphismen identifiziert und verifiziert werden, die sich zum Teil auch in einer veränderten Aminosäuresequenz äußern (Abb. 5). Auf der Basis der identifizierten Polymorphismen lassen sich Sortengruppen bilden. Im 5'-Bereich des Lox-2 Gens sind bzgl. der ersten beiden Polymorphismen die Sorten *Cree*, *Eunova* und *Triumph* identisch, während *Annabell* und *LP68* die zweite Gruppe bilden. Im weiteren Sequenzverlauf ist die DNA-Sequenz aus *Cree* identisch mit

Annabell und LP 68. *Eunova* und *Triumph* unterscheiden sich von diesen Sequenzen und zeigen untereinander eine identische DNA-Sequenz.

<i>Annabell</i>	...VANSWVYPQAKYR H NRVFFANDTYLPHQMP P ALKPYRDD...
<i>Cree</i>	...VANSWVYPQAKYR Y NRVFFANDTYLPHQMP A ALKPYRDD...
<i>Eunova</i>	...VANSWVYPQAKYR Y NRVFFANDTYLPHQMP A ALKPYRDD...
<i>LP68</i>	...VANSWVYPQAKYR H NRVFFANDTYLPHQMP P ALKPYRDD...
<i>Triumph</i>	...VANSWVYPQAKYR Y NRVFFANDTYLPHQMP A ALKPYRDD...

Abb. 5 Von DNA-Sequenzen abgeleitete Aminosäuresequenz im Sortenvergleich (Ausschnitt). Unterschiedlich besetzte Aminosäurepositionen sind markiert.

Die Bedeutung dieser unterschiedlichen allelischen Ausprägung des Lox-2 Gens - insbesondere der Sorten *Annabell* und *Eunova* - für die Lipoxygenaseaktivität bzw. die Synthese der geschmacksrelevanten Hydroxyfettsäuren konnte im Rahmen dieses Forschungsprojektes nicht geklärt werden. Beachtenswert ist jedoch, dass sich die Aminosäuresequenzen der Sorten mit den deutlichsten Unterschieden hinsichtlich der Lipoxygenaseaktivitäten (*Annabell* und *Eunova*) molekulargenetisch erheblich unterscheiden.

II. 7 Markerentwicklung

Insbesondere dem Isoenzym Lox-1 wird eine wesentliche Bedeutung für die keimungsabhängige Synthese geschmacksrelevanter Hydroxyfettsäuren zugeschrieben. Gersten, die als *low lox* oder *no lox* Genotypen beschrieben wurden, tragen Mutationen im Lox-1 Gen. Diese Genotypen sind allerdings patentrechtlich geschützt und für die züchterische Nutzung nicht verfügbar.

Im Rahmen dieses Projektes wurde die Futtergerste *Eunova* als Genotyp mit herabgesetzter Lipoxygenaseaktivität identifiziert. Das Lox-1 Gen aus *Eunova* unterscheidet sich jedoch nicht von den Lox-1 Genen aus den anderen untersuchten Gersten. Aufgrund der fehlenden allelischen Variation konnte daher kein Marker für ein vorteilhaftes Lox-1 Gen entwickelt werden.

Das Isoenzym Lox-2 hingegen liegt in mindestens zwei unterschiedlichen allelischen Ausprägungen vor, die auch Einfluss auf die Aminosäuresequenz des Enzymproteins haben. Auf der Basis der identifizierten DNA-Polymorphismen konnte ein selektiver PCR-Marker entwickelt werden, der die spezifische Erkennung jenes Lox-2 Allels erlaubt, das in den Gerstensorten *Eunova* und *Triumph* vorkommt (Abb. 6). Die Überprüfung des Markers an einem ausgewählten Sortiment zeigte, dass dieses Allel allerdings nicht zwangsläufig mit einer niedrigen Lipoxygenaseaktivität korreliert ist.

So trägt die Sorte *Pasadena* das *Eunova*-Allel, ist aber durch eine hohe Enzymaktivität gekennzeichnet (Abb. 1).



Abb. 6 PCR-Marker zum Nachweis des Lox-2 Allels aus *Eunova*. 1 = *Annabell*, 2 = *Eunova*, 3= *Cree*, 4= *LP68*, 5 = *Triumph*

III. Zusammenfassung und Ausblick

Die im Rahmen dieses Forschungsprojektes untersuchten Gerstensorten zeichnen sich durch unterschiedliche Lipoxygenaseaktivitäten in keimenden Körnern aus. Dabei sind die analysierten Braugersten durch eine grundsätzlich höhere Aktivität charakterisiert als die Futtergersten. Die Lipoxygenase zeigt im Sortenvergleich somit ein ähnliches Verhalten wie die für die Brau- und Malzqualität relevanten zellwand- und stärkeabbauenden Enzyme. Im Gegensatz zu diesen Enzymen wird jedoch für die Lipoxygenase eine möglichst geringe Aktivität zur Verbesserung der Bierqualität angestrebt.

Die besonders niedrige Lipoxygenaseaktivität der Futtergerste *Eunova* resultiert im Vergleich zur Braugerste *Annabell* in deutlich geringeren Gehalten der geschmacksrelevanten Hydroxyfettsäuren im fertigen Malz. Auf der Grundlage von Genexpressionsstudien konnte gezeigt werden, dass die Syntheseraten der beiden Isoformen Lox-1 und Lox-2 in beiden Sorten jeweils nahezu gleich sind und somit keinen entscheidenden Einfluss auf die Enzymniveaus und damit die Synthese der Hydroxyfettsäuren haben sollten. Auch hinsichtlich der Thermostabilitäten konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen der Lipoxygenase aus *Annabell* und *Eunova* festgestellt werden. Ein interessantes Ergebnis brachten die Enzymbestimmungen in ungekeimter Gerste. Die Futtergerste ist schon vor der Keimung durch ein geringeres Aktivitätsniveau gekennzeichnet als die Braugerste. Es ist geplant, die Promotorsequenzen der Lox-1-Gene aus beiden Genotypen zu entschlüsseln, da hier die Ursache für unterschiedliche Expressionsniveaus während der Kornentwicklung identifiziert werden könnte.

Für das Lox-1 Gen konnte keine allelische Variabilität zwischen den Sequenzen aus fünf verschiedenen Gerstensorten gefunden werden, so dass hierfür auch keine Markerentwicklung möglich war. Im Gegensatz hierzu konnten für das Gen des Isoenzym Lox-2 zahlreiche DNA-Sequenzpolymorphismen identifiziert werden, die

sich zum Teil auch in der unterschiedlichen Besetzung definierter Aminosäurepositionen im Enzymprotein äußern. Die Polymorphismen konnten für das Design selektiver PCR-Primer genutzt werden, die als Marker für die Identifikation des möglicherweise positiv zu bewertenden Lox-2 Gens aus *Eunova* dienen. Im Anschluss an das Forschungsprojekt soll dieser Marker an einer Vielzahl von Gerstengenotypen getestet werden. In parallelen Enzymassays soll geprüft werden, ob die angestrebte Marker-Merkmal Korrelation hergestellt werden kann.

Die vergleichende Sequenzanalyse des Lox-1 Gens aus verschiedenen Genotypen liefert einen weiteren Beleg für die bereits beschriebene Verengung des Genpools aktueller europäischer Gerstensorten. In der Zukunft werden ‚exotische Genotypen‘ von zunehmender Bedeutung für die züchterische Erweiterung des Genpools um qualitätsverbessernde enzymatische Eigenschaften sein. Dies gilt auch für die Lipoxygenase. Es ist zu vermuten, dass die weltweit verfügbaren genetischen Ressourcen auch Gersten beinhalten, die durch stark reduzierte oder sogar fehlende Lipoxygenaseaktivitäten charakterisiert sind. Ein entsprechendes Screening-Programm wird im FORSCHUNGSINSTITUT FÜR ROHSTOFFE in naher Zukunft begonnen.

IV. Literatur

Baxter ED (1982), J. Inst. Brew. 88: 390-396.

Bellmer HG (2000), BayWa/Agrar, 1. Braugersten-Forum, 11. Juli 2000, Hannover.

Braun (1996), Technische Universität Berlin, Diplomarbeit.

Drost BW, Duindam J, Hoekstra SF, Straiting J (1974), Tech. Q. Master Brew. Assoc. Am. 11: 127-134.

Drost BW, van den Berg R, Freijee FJM, van der Velde EG, Hollemans M (1990), J. Am. Soc. Brew. Chem. 48: 124-131.

Kunze, W (1998), Technologie Brauer und Mälzer, 8. Aufl. VLB Berlin

Lustig, S (1996), Technische Universität München, Dissertation.

Schwarz PB, Pyle RE (1984), J. Am. Soc. Brew. Chem. 42: 47-53.

Tressl R, Bahri D, Silwar R (1979), Eur. Brew. Conv., Proc. Congr. 17th, Berlin: 27-41.

Voetz, M (2004), Proceedings World Brewing Congress 2004, San Diego.

Wu Y, Schwarz, PB, Doehlert, DC, Dahlee, DS, Horsley, RD (1997), J. Cereal Sci 25: 39-56.

Yang G, Schwarz PB (1995), J. Am. Soc. Brew. Chem. 53: 45-49.