



Projekt Nr.: B 92

„Exotische Genotypen‘ als Quelle verbesserter Enzymeigenschaften moderner Braugerstensorten“

Bericht

Forschungsstelle I:

Versuchs- und Lehranstalt für Brauerei in Berlin
e.V. (VLB)
Forschungsinstitut für Rohstoffe
Seestraße 13, 13353 Berlin
Tel.: +49 3045080154
Fax: +49 30 4531390
E-Mail: rath@vlb-berlin.org
Internet: www.vlb-berlin.org

Leiter der Forschungsstelle:
Dipl.-Kfm. Eberhard Weinmann

Projektleiter:
Prof. Dr. Frank Rath

Bewilligungszeitraum: 01.01.2006 – 31.12.2006

**Eine Publikation dieses Berichtes oder der hierin aufgeführten Daten
ist ohne Zustimmung der Projektleitung nicht gestattet.**

Berlin, 15.02.2011

(Prof. Dr. Frank Rath)

Das oben genannte Forschungsvorhaben wird/wurde über die Wissenschaftsförderung der Deutschen Brauwirtschaft e.V. (Wifö) im Rahmen der Gemeinschaftsforschung der deutschen Brauwirtschaft gefördert.

ZUSAMMENFASSUNG

Ziel des Forschungsprojektes war die Identifizierung von ‚exotischen Gersten-Genotypen‘ mit besonderen enzymatischen Eigenschaften, insbesondere mit einer im Vergleich zu bekannten Braugerstensorten erhöhten Thermostabilität wichtiger Schlüsselenzyme des amylolytischen und cytolytischen Abbaus. Interessante Genotypen sollten mit Hilfe molekularbiologischer Methoden analysiert werden, um bisher unbekannte Ausprägungsformen dieser Gene wichtiger Enzyme zu erkennen und die entschlüsselten DNA-Sequenzunterschiede für die Entwicklung selektiver PCR-Primer nutzbar zu machen. Diese spezifischen Primer ermöglichen das Auffinden des gewünschten Allels in Kreuzungspopulationen aus etablierten Braugerstensorten und exotischen Genotypen. Sie bilden damit die Grundlage für das gezielte Einbringen neuartiger enzymatischer Eigenschaften in den genetischen Hintergrund vorhandener Standardsorten.

Ein wichtiges Teilziele des Projektes war die Beschaffung und Vermehrung ‚exotischer Genotypen‘ als Grundlage für ein umfassendes Monitoring enzymatischer Eigenschaften. In Zusammenarbeit mit verschiedenen Genbanken in Deutschland, Japan, den USA und Skandinavien konnte dieses Teilziel in vollem Umfang erreicht werden. Mehr als 6000 repräsentative Genotypen aus mehr als 40 Herkunftsgebieten wurden über Datenbanken selektiert und aus den Sammlungen der Genbanken bereitgestellt. Alle Genotypen mussten in Deutschland vermehrt werden, da die Genbanken für die meisten Genotypen nicht mehr als max. 10 und 50 Einzelkörner zur Verfügung stellen konnten. Aufgrund der sehr geringen Materialmengen mussten in vielen Fällen über die ursprüngliche Planung hinaus zwei Vermehrungszyklen durchgeführt werden, um die für eine Mikromälzung notwendigen Gerstenmengen zu erreichen. Etwa 10% der ursprünglich aus Genbanken bezogenen Genotypen konnten nicht vermehrt werden, da sie unter den gegebenen Anbaubedingungen die generative Phase nicht erreicht haben.

Ein weiteres Teilziel des Projektes sah die Vermälzung aller Genotypen vor als Basis für das Monitoring enzymatischer Eigenschaften. Mehr als 5500 Genotypen, von denen nach der Vermehrung jeweils mehr als 50 g Gerste verfügbar waren, konnten erfolgreich vermälzt werden. Dabei entstand gegenüber der ursprünglichen Planung ein Mehraufwand durch die bei vielen Gersten notwendige intensive Reinigung. Anders als von etablierten Braugerstensorten gewohnt, waren die handgeernteten und im Einzelährendrusch verarbeiteten ‚Exoten‘ teilweise stark verschmutzt und/oder wiesen eine sehr stabile Begrannung auf, die in zusätzlichen Arbeitsgängen mühevoll entfernt werden musste. Die gereinigten Gersten konnten anschließend problemlos verarbeitet werden. Das Material zeigte überwiegend eine gute Keimfähigkeit und eine weitgehend normale Wasseraufnahme während des Mälzungsprozesses. Erwartungsgemäß variiert

te die Keimungsintensität in weiten Grenzen, so dass unmittelbare Vergleiche der Aktivität verschiedener Enzyme (absolute Werte) nur eingeschränkt möglich waren.

Wichtige Vorarbeiten im Hinblick auf das Monitoring der Enzymaktivität waren im Bereich der Entwicklung von Hoch-Durchsatz-Verfahren enzymatischer Analysen zu leisten. Aufbauend auf den bereits im Institut vorhandenen Erfahrung konnten Mikrotiterplatten-basierte Testverfahren für β -Amylase, Grenzextrinase, Xylanase und β -Glucanase erfolgreich entwickelt werden. Die Anpassung an die geringen Volumina einer Mikrotiterplatte brachten für das Screening einer Vielzahl von Genotypen entscheidende Vorteile: i. geringe Materials mengen, ii. geringe Volumina iii. hohe Reproduzierbarkeit durch Temperierung im Thermocycler. Alle Anpassungen basierten auf kommerziell verfügbaren Testkits der Fa. Megazyme.

Das Hauptziel des Forschungsprojektes war das Monitoring der Aktivität und vor allem der Thermostabilität wichtiger Enzyme des Stärkeabbaus und der Zellwandlösung. Hierzu wurden für Amylase, Grenzextrinase, Glucanase und Xylanase nach einer Temperaturbehandlung der Malzextrakte bei verschiedenen Temperaturstufen im Rahmen des Projektes insgesamt etwa 100.000 enzymatische Analysen durchgeführt. Für die Enzyme Grenzextrinase und Glucanase konnten im Rahmen des Monitorings interessante Genotypen mit einer vom europäischen Standard abweichenden Thermostabilität gefunden werden.

Etwa 0,5 Prozent der untersuchten Genotypen zeigten eine um mindestens $2,5^{\circ}\text{C}$ höhere Thermostabilität des Enzyms Grenzextrinase verglichen mit europäischen Standard-Braugersten. Ein geringer Teil diese Genotypen wies eine noch höhere Thermostabilität von 5°C oder sogar $7,5^{\circ}\text{C}$ über dem Standard. Die gefundenen Genotypen stammen aus sehr geographischen Regionen, darunter Indien, China, Afghanistan, Peru, Russland, Turkmenistan, Norwegen und Dänemark.

Auch für die Glucanase wurden Genotypen mit erhöhter Thermostabilität gefunden. Interessante Genotypen zeigten eine um 5°C höhere Thermostabilität als europäische Vergleichsgersten. Damit könnte die Thermostabilität dieser Glucanasen ausreichen, um im Rahmen moderner Sudverfahren mit Einmischtemperaturen von 62°C ausreichend hohe Restaktivitäten bereitzustellen, für einen signifikanten Abbau der während des Maischprozesses aus dem Malz extrahierten Glucane. Die identifizierten Genotypen stammten vorwiegend aus Ethiopien, daneben aus Bolivien und Turkmenistan. Die Versuche mit Xylanasen und Amylasen verliefen weniger erfolgreich. Hier wurden keine Geotypen gefunden, deren Thermostabilität die der Vergleichsgersten übertrifft.

Aufbauend auf den Ergebnissen des Enzymmonitoring wurden vergleichende Sequenzierungen der Enzymgene für das Grenzextrinase- und Glucanase-Gen vorgenommen. Projektziel war die Aufdeckung vorhandener Sequenzunterschiede der DNA als

Grundlage für die Entwicklung spezifischer PCR-Marker für den späteren Einsatz in der Braugerstenzüchtung.

Das Grendextrinase-Gen der interessanten Genotypen mit erhöhter Thermostabilität zeigte zahlreiche Polymorphismen im Vergleich zur Sequenz europäischer Standard-Braugerste. Die Polymorphismen beschränkten sich auf bestimmte, immer wiederkehrende Bereiche des Grendextrinase-Gens, sie traten dabei jedoch in unterschiedlichen, für den einzelnen Genotyp typische Kombinationen auf. Jeder der analysierten Genotypen verfügte über ein eigenes Grendextrinase-Allel, mit einem einzelnen Basenaustausch oder einer spezifischen Kombination von Austauschungen. Unter diesen Bedingungen war es nicht möglich, auf der Gensequenz unmittelbare Rückschlüsse auf die Ursachen unterschiedlicher Thermostabilität zu ziehen. Im Hinblick auf die spätere Verwendung in der Züchtung ist dies jedoch nicht erforderlich. Die ermittelten Sequenzunterschiede zum mitteleuropäischen Standard erlauben es für jeden ‚Exoten‘ geeignete spezifische Primer für die Selektion zu entwickeln. Die Primerentwicklung ist jedoch erst sinnvoll, wenn im Einzelfall feststeht, welcher ‚exotische Genotyp‘ mit erhöhter Thermostabilität als Kreuzungselter in der Braugerstenzüchtung eingesetzt werden soll.

Für das Glucanase-Gen wurden vergleichbare Ergebnisse erzielt. Der Anteil thermostabiler Genotypen an der Gesamtzahl untersuchter Gersten war deutlich geringer als bei der Grendextrinase. Auch hier zeigten die Genotypen mit erhöhter Thermostabilität zahlreiche Polymorphismen, deren Auftreten jedoch zwischen den Genotypen stark variierte. Wie bereits für die Gendextrinase beschrieben, gibt es nicht ein spezifisches Glucanase-Allel mit definierten Basenaustauschen, das in allen thermostabilen Genotypen enthalten ist. Vielmehr zeigten die verschiedenen Genotypen unterschiedliche Kombinationen von Basenaustauschen. Diese Polymorphismen sind kaum geeignet, um die erhöhte Thermostabilität der Glucanase im Einzelfall ursächlich zu erklären, sie sind aber sehr wohl geeignet, um spezifische Marker zu entwickeln, mit denen interessante Nachkommen in einer Kreuzungspopulation mit einer Standardgerste eindeutig identifiziert werden können.