Lehrstuhl für Technische Mikrobiologie

Charakterisierung oberflächenaktiver Proteine aus *Fusarium* spp. und deren Einfluss auf die Blasenstabilisierung in Bier

Michael Wolfram Zapf

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr.-Ing. Eberhard Geiger

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. rer. nat. habil. Rudi F. Vogel
2. Univ.-Prof. Dr.-Ing., Dr.-Ing. habil. Werner Back

Die Dissertation wurde am 10.05.2006 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 04.07.2006 angenommen.

Danke!

Water shapes its course according to the nature
of the ground over which it flows.
Just as water retains no constant shape
...there are no constant conditions.
Sun Tzu

Bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Rudi F. Vogel möchte ich mich herzlich für die Möglichkeit bedanken, diese Doktorarbeit am Lehrstuhl für Technische Mikrobiologie anzufertigen. Danke für das Vertrauen, alle Freiräume in der Gestaltung des Themas und die Möglichkeit zur Weiterbildung auf so vielen Gebieten!

Herrn PD Dr. Ludwig Niessen danke ich für die gute Zusammenarbeit in all den Jahren und für das viele, was ich von ihm über die wundersame Welt der Pilze lernen durfte.

Dr. Simone Theisen danke ich für gute kollegiale Jahre im Labor und den unglaublichen Fleiß bei der Jagd nach Genen! Eva Leitner, Monika Hadek und Hans Besner sen. danke ich dafür, dass sie mich immer unterstützten, wenn ich Ihre Hilfe oder Werkzeuge brauchte. Meinen Kollegen danke ich für gute Laborgemeinschaft und die unvergessliche Zeit am Institut.

Dank schulde ich auch meinen Diplomanden Uli Schmolke für Engagement in der chromatographischen Methodenentwicklung sowie Optimierung von Kulturbedingungen und Robert Hix für Untersuchungen von Pilzproteinen und Malzen durch Western Blotting, meinen Semester-, Projekt- und Studienarbeitern Martin Heinrich, Karin Jaindl, Katharina Leidl, Saara Müller und Irmgard Janker-Obermeier für die gute Zusammenarbeit in den Bereichen Proteinpräparation, 2D-Gelelektrophorese, Western Blotting und Messung von Oberflächenhydrophobizität.

Mein Dank gilt ferner der Arbeitsgemeinschaft industrieller Forschungsvereinigungen „Otto v. Guericke" e.V. (AiF) und der Wissenschaftsförderung der Deutschen Brauwirtschaft e.V. für Finanzierung des Projekts.

Meinen Eltern und Lea kann ich kaum mit Worten für die Unterstützung und das Vertrauen danken, die ich von ihnen erfahren habe.

Abkürzungen

ANS	1-anilino-8-naphtalin-sulfonsäure (hier: Ammoniumsalz)
APS	Ammoniumpersulfat
BCIP	5-brom-4-chlor-3-indolylphosphat
CAPS	3-(cyclohexylamino)-1-propansulfonsäure
CBB	*Coomassie Brilliant Blue*
CBS	Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, NL
CHAPS	3-(3-cholamido-propyldimethyl-amino)-propansulfonsäure
CTAB	N-cetyl-N,N,N-trimethylammoniumbromid
Cycloten	2-hydroxy-3-methylcyclopent-2-enon
DTT	1,4-dithio-D,L-threitol
ELISA	Enzyme-linked immuno-assay
F.	*Fusarium*
HLB-Wert	*Hydrophil-lipophil-balance*-Wert
IgG	Immunglobulin G
KAK	Kritische Aggregationskonzentration (bei Proteinen)
KMK	Kritische Mizellkonzentration (bei Detergentien)
MWCO	*molecular weight cut-off*
n x g	n-fache Erdbeschleunigung (1 x g=9,8 m/s²)
NBT	p-Nitrotetrazoliumblau
PTFE	Polytetrafluorethylen
S.	*Saccharomyces*
Sc.	*Schizophyllum*
SDS	Natriumdodecylsulfat *(sodium dodecyl sulfate)*
SNA	Synthetischer nährstoffarmer Agar
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin
TFA	Trifluoressigsäure (*trifluoroacetic acid*)
Tricin	N-[tris(hydroxymethyl)-methyl]-glyzin
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TRIS-HCl	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan-hydrochlorid
Tween 20	Polyoxyethylensorbitanmonolaureat
Tween 80	Polyoxyethylensorbitanmonooleat
U/min	Umdrehungen pro Minute
ÜSV	Überschäumvolumen

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung 1

1.1 Gushing oder Wildwerden 1
1.2 Primäres und sekundäres Gushing – eine Abgrenzung 1
1.3 Mögliche Faktoren bei primärem Gushing 3
1.3.1 Physikalische und anorganische Faktoren 3
1.3.2 Proteine und Peptide als Gushingfaktoren 4
1.3.2.1 Proteine aus Gushingmalzen 5
1.3.2.2 Proteine pflanzlicher Herkunft 5
1.3.2.3 Proteine pilzlicher Herkunft 7
1.3.3 Chemische und enzymatische Modifikationen 9
1.4 Physikalische Grundlagen 10
1.4.1 Arten der Blasenbildung 11
1.4.2 Vorgänge bei der Druckentlastung über einer karbonisierten Flüssigkeit 12
1.4.3 Blasenaufbau und Blasenwachstum 12
1.5 Zielsetzung 17

2 Material und Methoden 18

2.1 Material 18
2.1.1 Ausstattung 18
2.1.1.1 Geräte 18
2.1.1.2 Verbrauchsmaterialien 20
2.1.2 Chemikalien 22
2.1.3 Puffer und Lösungen 25
2.1.3.1 Tris-Tricin-Gele nach Schägger & v. Jagow (1987) 25
2.1.3.2 Eindimensionale Gelelektrophorese nach Laemmli (1970) 27
2.1.3.3 Lösungen und Puffer für die 2D-Gelelektrophorese 28
2.1.3.4 Färbelösungen für Tris-Tricin-Gele (RotiBlue) 30
2.1.3.5 Färbelösungen für Gele und Blots (Coomassie) 31
2.1.3.6 Silberfärbung nach Blum et al. (1987) 32
2.1.3.7 Kontinuierlicher CAPS-Methanol-Blotting-Puffer 33
2.1.3.8 Puffer für die Proteinreinigung 33
2.1.3.9 Schrumpflösung für die Archivierung der Gele 33
2.1.3.10 Synthetische Würze 34
2.1.3.11 Puffer für Western Blots 34
2.1.3.12 Puffer und Lösungen zur Messung der Oberflächenhydrophobizität mit ANS 36
2.1.4 Medien 37
2.1.4.1 Synthetischer nährstoffarmer Agar (SNA) nach Nirenberg (1976), modifiziert 37
2.1.4.2 YCB-Flüssigmedium 37
2.1.4.3 SC-DO-Medium für Hefen 38

2.1.4.4 Malzextraktmedium....38
2.1.5 Verwendete Mikroorganismen....39
2.2 Methoden....40
2.2.1 Kulturbedingungen....40
2.2.1.1 Kultur auf SNA-Platten....40
2.2.1.2 Flüssigkulturen in Petrischalen....40
2.2.1.3 Schüttelkulturen in YCB-Flüssigmedium....40
2.2.2 Screening auf die Bildung benetzender Substanzen durch Fusarium-Arten....41
2.2.3 Mälzungs- und Darrbedingungen....41
2.2.4 Gelelektrophorese....42
2.2.4.1 Eindimensionale Gelelektrophorese nach Laemmli (1970)....42
2.2.4.2 Eindimensionale Gelelektrophorese nach Schägger & v. Jagow (1987)....43
2.2.4.3 2-Dimensionale Gelelektrophorese....44
2.2.5 Färbemethoden....46
2.2.5.1 Färbung von Tris-Tricin-Gelen mit RotiBlue....46
2.2.5.2 Silberfärbung nach Blum et al. (1987)....46
2.2.5.3 Färbung von Gelen mit Coomassie....47
2.2.5.4 Färben von Blots....48
2.2.5.5 Quantitative Färbung von Proteinen im Gel....48
2.2.6 Archivierung der Gele....51
2.2.7 Dokumentation von Gelen und Blots....51
2.2.8 Reduktion und Alkylierung von Proteinen für Edman-Sequenzierungen....52
2.2.9 Bedingungen für semi-dry-Elektroblotting (Matsudaira 1987)....52
2.2.10 Polymerase-Kettenreaktion und Klonierung der PCR-Produkte....53
2.2.11 Proteinpräparation....54
2.2.11.1 Ammoniumsulfatfällung aus dem Kulturüberstand....54
2.2.11.2 Lösen des Präzipitats....54
2.2.11.3 Proteinextraktion aus Getreiden und Malzen für die Messung der Oberflächenhydrophobizität....55
2.2.12 Chromatographische Methoden....55
2.2.12.1 Entsalzen von Proteinproben....55
2.2.12.2 Anionenaustausch-Chromatographie zur Trennung von Proteinen aus Fusarium spp....56
2.2.12.3 Anionenaustausch-Chromatographie zur Reinigung von LTP 1500....57
2.2.13 Präparative isoelektrische Fokussierung....58
2.2.14 Proteingehaltsbestimmungen....59
2.2.14.1 Proteingehaltsbestimmung nach präparativer isoelektrischer Fokussierung....59
2.2.14.2 Photometrische Bestimmung des Proteingehalts....59
2.2.15 Bedingungen und Verfahren für Western blots....59
2.2.16 Zerschäumungsanalyse....61
2.2.16.1 Abschäumen des Kulturüberstandes....61

2.2.16.2 Behandlung des bei der Zerschäumung aggregierten Proteins mit Trifluoressigsäure....62
2.2.17 Edman-Sequenzierung von Proteinen....63
2.2.18 Messung von Oberflächenspannungen....63
2.2.18.1 Messung von Oberflächenspannungen mittels Tropfenmethode....63
2.2.18.2 Messung von Oberflächenspannungen in Mikrotiter-Platten....64
2.2.19 Messung der Oberflächenhydrophobizität mit ANS....66
2.2.19.1 Oberflächenhydrophobizität von pilzlichen Proteinen....66
2.2.19.2 Oberflächenhydrophobizität von Getreide- und Malzproteinen....66
2.2.20 Zusatz von Proben zu Bier und Mineralwasser....67
2.2.21 Überkopfschütteln von Produktproben....67
2.2.22 Durchführung eines Brauversuchs mit transgenen Hefen....68

3 Ergebnisse....71
3.1 Auswirkungen des Zusatzes von Detergentien zu Bier und Mineralwasser....71
3.2 Vorarbeiten zur Auswahl der zu untersuchenden Organismen....73
3.2.1 Identifizierung von Isolaten, die in vitro oberflächenaktive Stoffe ausscheiden....73
3.2.2 Testmälzung mit den Arbeitsstämmen *F. culmorum* TMW 4.0102 und TMW 4.0111....82
3.3 Proteinanalytik....84
3.3.1 Zerschäumungsanalyse....84
3.3.1.1 Zerschäumung von Medien nach Wachstum von *F. culmorum* TMW 4.0102....84
3.3.1.2 Gewinnung von schaumaktiven Proteinen aus *F. culmorum* TMW 4.0102 zur N-terminalen Sequenzierung....86
3.3.1.3 pH-Wert-Abhängigkeit des präparierbaren Proteinspektrums von *F. culmorum* TMW 4.0111 in der Zerschäumungsanalyse....87
3.3.1.4 N-terminale Sequenzierung der durch pH-kontrollierte Zerschäumung präparierten Proteine....88
3.3.1.5 Aggregation von pilzlichen Proteinen als Funktion des pH-Wertes....89
3.3.1.6 Sequenzierung interner Peptide oberflächenaktiver Proteine aus *F. culmorum* TMW 4.0111 und Identifizierung der zugehörigen Gene....90
3.3.1.7 Strukturanalyse von AfpA-Protein aus *F. culmorum* TMW 4.0111....97
3.3.2 Ergebnisse der Edman-Sequenzierung eines sauren, sekretierten Proteins von *F. graminearum* TMW 4.0502....100
3.3.3 Optimierung der Kulturbedingungen und Entwicklung von Methoden zur Proteinpräparation....102
3.3.3.1 Vorversuche für die Reinigung größerer Proteinmengen....103
3.3.3.2 Entsalzung mit der präparativen Entsalzungssäule HiPrep 26/10 Desalt....105
3.3.3.3 Reinigung der pilzlichen Proteine durch Anionenaustausch-Chromatographie....106
3.3.4 Bildung von Filmen durch die oberflächenaktiven Proteine von *F. culmorum* TMW 4.0111....109

3.4 Beeinflussung von Gushing durch von *F. culmorum* TMW 4.0111 ausgeschiedene Proteine..... 110
3.5 Untersuchungen von Proteinen von *Fusarium* spp. mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese.....112
3.5.1 Charakterisierung der oberflächenaktiven Proteine von *F. culmorum* TMW 4.0111.....112
3.5.2 Thermische Behandlung von 14 kDa-Protein und AfpA mit synthetischer Würze.. 115
3.5.3 Reaktion der Proteine von *F. culmorum* TMW 4.0111 mit Maltose unter forcierten Bedingungen..... 116
3.5.4 Untersuchung des Exoproteoms von *F. graminearum*-Isolaten.....117
3.6 Präparative isoelektrische Fokussierung.....120
3.7 Untersuchungen mit polyklonalen Antiseren gegen Proteine aus *F. culmorum* TMW 4.0111.....121
3.7.1 Herstellung der polyklonalen Antiseren.....121
3.7.2 Spezifität der Antiseren gegen Proteine aus *F. culmorum* und *F. graminearum*... 122
3.7.3 Untersuchung der Kreuzreaktionen der Antiseren mit Proteinen anderer Fusarium-Arten..... 124
3.7.4 Untersuchung nativer und hitzebehandelter Proteine von *F. culmorum* TMW 4.0111.....126
3.7.5 Detektion grenzflächenaktiver Proteine aus *Fusarium* spp. in infizierten Malzen durch Western Blotting.....127
3.7.6 Stabilität von AfpA-Homologen im Maischprozeß.....129
3.8 Messungen der Grenzflächenaktivität der Proteine aus *F. culmorum* und *F. graminearum*..... 131
3.8.1 Messung der Oberflächenspannung unterschiedlicher Proteinlösungen durch Bestimmen des Tropfenvolumens..... 131
3.8.2 Bestimmung der Oberflächenspannung durch eine indirekte, optische Methode.. 132
3.8.2.1 Validierung der indirekten Meßmethode.....132
3.8.2.2 Zeitabhängigkeit der Einstellung der Oberflächenspannung..... 134
3.8.2.3 Wirkung der pilzlichen Proteine auf die Oberflächenspannung..... 135
3.9 Oberflächenhydrophobizität von Proteinen aus *Fusarium* spp. und Malzen..... 138
3.9.1 Oberflächenhydrophobizität von Fusarium-Proteinen in Abhängigkeit von der thermischen Vorbehandlung.....139
3.9.2 Korrelation der Oberflächenhydrophobizität mit dem Überschäumvolumen von infizierten und nicht infizierten Malzen.....143
3.10 Erzeugung von Gushing durch Vergärung von Würze mit transgenen Hefen.....145

4 Diskussion..... 147
4.1 Rolle der Oberflächenspannung des Bieres beim Entstehen von Gushing..... 147
4.2 Untersuchungen zur Bildung oberflächenaktiver Proteine von *Fusarium* spp. 148
4.2.1 Stammspezifische Unterschiede bei der Bildung oberflächenaktiver Proteine durch Isolate gushing-relevanter Pilze.....149

4.2.2 Auslösung von malzverursachtem Gushing durch das Arbeitsisolat..... 151
4.3 Isolation oberflächenaktiver Proteine gushing-relevanter Pilze und Untersuchung ihrer Ähnlichkeit mit Hydrophobinen..... 151
4.4 Beeinflussung des Gushings durch Proteine aus *F. culmorum* in Abhängigkeit von der Modifikation.....155
4.5 Modifikation der Proteine aus *F. culmorum* TMW 4.0111 durch Maillardreaktion.. 158
4.6 Nachweis der Proteine aus *F. culmorum* TMW 4.0111 mit polyklonalen Antikörpern.....159
4.6.1 Detektion von Maillardprodukten der antigenen Proteine.....160
4.6.2 Nachweis von gushing-beeinflussenden Proteinen aus *Fusarium* spp. in Rohstoffen 161
4.7 Oberflächenaktivität von Proteinen aus *F. culmorum* und *F. graminearum*..... 162
4.8 Untersuchungen zur Oberflächenhydrophobizität von Proteinen..... 165
4.8.1 Oberflächenhydrophobizität pilzlicher Proteine.....166
4.8.2 Oberflächenhydrophobizität von Proteinen aus Malzen.....167
4.9 Erzeugung von Gushing durch ein Klasse II-Hydrophobin.....168
4.10 Interaktionen zwischen oberflächenaktiven Proteinen und anderen Stoffen in Grenzflächen.....170
4.11 Abschließende Betrachtung.....175

5 Literatur..... 178

6 Zusammenfassung - Summary..... 185

1 Einleitung

1.1 Gushing oder Wildwerden

Als Gushing oder „Wildwerden" bezeichnet man das unerwünschte Überschäumen von karbonisierten Getränken beim sachgerechten Öffnen der Flasche. Das Phänomen ist sowohl bei Bier, als auch bei Schaumweinen wie Sekt und Champagner (*gerbage du vin mousseux*, von *gerbe (f.)*, Garbe, Strahl), sowie bei Fruchtschorlen, besonders aus Säften roter Früchte, bekannt. Die Erfindung des Abfüllens von Bier auf Flaschen wird Alexander Nowell, Dekan der *St. Paul's Cathedral* in London 1560-1602, zugeschrieben. Es darf davon ausgegangen werden, dass das Wildwerden von Bier seit dieser Zeit auftritt. Erste Berichte aus neuerer Zeit über das Wildwerden von Bier stammen von Windisch. Damals handelte es sich in einem Fall um ein aus Malz, Reis und Zucker für den Export in die Tropen hergestelltes Bier, das nach der Abfüllung pasteurisiert wurde. Das Wildwerden trat 4-6 Wochen nach der Pasteurisation auf (Windisch, 1923 a). Im anderen Fall handelte es sich um Wildwerden in einer südamerikanischen Brauerei, nachdem die Verschnitt-Anteile unterschiedlicher Malze verändert worden waren (Windisch, 1923 b). Seit damals wurden zahlreiche Theorien über die Ursachen des Effekts aufgestellt und von vielen Untersuchungen begleitet. Die bisherigen Forschungsergebnisse zeigen, dass das spontane Überschäumen des Produktes nicht monokausal erklärt werden kann, sondern vielmehr durch ein komplexes Zusammenspiel von unterschiedlichen Faktoren entsteht.

1.2 Primäres und sekundäres Gushing – eine Abgrenzung

Zwei Typen des Gushings werden nach ihrer Ursache unterschieden. Primäres oder malzverursachtes Gushing wird von sekundärem oder technologisch bedingtem Gushing unterschieden, das durch Partikel im abgefüllten Bier hervorgerufen wird. Sekundäres Gushing beruht auf dem Eintrag oder Entstehen von Partikeln z.B. Kalziumoxalat, Feingur, Eiweiß-Polyphenol-Komplexe nach der Filtration und Abfüllung. Ferner zählen zu den Ursachen auch ein überhöhter CO_2-Gehalt des Flaschenbieres oder auch ein zu hoher vergärbarer Restextraktgehalt in unfiltriert

abgefülltem Bier, verbunden mit einer unkontrollierten Nachgärung. Alle diese Faktoren sind entweder durch geeignete technologische Maßnahmen zu beseitigen oder sind gar die Folge technologischer Fehler im Laufe der Produktion. Hauptursache des sekundären Gushings war bislang die Bildung von Kalziumoxalat-Kristallen, teilweise durch Eintrag von Kalziumionen aus der Gur ins an sich stabile Bier. Eine erste Lösung dieses Problems wurde bereits von Brenner (1957) durch ein Empfehlung eines molaren Kalzium/Oxalat-Verhältnisses in der Würze von 10:1 vorgestellt. Gleichzeitig stammen erste Hinweise auf Einflüsse der Filtration auf die Kalziumoxalat-Ausfällung aus dem Jahre 1948 (Laufer, 1948). Auch das Gushing von Champagner und Sekt gehört zum sekundären Gushing, da es in der Regel durch Nukleation von CO_2-Blasen an Kaliumhydrogentartrat-Kristallen ausgelöst wird (Ribéreau-Gayon *et al.,* 1998; Troost *et al.,* 1995).

Dem sekundären Gushing von Bier wird das primäre oder malzverursachte Gushing gegenübergestellt. Das epidemische Auftreten des Gushings in einzelnen Jahren und Regionen wurde von Helm & Richardt (1938) so interpretiert, dass die Gerste Hauptursache des Effekts sein muß und Brauen, Gärung und Lagerung nur noch nachgelagerten Einfluss auf das Überschäumvolumen nehmen. Damit ist jedoch das primäre Gushing nicht ursächlich ein Problem der Brauereien, sondern vielmehr der Malzerzeugung bzw. der Urproduktion, also dem Getreideanbau. Ungünstige klimatische Verhältnisse erleichtern einen Befall von Braugetreide mit Schimmelpilzen und anderen Mikroorganismen, so dass seit Mitte der fünfziger Jahre ein Zusammenhang zwischen dem Mikroorganismenbefall und dem Auftreten von Gushing konkret diskutiert wurde (Gjertsen *et al.,* 1963). In den sechziger Jahren wurden systematisch Bakterien, Hefen und Schimmelpilze von Gerste isoliert und die einzelnen Reinkulturen während der Mälzung zum Weichwasser zugesetzt, um eine Infektion auszulösen. Es zeigte sich eindeutig, dass vor allem ein Befall mit Fusarien letztlich zu einem gushenden Bier führt (Prentice & Sloey, 1960; Sloey & Prentice, 1962). Dabei zeigten bereits *in vitro-V*ersuche von Gjertsen *et al.* (1965), dass das Phänomen zunächst nur dann auftritt, wenn lebendes Myzel und keimendes Getreide zusammenkommen. Diese Versuche wiesen auf ein differenzierte Interaktionen zwischen Pilz und Pflanze bei der Entstehung des Gushings hin. Die Ursache des Überschäumens wird folglich in einem durch Schimmelpilzbefall qualitativ veränderten Malz gesehen (Niessen *et al*., 1992). Nach einer Umfrage aus dem Jahre 1999 waren in den zurückliegenden zehn Jahren 54 % der Betriebe (162 teilnehmende Brauereien) mindestens einmal von Gushing betroffen, insbesondere bei Weizenbieren (Kunert

et al., 2000). In über 45 % der Fälle gaben die Brauereien Malz als alleinige Ursache für die auftretenden Probleme an. Als Konsequenz daraus ließen über 50 % der an der Umfrage teilnehmenden Brauereien das bezogene Malz regelmäßig auf Gushing-Potential untersuchen und verschnitten Malze mit Gushingpotential mit unkritischer Ware. Die vorliegende Arbeit befasst sich ausschließlich mit primärem Gushing.

1.3 Mögliche Faktoren bei primärem Gushing

In der Vergangenheit wurden zahlreiche Untersuchungen mit dem Ziel durchgeführt, aus zu Gushing führenden Malzen oder Gushingbieren „den Gushingfaktor" zu isolieren. Dieser Ansatz entsprach dem Koch'schen Postulat vom infektiösen Agens, das aus dem erkrankten Organismus isolierbar sein sollte und, wieder in einen Organismus eingebracht, die gleichen Symptome hervorrufen muß. Die Suche nach einem singulären Gushingfaktor ließ zudem die Möglichkeit eines multifaktoriellen Problems weitgehend außer acht. Ebenso fand die Überlegung bislang kaum Beachtung, dass Gushing möglicherweise auftritt, wenn einzelne Stoffe oder Stoffgruppen fehlen, die im stabilen Bier das explosive Überschäumen verhindern. Über eine mögliche gushing-inhibierende Wirkung von polaren Lipiden berichteten Laible & Geiger (2003).

1.3.1 Physikalische und anorganische Faktoren

Untersuchungen anorganischer Einflussfaktoren umfassten die Wirkung zahlreicher Metallionen. Thorne & Helm (1957) entfernten Gushing durch einen Zusatz von 1 ppm Co^{2+}-Ionen und lösten Gushing durch Zusatz von Nickel bzw. Eisenionen zwischen in Konzentrationen zwischen 2 und 10 ppm aus. Die Stabilisierung der Wand von Mikroblasen durch eine Schicht aus $Fe(OH)_3$ wurde von Guggenberger & Kleber (1963) vorgeschlagen.

Pasteurisation konnte in einigen Fällen Gushing zumindest vorübergehend vermindern, in anderen Fällen erfolgte nur eine zeitliche Verschiebung, wobei Schütteln nach der Pasteurisation das Gushing wieder herstellte (Helm & Richardt,

1938; Narziß, 1995). Einerseits wurde die Temperaturerhöhung alleine, andererseits die Druckerhöhung durch Temperaturerhöhung als möglicher Einfluss auf die Stabilität von Gasresten oder Mikroblasen genannt (Gardner, 1979). Ob nur eine vorübergehende Auflösung von Mikroblasen und Gasresten erfolgte, oder beispielsweise eine maskierende Auffällung hitzelabiler Proteine, die etwa von der Hefe ausgeschieden wurden, auf gushingauslösende Partikel stattfand, blieb offen.

Zahlreiche Autoren wiesen darauf hin, dass Schütteln zur Entstehung von Gushing unabdingbar ist (Helm & Richardt, 1938; Thorne & Helm, 1957; Fischer, 2001). Darüber hinaus wurde über eine Zeitspanne von mehreren Wochen nach der Abfüllung auf Flaschen berichtet, die benötigt ist, bis sich primäres Gushing voll entwickelt (Narziß *et al.,* 1990; Weideneder, 1992). Die Entwicklung konnte bei identischem Malz in unterschiedlichen Betrieben unterschiedlich schnell erfolgen, was einen Einfluss individueller anlagentechnischer Faktoren nahelegt (Donhauser *et al.,* 1990).

1.3.2 Proteine und Peptide als Gushingfaktoren

Die dabei als möglicher Gushingfaktor am stärksten untersuchte Stoffgruppe waren bislang Proteine, wobei die jeweilige Herkunft aus Pilz oder Pflanze aufgrund der Isolation aus Gushingmalz nicht festgestellt werden konnte. In jüngster Zeit wurden neue Hypothesen zur chemischen Natur und zum Ursprung des primären Gushings formuliert (Hippeli & Elstner, 2002). Im Mittelpunkt stehen dabei mindestens zwei Proteinklassen, die beide erst in den neunziger Jahren entdeckt und näher charakterisiert wurden. Es handelt sich um die pilzspezifischen Hydrophobine und um die pflanzentypischen *non-specific lipid transfer proteins* (ns-LTPs). Beide Proteinklassen sind in die komplexen, teilweise noch unverstandenen Reaktionsabfolgen bei einem pilzlichen Befall und der als Folge auftretenden Abwehrreaktion der Pflanze involviert. Der Verdacht, dass sowohl Hydrophobine als auch ns-LTPs wesentlich an der Auslösung von Gushing beteiligt sind, wurde erst kürzlich erhoben.

1.3.2.1 Proteine aus Gushingmalzen

Gjertsen *et al.* (1963) extrahierten eine gushing-induzierende Substanz aus Gushingmalz durch siedendes Ethanol. Die Substanz war nicht durch Destillation abzutreiben, ihre Aktivität wurde aber im Kontakt mit Chloroform zerstört. Die Autoren nahmen an, dass der Stoff ungeladen sein, da er durch Ionenchromatographie nicht zu entfernen war. Die Deaktivierung durch Chloroform läßt die Vermutung zu, dass es sich um ein hitzestabiles Protein handelte, das durch Chloroform denaturiert wurde. Aus pilzbelastetem Handelsmalz europäischer Herkunft wurde ein gushing-induzierendes Protein mit ca. 10 kDa isoliert (Kitabatake, 1978). Das Protein war stabil gegen Amylase und zahlreiche Proteasen. Das Protein wurde wohl schon als Maillardprodukt oder durch andere Reaktionen modifizierte Form aus dem Malz isoliert, da die Bande war in der Gelelektrophorese unscharf begrenzt war. Auch in der Dissertation von Weideneder (1992) wurden Versuche zur Isolation und Charakterisierung von gushing-induzierenden Proteinen aus mit *Fusarium* spp. infizierten Malzen unternommen. In der zitierten Arbeit wurde festgestellt, dass Proteinfraktionen mit pI<4 Gushing auslösen konnten. Die aktiven Fraktionen enthielten mehrere Proteine, die ebenfalls teilweise unscharf begrenzte Banden aufwiesen.

1.3.2.2 Proteine pflanzlicher Herkunft

Eine Reihe von Getreideproteinen ist selbstverständlich auch im Bier zu finden, insbesondere solche Proteine, die sich durch eine hohe Stabilität gegenüber Proteasen auszeichnen. Unter der Voraussetzung einer hinreichenden Hydrophobizität werden diese Proteine ebenfalls an der Stabilisierung von Grenzflächen in Bier beteiligt sein. Eine solche Proteingruppe umfaßt die nichtspezifischen Lipidtransferproteine. Hier handelt es sich um eine ebenfalls erst in den 1990er Jahren charakterisierte Proteinklasse, die im Gegensatz zu den Hydrophobinen nicht in Pilzen vorkommt, sondern typisch für Pflanzen zu sein scheint. Besonders reichlich findet man ns-LTPs in Samen und Getreidekörnern. LTP1 und die dazu verwandten Proteine, wie LTP1500 finden sich in in großen Mengen in der Aleuronschicht. LTP1 ist ein globuläres Protein, das sich aus 90 bzw. 91 Aminosäuren zusammensetzt. Es besitzt vier helikale Abschnitte und einen

langen C-terminalen Arm. Die Protein-Faltung wird u.a. durch vier intramolekulare Disulfidbrücken stabilisiert. Im Innern des Proteins wird durch eine entsprechende Anordnung hydrophober Aminosäuren eine hydrophobe Domäne gebildet. Außerdem besitzen ns-LTPs N-terminale Signalpeptide, die für ihre Sekretion und extrazelluläre Lokalisation in den Zellwänden oder z.B. in der Aleuronschicht verantwortlich sind. LTP1 ist wasserlöslich, salzfällbar, hitzebeständig, und ebenfalls, wie auch Hydrophobine protease-resistent, oberflächenaktiv und adsorbiert an Luft-Wasser-Phasengrenzen (Subirade *et al.,* 1995). Außerdem besitzt es einen basischen isoelektrischen Punkt. Beobachtungen einer anti-mikrobiellen Aktivität *in vitro* führten zu der Spekulation, dass LTPs eine Rolle in der Pathogenabwehr spielen könnten. Darüber hinaus wurde festgestellt, dass eine Reihe von LTP-Genen in Gerste als Folge einer Infektion mit Pilzen oder in Folge abiotischer Streßfaktoren wie extreme Temperaturen, Trockenheit oder Nässe hochreguliert werden (Garcia-Olmedo *et al.,* 1995). Deshalb schreibt man den ns-LTPs eine Schutz- bzw. Abwehrfunktion zu, ohne genauere Mechanismen zu kennen. Bei der Infektion von Getreide mit *Fusarium*-Arten wird u.a. durch den Pilz Gibberellin-Säure gebildet, die wiederum die Bildung von Cystein-Endoproteasen im Aleuron induziert (Koehler & Ho, 1988). Eine Interaktion von Cysteinproteasen mit LTP ist wahrscheinlich, wobei die Art der Wechselwirkung kontrovers diskutiert wird. Ein Ansatz besagt, dass LTPs im ungekeimten Korn potente Inhibitoren von Cysteinproteasen seien (Jones & Marinac, 1995 & 2000). Eine andere Vorstellung geht davon aus, dass natives LTP1 kein Proteinase-Inhibitor ist, sondern in denaturiertem Zustand bevorzugtes Substrat von Gersten-Endoproteinase EP-B darstellt und damit kompetitiv andere Proteine vor dem Abbau schützt (Davy *et al.,* 1999).

LTP1 ist entscheidend an der Bierschaum-Bildung beteiligt. Aus Bier isoliertes LTP1 ist ein besserer Schaumbildner ist als natives LTP1, welches aus dem Gerstenkorn gewonnen wurde. LTP1 musste demnach während des Mälzungs- und/oder des Brauprozesses modifiziert worden sein. Welche Modifikationen am LTP1 auftreten, wurde von Jégou *et al.* (2000) aufgeklärt. Sie isolierten LTP1 aus dem Gerstenkorn und aus Bier und die Bindung von Glukose an LTP1 über die bekannte Maillard-Reaktion unter den Temperatur-Bedingungen des Mälzungs- und Brauprozesses. Als weitere Modifikation von LTP1 aus Bier finden die Autoren eine Reduktion der Disulfidbrücken. Die Zerstörung von Disulfidbrücken führt zu einer Auffaltung des Proteins. Die Anwesenheit von Zuckern im Molekül erhöht nun einerseits die Wasserlöslichkeit, andererseits werden durch die Auffaltung die inneren

hydrophoben Bereiche besser exponiert. Der amphotere Charakter nimmt zu, was eine bessere Schaumbildungskapazität von modifiziertem LTP1 erklärt. Modifiziertes LTP1 entsteht also unter den Bedingungen des Brauprozesses aus nicht modifiziertem basischem LTP1. Modifiziertes LTP1 ist wiederum im Gegensatz zu nativem LTP1 u.a. durch Proteinase A aus *Saccharomyces cerevisiae* angreifbar (Leisegang & Stahl, 2005). Ähnliche Modifikationen sind daher auch von anderen Proteinen im Brauprozeß zu erwarten. Da mindestens diese Gruppe hydrophober Getreideproteine in einer engen Interaktion mit der Infektion durch Pilze steht, ist es von Interesse, Untersuchungen zur Veränderung des Gehalts an hydrophoben Proteinen im Zuge der Pilzinfektion durchzuführen.

1.3.2.3 Proteine pilzlicher Herkunft

Es wurde in der Vergangenheit ebenfalls versucht, Gushing-Faktoren direkt aus Kulturen unterschiedlicher Mikroorganismen zu reinigen. Amaha *et al.* (1973) berichten über die Isolation einer gushing-erregenden Substanz aus Kulturen von *Rhizopus* sp. Strain 207. Es handelte sich um ein 15 kDa großes Protein, resistent gegen Papain, Ficin, Bromelain, aber zerstörbar durch Proteasen wie Pepsin und Trypsin. Die Aktivität des Proteins war zudem hitzestabil zwischen pH 4 und pH 8 in einer Behandlung mit 100 °C über 2 h. Yoshida *et al.* (1975) erzeugten Gushing, indem sie Konzentrate von Medien, in denen zuvor *F. graminearum*-Isolate oder andere, nicht hinreichend bestimmte Fusarien gewachsen waren zu Bier zusetzten. Es ist naheliegend, dass die zugesetzten Medien-Konzentrate Proteine enthielten, die von den Pilzen sekretiert worden waren. Kitabatake (1981) isolierte gushing-induzierende Substanzen aus einigen unzureichend bestimmten Pilzen sowie *F. graminearum*, wobei die Art der Stoffe unklar blieb: ein aus *F. graminearum* isolierter Stoff war löslich in Methanol, ein weiterer unlöslich in Methanol. Beide Substanzen enthielten Aminosäuren, eine Größe von 600 Da wurde angegeben. Möglicherweise handelte es sich um hitzestabile Cyclopeptide, die bei Konzentrationen von 0,1-0,3 ppm 100 von 340 mL Bier überschäumen ließen. Ein ebenfalls cyclopeptidischer, gushing-auslösender Stoff aus *Penicillium chrysogenum* wurde von Amaha & Horiuchi (1979) beschrieben.

Es wurden kürzlich immunchemische Untersuchungen vorgestellt, die zeigten, dass Hydrophobine in Gushing-Malzen und auch in den daraus hergestellten Bieren

nachweisbar waren, während sie in unbeanstandeter Ware nicht nachgewiesen werden konnten (Kleemola *et al.,* 2001). Die Forscher dieser Arbeitsgruppe fokussierten dabei auf Hydrophobine von *Trichoderma reesei, Nigrospora* sp. und *F. poae* um einen kommerzialisierbaren ELISA-Nachweis zu entwickeln.

Filamentöse Pilze, zu denen auch die Schimmelpilze zählen, synthetisieren große Mengen sogenannter Hydrophobine. Als Hydrophobine wird eine Gruppe kleiner Proteine (60-130 Aminosäuren) bezeichnet, die von vielen Pilzen aus der Zelle ausgeschieden werden. Sie spielen eine fundamentale Rolle in der Morphogenese der meisten filamentösen Pilze (Kershaw & Talbot, 1998). Gemeinsame Merkmale aller bisher bekannten Hydrophobine sind der Besitz von 8 Cystein-Resten an konservierten Positionen der Aminosäuresequenz, sowie das Vorhandensein einer Signalsequenz (Wessels, 1996). Neben dem Vorhandensein auf den Oberflächen einer Vielzahl unterschiedlicher Pilze konnte *in vitro*gezeigt werden, dass Hydrophobine in wässriger Lösung sehr schnell Öltropfen oder auch Luftblasen mit einem geschlossenen amphipatischen und SDS-unlöslichen Film umgeben (Wösten *et al*., 1994). Auch bei Kontakt mit Grenzflächen zwischen einem hydrophoben Feststoff und einem hydrophilen Medium, z.B. Teflon/Wasser reagieren Hydrophobine mit der Ausbildung sehr stabiler zweidimensionaler Polymere (Wessels, 1997). Diese Polymere bilden etwa 10 nm dicke monomolekulare Filme, die ausgesprochen stabil gegen hohe Temperaturen sowie auch gegen die meisten Lösungsmittel und Detergentien sind. Diese Aggregatfilme findet man auch auf der Oberfläche von Pilzzellen, denen dadurch Hydrophobizität verliehen wird. Diese pilzspezifischen Proteine sind wie LTP1 wasserlöslich, hitzestabil und häufig protease-resistent. Sie haben damit alle wichtigen Voraussetzungen, um den Brauprozeß unbeschadet zu überstehen. Hydrophobine werden von Pilzen als Monomere in wässrige Kulturmedien abgegeben. An Phasengrenzen bilden Hydrophobine Polymerfilme aus, die eine charakteristische netzförmige Ultrastruktur aufweisen. Damit können diese Filme in hervorragender Weise als Kondensationskeime für die CO_2-Entbindung beim Überschäumen des Bieres dienen.

In anderen Organismen werden ähnliche Aufgaben in der Morphogenese durch anders geartete Proteine übernommen. Bei *Streptomyces coelicolor* sind Chapline (*coelicolor hydrophobic aerial proteins*) in enger Interaktion mit Rodlinen an der Bildung von Luftmyzel und Sporen beteiligt (Elliot & Talbot, 2004; Claessen *et al*., 2004). Proteine mit hydrophobin-ähnlichen Eigenschaften bedingen teilweise die

Hitzeresistenz der Konidien von *Beauveria bassiana* und *Paecilomyces fumoroseus* (Ying & Feng, 2004). Aufgrund der Vielzahl an möglichen Wirkungen und Wirkorten in und an der Zelle besteht die Erwartung, dass Hydrophobine nicht die einzigen hoch grenzflächenaktiven Proteine in Pilzen sind. Bei weiteren Proteinen mit hydrophobin-ähnlichen Eigenschaften könnten die Anlagerung an die Zellwand und die Beteiligung an der Morphorgenese ebenfalls mit Grenzflächenaktivität und Gushingbeeinflussug zusammenhängen.

1.3.3 Chemische und enzymatische Modifikationen

Die ersten der oben beschriebenen Untersuchungen wurden zunächst durchgeführt, ohne vorher eine Vorstellung über die notwendigen Eigenschaften der gushing-auslösenden Substanzen zu entwickeln oder eine Veränderung der isolierten Substanzen im Brauprozeß zu erwägen. Erst spätere Arbeiten, beispielsweise von Amaha *et al.* (1973) und Kitabatake & Amaha (1977), untersuchten den Einfluss chemischer Modifikationen auf die Aktivität einer gushing-auslösenden Substanz, wobei zahlreiche der damals untersuchten Reaktionen im Brauprozeß nicht zu erwarten sind. Hinsichtlich der möglichen Reaktionen von Proteinen sind im Brauprozeß Einflüsse durch thermisch induzierte Umlagerungen, die Bildung von Zuckeraddukten durch Maillard-Reaktion und enzymatischer Abbau von Proteinen zu erwarten.

Die Wirkung von Restaktivitäten von Papain und verwandten Proteasen auf Proteine im bereits abgefüllten Bier wurde seit langer Zeit für ein spätes Überschäumen der mit diesen Enzymen behandelten Biere verantwortlich gemacht (Helm & Richardt, 1938). Das Maximum des durch die so entstandenen Peptide erzeugten Überschäumens trat nach 1-3 Monaten auf. Wurden die Enzyme vor dem Zusatz durch Essigsäuremonojodat oder Hitze inaktiviert, unterblieb der Effekt (Amaha & Horiuchi 1979). Dabei wirkten offensichtlich Abbauprodukte der im Bier enthaltenen Proteine, da das durch Papain erzeugte Gushing wiederum durch Behandlung des Bieres mit einer speziellen Protease aus verschiedenen *Aspergillus*-Arten (*A. niger, A. carbonarius, A. ficuum, A. phoenicis, A. pulverulentus, A. awamorii, A. heteromorphus*), sowie *Rhizopus chinensis* und *Mucor pusillus* zerstört werden konnte. Proteasen, die jene von Papain gebildeten gushing-auslösenden Substanzen zerstören konnten, waren als Gruppenmerkmal

durch den Pepsininhibitor S-PI [Acetyl-valyl)-(valyl)-(4-amino-3-hydroxy-6-methyl-heptansäure)-(alanyl)-(4-amino-3-hydroxy-6-methyl-heptansäure] aus *Streptomyces naniwaensis* inhibierbar (Horiuchi *et al*., 1978).

1.4 Physikalische Grundlagen

Die Entwicklung der Blasen setzt beim primären Gushing schlagartig nach dem Öffnen der Flasche im gesamten Flaschenvolumen ein, wobei die Volumenvergrößerung durch das Blasenwachstum dann zum Überlaufen der Flasche führt (Anonymus, 1941). Eine weit verbreitete, meist gefühlsmäßig gerechtfertigte Meinung ist, dass der normale Zustand von Bier aufgrund seiner Übersättigung mit CO_2 (bezogen auf Atmosphärendruck) gushing-artiges Überschäumen sei. Dieser Effekt würde in einer ersten Betrachtung die *de novo*-Bildung von Gasblasen erfordern. Tatsächlich ist für CO_2-imprägniertes Wasser eine *de novo*-Blasenbildung auch bei weitaus höheren Sättigungen, als sie in Bier vorliegen, nicht zu erwarten. Wilt (1986) zeigte auf theoretischer Basis, dass in Wasser Übersättigungen von $S > 1000$ nötig sind, damit Gasblasen durch Druckabfall aus der Lösung nukleieren können. Die Übersättigung S ist definiert als $S=[(c_L/c_0) -1]$ mit c_L als Konzentration von CO_2 in der Flüssigkeit und c_0 als Gleichgewichtskonzentration in der Flüssigkeit bei einem Partialdruck (gasförmig) von 1 atm. Guggenberger (1962 a) verweist ebenfalls darauf, dass noch keine spontane Blasenneubildung bei Druckentlastung ausgehend von Sättigungsdrücken > 250 atm auf Atmosphärendruck stattfindet. Auch die Heißabfüllung karbonisierter Getränke schafft nicht die Bedingungen zur spontanen Blasenneubildung aus der Flüssigkeit heraus (Guggenberger, 1962 b). Gleichzeitig ist in Getränken eine Nukleation an vollständig benetzten Partikeln nicht zu erwarten, ein Einfluss scharfer Kanten oder Spitzen an den Partikeln besteht nicht (Guggenberger, 1962 a; Draeger, 1996; Fischer, 2001). Eine der ersten Überlegungen zur Unmöglichkeit der Blasenbildung an vollständig benetzten Oberflächen unter nicht-extremen Bedingungen stammt von Tomlinson (1867). Im folgenden sollen die Vorgänge bei der Entstehung von Blasen erläutert werden.

1.4.1 Arten der Blasenbildung

Vier Hauptwege der Blasenbildung werden unterschieden (Abbildung 1). Klassisch-homogene Nukleation (Typ I) findet ohne Partikel in der Flüssigkeit statt und bedarf extremen Übersättigungen bei der Stoffpaarung CO_2-H_2O. Klassisch-heterogene Nukleation (Typ II) setzt an gasfreien Feststoffoberflächen an. Sie benötigt ähnliche Übersättigungen wie die klassisch-homogene Nukleation. Nach einer erfolgreichen Typ II-Nukleation einer ersten Blase kann, nach dem Ablösen der Blase, ein Gasrest an der Feststoffoberfläche zurückbleiben. An diesem Gasrest kann dann Typ III- oder Typ IV-Nukleation stattfinden. Pseudoklassische Nukleation (Typ III) setzt schon bei niedriger Übersättigung an präexistierenden Gasräumen an, die als Mikroblasen oder an Feststoffen adsorbiert sind. Lokale Schwankungen der Übersättigung sind für das Anwachsen der Blasen mit $R<R_{krit}$ nötig. In der nicht-klassischen Nukleation (Typ IV) liegen Blasen oder adsorbierte Gasreste mit Krümmungsradien oberhalb des kritischen Radius vor. Diese Gaskavitäten wachsen weiter, indem Gas aus der übersättigten Lösung in die Kavität einströmt. Die Bezeichnung 'nicht-klassisch' rührt daher, dass für diese Form der Blasenbildung keine Energiehürde überwunden werden muß (Jones *et al*., 1999).

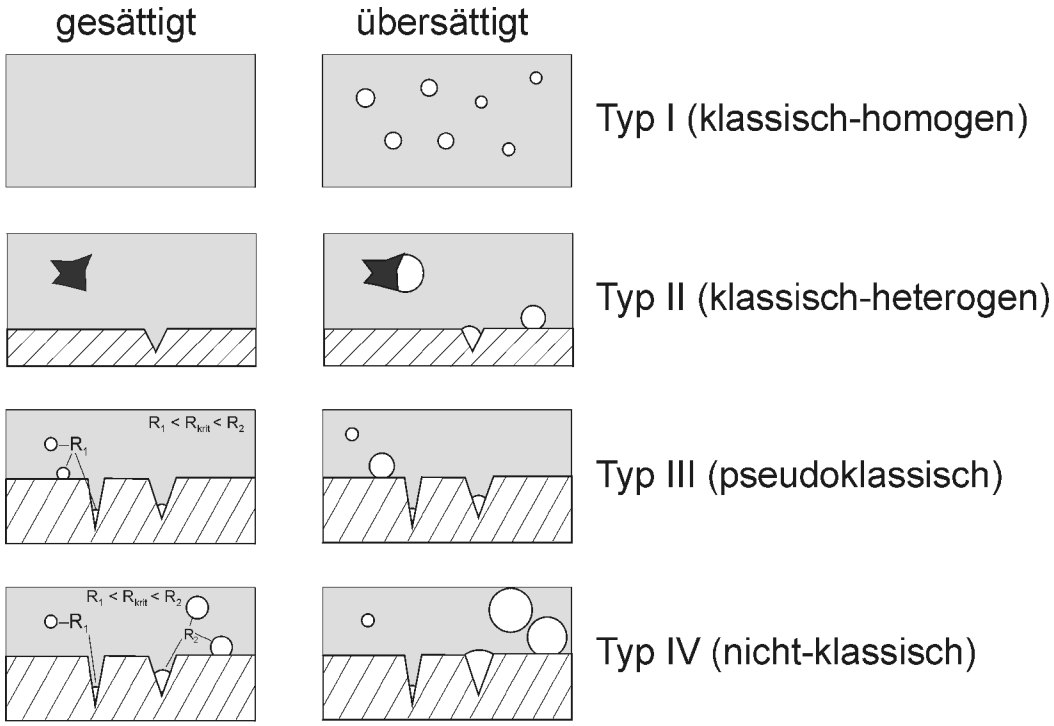

Abbildung 1: Wege der Nukleation von Gasblasen (Zeichnung nach Jones et al. 1999)

1.4.2 Vorgänge bei der Druckentlastung über einer karbonisierten Flüssigkeit

Beim Öffnen einer Flasche, die karbonisierte Flüssigkeit (Bier, Mineralwasser, Schaumwein) enthält, fällt der Systemdruck über der Flüssigkeit vom Sättigungsdruck auf Atmosphärendruck ab. Dabei entsättigt in kurzer Zeit ($< 10^{-5}$ s) eine geringe Flüssigkeitsschicht auf die dem neuen Systemdruck entsprechende Gleichgewichtskonzentration. In die Flüssigkeit hinein baut sich ein Konzentrationsgradient auf (Abbildung 2). Daher herrschen in den darunterliegenden Schichten nicht die gleichen Bedingungen hinsichtlich der Entsättigung der Flüssigkeit, die in der freien Oberfläche wirken.

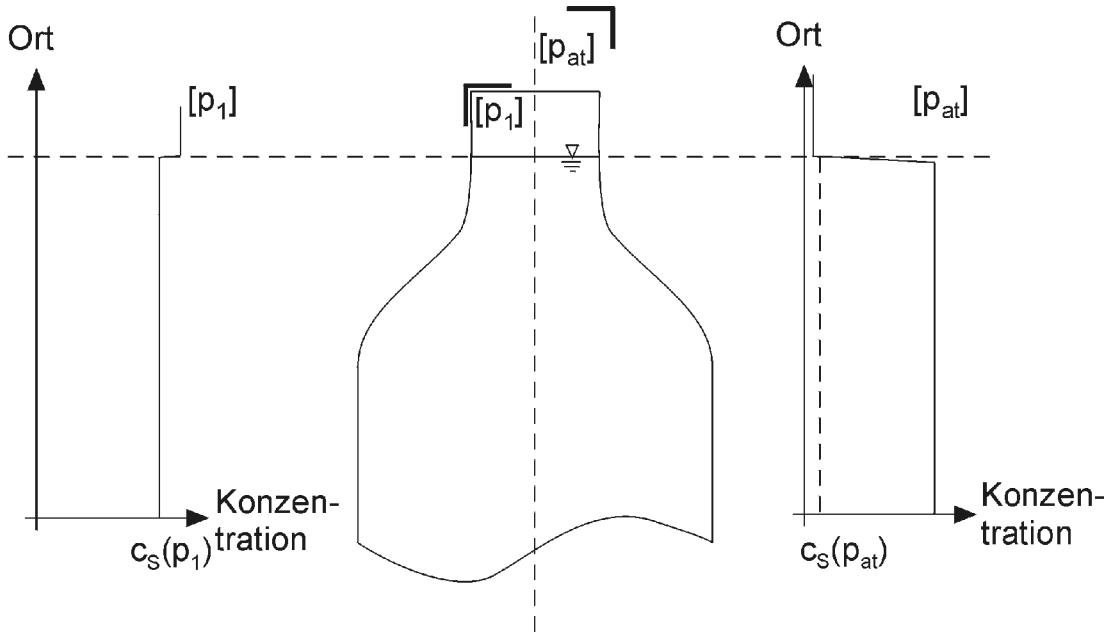

Abbildung 2: Gaskonzentration in der Flüssigkeit vor (links) und nach dem Öffnen der Flasche (rechts). Gleichgewichtskonzentration im Sättigungszustand bei pi: $c_S(p_i)$, Atmosphärendruck: p_{at}

1.4.3 Blasenaufbau und Blasenwachstum

Die Blasenbildung in Gushingbier vollzieht sich lediglich an Mikroblasen über einem bestimmten, kritischen Durchmesser oder an Partikeln mit anhaftenden Gasresten (nicht-klassische oder Typ IV-Nukleation) (Fischer, 2001). Das Anwachsen einer

Blase ist bestimmt von ihrem Radius, der Grenzflächenspannung, der Konzentration des Gases in der Flüssigkeit, aber auch von der Anwesenheit grenzflächenaktiver Stoffe. Der Aufbau von Blasen in Bier dürfte sich am besten durch das 'Modell variabler Permeabilität' nach Yount (1982) beschreiben lassen (vgl. Abbildung 3). Dabei wird der Außendruck $p_{außen}$ durch die Wirkung der Oberflächenspannung (bzw. des durch sie ausgeübten Drucks p_{OFS}) verstärkt. Eine Minderung dieses Drucks wird durch eine eventuelle mechanisch steife Belegung der Grenzfläche bewirkt, die z.B. aus einem verdichteten Proteinfilm bestehen kann. Diese steife Schicht übt p_{Haut} entgegen p_{OFS} sowie $p_{außen}$ aus und verringert damit die Wirkung der Oberflächenspannung und der Oberflächenspannung. An diese Schicht ist ein Reservoir von grenzflächenaktiven Molekülen adsorbiert, das im Falle eines mit Druckentlastung verbundenen Blasenwachstums einen sofortigen Nachschub von Molekülen in die Grenzfläche sichert. Eine ausführliche Darstellung zur Blasenbildung in karbonisierten Flüssigkeiten stammt von Fischer (2001).

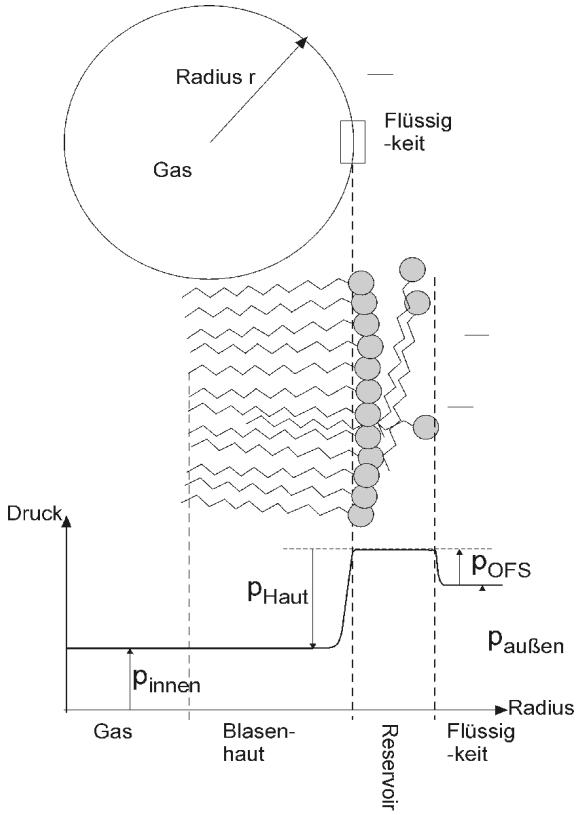

Abbildung 3: Blasenaufbau und Druckverlauf in der Nähe der Blasenwand, nach Yount (1982).

Beim Wachstum einer Blase wird durch Dilatation neue Grenzfläche freigelegt und Gas in die Blase aufgenommen. Beide Vorgänge werden im folgenden getrennt

erläutert, um die Übersichtlichkeit zu erhalten. Beim Wachstum der Blase wird aus der umgebenden Flüssigkeit heraus Gas in die Blase hinein diffundieren. In der Blasenwand und einer dünnen, wandnahen Grenzschicht außerhalb der Blase ist die Gaskonzentration abhängig vom Innendruck der Blase (Abbildung 4), ähnlich wie in der dünnen Grenzschicht gasdruckentlasteter Oberflächen. In größerer Entfernung zur Blase liegt das Gas in der im gesamten Reservoir herrschenden Konzentration der Flüssigphase vor, die durch die Sättigungsbedingungen (p; T) bestimmt ist. Dazwischen herrscht in einem Übergangsbereich ein Konzentrationsgradient, der von der höheren Sättigung der Flüssigkeit auf die Gleichgewichtskonzentration im wandnahen Bereich abfällt. Durch das Aufsteigen der Blase und das Voranschreiten der Blasenwand in die umgebende Flüssigkeit wird neue, gasgesättigte Flüssigkeit an die Blase herangeführt.

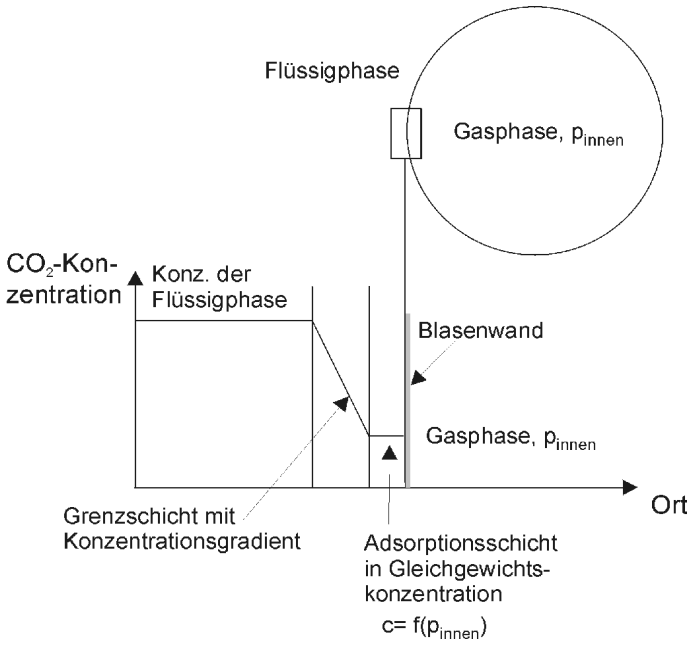

Abbildung 4: Schematische Darstellung des Verlaufs der Gaskonzentration in der Nähe einer Blasenwand, nach Ligier-Belair et al. (2002)

Die Vergrößerung der Oberfläche durch Dilatation vermindert die lokale Konzentration an grenzflächenaktiven Molekülen in der Oberfläche der Blase. Abhängig von der Konzentration an grenzflächenaktiven Molekülen in der kontinuierlichen Phase, den Diffusionsbedingungen, der Geschwindigkeit der Flächenzunahme und der des Aufstiegs kann die Oberflächenbelegung erhalten bleiben oder verarmen. Beim Aufsteigen der einer teilweise belegten Blase werden grenzflächenaktive Moleküle in den unteren Bereich der Blase abgeschoben (Marangoni-Effekt), der folglich versteift (Abbildung 5). Dadurch wird ein Gradient in der Grenzflächenspannung aufgebaut, der die Form der Blase beeinflußt . Die

Aufstiegsgeschwindigkeit von Blasen hängt auch von der Belegung der Grenzfläche ab. Mit Proteinen belegte Blasen steigen, durch molekulare Reibung gebremst, langsamer auf und verhalten sich wie feste, sphärische Körper, wohingegen solche mit teil- oder unbelegter Oberfläche schneller aufsteigen und sich leichter deformieren. In an grenzflächenaktive Stoffen armen Fluiden, wie z.B. Schaumweinen, wird die neu entstehende Grenzfläche nicht vollständig nachbelegt. In Bier findet eine völlige Belegung neuer Grenzflächen statt, die durch das strömungsmechanische Verhalten normaler, makroskopisch sichtbarer Blasen nachgewiesen werden konnte (Ligier-Belair, 2005).

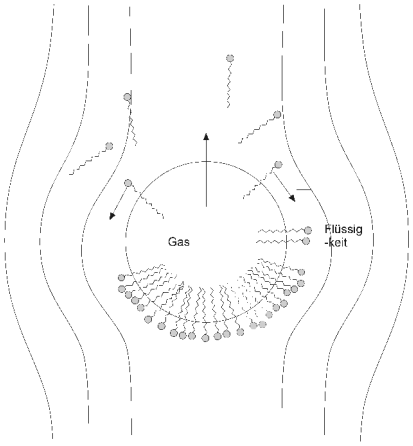

Abbildung 5: Aufsteigende Blase mit Verlagerung von grenzflächenaktiven Molekülen durch Strömungseffekte in stromabwärts gelegenen Bereich (Marangoni-Effekt), nach Ligier-Belair (2005)

Eine existierende Blase in Bier wird durch den Laplace-Druck CO_2 an die umgebende Flüssigkeit abgeben und dabei schrumpfen. Durch den Schrumpfvorgang wird die Grenzfläche komprimiert. Durch die mit der Kompression zunehmende Steifigkeit der Grenzfläche wird die Oberflächenspannung vermindert. Das Schrumpfen der Blase hört auf, wenn Innendruck und Druckminderung der Haut mit Außendruck und Druck aus der Oberflächenspannung im Gleichgewicht stehen. Durch die Kompression der Blasenhaut sinkt die Oberflächenspannung ab, ggf. auf Werte $\sigma \leq 0$, wodurch das Schrumpfen endet. Ein Ende des Schrumpfens ($\sigma \leq 0$,) kann auch durch lokales Einbeulen der Blase mit Vorzeichenänderung eines Hauptkrümmungsradius erfolgen. Eine deutliche Abweichung von der sphärischen Form ist auch durch das Vorhandensein von jeweils homogenen Bereichen aus Molekülen unterschiedlicher Grenzflächenaktivität und verschiedener mechanischer Steifigkeit in den Bereichen

vorstellbar (Abbildung 6).

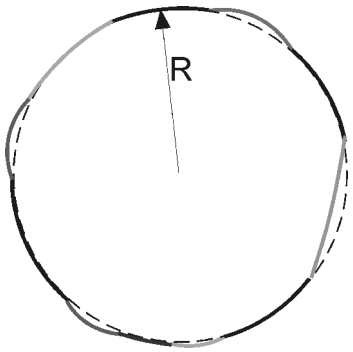

Abbildung 6: Mögliche Verformung der Blasenhaut durch jeweils homogene, abgegrenzte Bereiche mit unterschiedlichen Grenzflächenspannungen und mechanischen Eigenschaften

1.5 Zielsetzung

Oberflächenaktive Proteine werden als Auslöser oder beeinflussender Faktor von primärem Gushing diskutiert. Infrage kommende Proteine müssen funktionelle Eigenschaften wie Hitzestabilität, Grenzflächenaktivität, Fähigkeit zur Aggregation sowie evtl. Proteasestabilität besitzen. Solche Eingenschaften sind beispielsweise bei den ns-LTPs der Pflanzen oder den Hydrophobinen von Pilzen vorhanden.

Im Mittelpunkt dieser Arbeit sollte die Identifikation und Charakterisierung oberflächenaktiver Proteine mit entsprechenden Eigenschaften aus Kulturen gushing-relevanter Pilze stehen, unabhängig davon, ob dies Hydrophobine oder Proteine anderer Klassen sind. Eine mögliche Abhängigkeit der Bildung oberflächenaktiver Proteine vom jeweiligen Isolat sollte ebenfalls untersucht werden, sowie die Beeinflussung von Gushing durch solche Proteine. In der Folge sollten diese Proteine Bedingugnen des Brauprozesses unterworfen und hinsichtlich der Veränderung ihrer funktionellen Eigenschaften untersucht werden. Daraus sollten Aussagen darüber abgeleitet, ob diese Substanzen in ihrer nativen Form wirken oder ob Modifikationen während der Malz- und Bierbereitung eine entscheidende Rolle spielen. Der Nachweis dieser Proteine in Malzen mit Gushingpotential sollte mittels polyklonaler Antikörper geführt werden. Die Untersuchung der Veränderung des Gehalts an hydrophoben Getreideproteinen durch Infektion von Getreide mit gushing-relevanten Pilzisolaten und solchen, die üblicherweise kein Gushing verursachen, war ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit. Die gushing-beeinflussende Wirkung von Pilz- bzw. Getreideproteinen sollte nach deren heterologer Expression in *S. cerevisiae* während der Gärung *in situ* untersucht werden. Insgesamt sollte in dieser Arbeit die Rolle oberflächenaktiver Proteine aus *Fusarium culmorum* bei der Entstehung von Gushing beschrieben werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Ausstattung

2.1.1.1 Geräte

Gerät	Typ	Hersteller
1D-Gelelektrophorese	Mini Protean III Cell	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Auswertungssoftware für Gele	BioNumerics 2.0	Applied Maths Inc., Austin, Texas, USA
Autoklav	2540 ELV	Systec GmbH, Wettenberg, D
Autoklav	Varioklav	H + P Labortechnik, Oberschleißheim, D
Elektroblotter	HEP-1 The Panther™	Owl Separation Systems, Portsmouth, NH, USA
FPLC-Anlage	BioLogic HR Controller, BioLogic HR Workstation, Modell 2128 Fraction Controller	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Klimaschrank	Certomat BS-1	B. Braun Biotech International, Melsungen, D
Leuchtstoffröhre Weißlicht	Osram L 18W/25	Osram, München, D
Leuchtstoffröhre kurzwellig	Sylvania F 18W/25 BLB	Sylvania, Danvers, MA, USA
Magnetrührer	RCT-Basic	Mettler-Toledo, Gießen, D
Membranpumpe	Laboport	KNF Neuberger GmbH, Freiburg, D
Mikrotiterplatten-Lesegerät	TECAN SPECTRAFluor	TECAN Deutschland GmbH, Crailsheim, D
Mühle	DLFU-Scheibenmühle	Bühler, Braunschweig, D
Orbitalschüttler	Certomat R	B. Braun Biotech International, Melsungen, D
pH-Elektrode	InLab 412, pH 0 -14	Mettler-Toledo, Gießen, D
pH-Meter	Knick pH 761 Calimatic	Knick elektronische Geräte, Berlin, D
Pipetten 0,5-10 µL, 10-100 µL	Modellbezeichnung unbekannt	Eppendorf, Hamburg, D
Pipetten 100-1000 µL, 1000-5000 µL	Pipetman	Gilson-Abimed, Langenfeld, D

Gerät	Typ	Hersteller
Rotationsverdampfer	Heidolph VV 2200, Wärmebad WB 2000, Membranpumpe Laboport KNF Neuberger	Heidolph Instruments, Schwabach, D
Präparative isoelektrische Fokussierung	Rotofor Cell (60 mL-Ausführung)	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Scanner	Epson Expression 1600	Epson, Meerbusch, D
Speedvac	Maxidry plus	Heto-Holten, Holten, D
Spektralphotometer (Fluoreszenz)	LS 50	Perkin-Elmer, Wellesley, MA, USA
Sterilwerkbank	Hera Safe	Heraeus, Hanau, D
Trockenschrank	Memmert	Memmert, Schwabach, D
Überkopfschüttler	Eigenbau aus einem Betonmischer (ATIKA 130)	ATIKA, Ahlen, D
UV-Photometer	LKB Biochrom 4060	Parmacia, Uppsala, SE
Vakuumtrockner für Gele	MaxiDry plus	Heto-Holten, Holten, D
Wasserentsalzungs-anlage	Euro 25 und RS 90-4/UF Reinstwassersystem	SG Wasseraufbereitung GmbH, Barsbüttel, D
Wasserstrahlpumpe	Metallausführung	HAAKE, Berlin/Karlsruhe, D
Zentrifuge	Sigma 1 K 15	Sigma Labortechnik, Osterrode am Harz, D
Zentrifuge	Laborzentrifuge J-6	Beckman, Palo Alto, CA, USA
Zentrifuge	Laborzentrifuge J-2	Beckman, Palo Alto, CA, USA
Zentrifuge	Laborzentrifuge Hermle Z 383 K	Hermle Labortechnik, Wehningen, D
Zerschäumer	Eigenbau des Verfassers	

Chromatographische Säulen		
Anionenaustauscher-Säule	HiLoad 16/10 Q Sepharose HP	Amersham Biosciences, Uppsala, SE
Entsalzungssäule	HiPrep 26/10 Desalting	Amersham Biosciences, Uppsala, SE
Kationenaustauscher-Säule	HiTrap CM 5 mL	Amersham Biosciences, Uppsala, SE
Optimierungskit Hydrophobe Interaktion	HiTrap 1 mL HIC Selection Kit	Amersham Biosciences, Uppsala, SE
Optimierungskit Ionenaustauscher	HiTrap 1 mL IEX Selection Kit	Amersham Biosciences, Uppsala, SE

2D-Gelelektrophorese		
Gerät	**Typ**	**Hersteller**

2D-Gelelektrophorese		
Elektrophoresekammer	Hoefer-DALT, Modell D 440-230V	Amersham Biosciences, Uppsala, SE
Fokussierkammer	2D-Multiphor II	Amersham Biosciences, Uppsala, SE
Kühler	Multitemp III	Amersham Biosciences, Uppsala, SE
Umwälzpumpe	Modell: TE-3-MD-Sc	Little Giant Pump Co., Oklahoma Cty., OA, USA
Quellkammer für IPG-Streifen	Immobiline Dry-Strip Reswelling Tray	Amersham Biosciences, Uppsala, SE
Spannungsquelle	EPS 3501 XL	Amersham Biosciences, Uppsala, SE

Kurvendarstellung und -auswertung		
SigmaPlot	SigmaPlot Version 8.0	Systat Software Inc., Richmond,CA, USA

2.1.1.2 Verbrauchsmaterialien

Produkt	**Typ**	**Hersteller**
Blotting-Papier	GB 003	Schleicher & Schuell, dassel, D
Büchnertrichter	Für Rundfilter Ø 70 mm	Haldenwang, Berlin, D
Einweg-Pipettenspitzen	Diverse Größen	Peske, Aindling, D
Einwegspritzen	Diverse Größen von 1 mL bis 60 mL	BD Becton-Dickinson, Heidelberg, D
Filter	Faltenfilter $595^{1/2}$, Ø 385 mm; Rundfilter 595 Ø 70 mm; Rundfilter 589^{3} Ø 150 mm	Schleicher & Schuell, dassel, D
Fernbachkolben	Durchmesser 20 cm, mit Bördelrand	Schott, Mainz, D
Glukosebestimmungs-Kit	D-Glucose-UV method Kit	r-biopharm, Darmstadt, D
IPG-Streifen	Immobiline DryStrip Gel, pH 3 – 10 linear, 18 cm	Amersham Biosciences, Uppsala, SE
Klonierung von PCR-Produkten	QuickClone Kit	Genaxxon BioScience GmbH, Biberach, D
Kronkorken	Mit doppeltem Dichtring	Brüninghaus, Versmold, D
Küvetten	Nr. 67.755 Acryl	Sarstedt, Nümbrecht, D

Produkt	Typ	Hersteller
Küvetten (Quarzglas)	Normiert	Hellma, Müllheim, D
Mikrotiterplatten	96 well, flat bottom, polystyrene, Nr. 82.1581.001	Sarstedt, Nümbrecht, D
Parafilm®	Rollenbreite 4 Zoll	Pechiney Plastic Packaging, Menasha, WI, USA
PD 10-Säulen	Gefüllt mit Sephadex G-25, fertig konfektioniert	Amersham Biosciences, Uppsala, SE
Petrischalen	92 x 16 mm ohne Nocken	Sarstedt, Nümbrecht, D
Plasmidpräparation	E.Z.N.A. Plasmid Miniprep Kit I (S-Line), Art.No. 12-6943-02	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, D
PVDF-Membran (Sequenzierung)	Immobilon PSQ	Millipore, Billerica, MA, USA
PVDF-Membran (Sequenzierung)	Porablot PVDF	Macherey & Nagel, Düren, D
PVDF-Membran (western blots)	Immun-Blot PVDF	Bio-Rad, München, D
Reaktionsgefäße	200 µL, 500 µL, 1,5 mL, 2,0 mL	Eppendorf, Hamburg, D
Reinigung von PCR-Produkten	QIAquick PCR Purification Kit Cat.No. 28106	Qiagen GmbH, Hilden, D
Sample application pieces		Amersham Biosciences, Uppsala, SE
Saugflaschen	0,5 L bis 5 L, Erlenmeyer-Form	Schott, Mainz, D
Sterilfilter	Spritzenvorsatzfilter 0,2 µm und 0,45 µm mit Nylonmembran, Ø 30 mm	Schleicher & Schuell, dassel, D
Taq-Polymerase	Arrow Taq DNA Polymerase	MP Biomedicals, Eschwege, D
Zellstoff zur Filtration	29x38 cm in Lagen, hochgebleicht	Lohmann & Rauscher, Rengsdorf, D
Zentrifugenröhrchen	15 mL und 50 mL	Sarstedt, Nümbrecht, D
Zentrifugenröhrchen für die Ultrafiltration	Amicon Ultra 4 und 15 , MWCO 5000, Amicon Centriprep Concentrators MWCO 3000	Millipore, Billerica, MA, USA

2.1.2 Chemikalien

Produkt	Reinheit	Hersteller
1-anilino-8-naphtalin-sulfonsäure, Ammoniumsalz	For fluorescence	FLUKA, Steinheim, D
2-Butanol	p.a.	Merck, Darmstadt, D
Acrylamid/Bis 29:1 (für 2D–Gele)	high purity	Gerbu Biotechnik GmbH, Gailberg, D
Acrylamid/Bis 37,5:1 (für Tris-Tricin-Gele)	electrophoresis grade	Bio-Rad Laboratories, München, D
Agar	European Agar	Difco, BD Biosciences, Heidelberg, D
Agarose	Seakem® LE Agarose	Cambrex Bio Sciences Rockland Inc., Rockland, USA
$AgNO_3$	reinst	Merck, Darmstadt, D
Ameisensäure	98-100 %, p.a.	Merck, Darmstadt, D
Ammoniumpersulfat	electrophoresis grade	SERVA, Heidelberg, D
Aminosäuren, diverse	für biochemische Zwecke	Merck, Darmstadt, D
Anti-Kaninchen-IgG-Antikörper (Schwein)/ Biotin		DAKO Cytomation, Hamburg, D
Anti-Kaninchen-IgG-Antikörper (Ziege)		DAKO Cytomation, Hamburg, D
BCIP		Gerbu Biotechnik GmbH, Gailberg, D
BioLyte pH 3-6 bzw. pH 3-10		Bio-Rad Laboratories, München, D
Brenztraubensäure	p.a.	FLUKA, Steinheim, D
Bromphenolblau, Na-Salz	for electrophoresis	SIGMA–Aldrich, Steinheim, D
CHAPS	> 99 %	Gerbu Biotechnik GmbH, Gailberg, D
Coomassie-Blau	R350 PhastGel™ Blue R	Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, SE
CTAB	p.a.	Merck, Darmstadt, D
D(+)-Glukosemonohydrat	Für die Mikrobiologie	Merck, Darmstadt, D
DL-Äpfelsäure	Ph. Eur.	Merck, Darmstadt, D
DL-Milchsäure	Ph. Eur.	Merck, Darmstadt, D
DTT (Dithiothreitol)	High purity, for molecular biology	Gerbu Biotechnik GmbH, Gailberg, D
EDTA, Di-Na-Salz	For molecular biology	SIGMA–Aldrich, Steinheim, D

Produkt	Reinheit	Hersteller
Essigsäure (Eisessig, 99-100 %)	HPLC-grade	Mallinckrodt Baker B.V., Deventer, NL
Ethanol, absolut	HPLC-grade	Mallinckrodt Baker B.V., Deventer, NL
Ethanol, vergällt	99 % vergällt m. 1 % Methylethylketon	Chemikalien und Laborbedarf Nierle, Freising, D
Ethanolamin	p.a.	Merck, Darmstadt, D
Formaldehyd, 36,5-37 %	For molecular biology	SIGMA–Aldrich, Steinheim, D
Fructose	Für die Mikrobiologie	Merck, Darmstadt, D
Glyzin	p.a.	Merck, Darmstadt, D
Glyzerin, 87 %	zur Analyse	Gerbu Biotechnik GmbH, Gailberg, D
Glyzerin, wasserfrei	BioChemika Ultra 99,5 %	SIGMA–Aldrich, Steinheim, D
H_3PO_4, 85 %	p.a.	Merck, Darmstadt, D
Harnstoff	für biochemische Zwecke	Merck, Darmstadt, D
HCl, div. Konzentrationen	reinst, PhEur	Merck, Darmstadt, D
Hefe-Kohlenstoffbasis	Bacto®	Difco, BD Biosciences, Heidelberg, D
Hefe-Stickstoffbasis	Bacto®	Difco, BD Biosciences, Heidelberg, D
Hefeextrakt	Bacto®	Difco, BD Biosciences, Heidelberg, D
Iodacetamid	SigmaUltra	SIGMA–Aldrich, Steinheim, D
$K_2HPO_4x3H_2O$	p.a.	Merck, Darmstadt, D
KCl	p.a.	Merck, Darmstadt, D
KNO_3	p.a.	Merck, Darmstadt, D
LiChrosolv®-Wasser	Für die Chromatographie	Merck, Darmstadt, D
$MgCl_2$ x 6 H_2O	p.a.	Merck, Darmstadt, D
Maltodextrin		FLUKA, Steinheim, D
Maltose	Für die Mikrobiologie	Merck, Darmstadt, D
Methanol	HPLC-grade	Mallinckrodt Baker B.V., Deventer, NL
Methanol	Technische Qualität und p.a.	Chemikalien und Laborbedarf Nierle, Freising, D
$MgSO_4$ x 7 H_2O	p.a.	Merck, Darmstadt, D
Mineralöl (Dry Strip Cover Fluid)		Amersham Biosciences, Uppsala, SE
Molekulargewichts-marker für die Gelelektrophorese	Precision Plus Protein Standards, stained & unstained	Bio-Rad Laboratories, München, D

Produkt	**Reinheit**	**Hersteller**
Molekulargewichts-marker für die Gelelektrophorese	PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, D
Na_2CO_3	p.a.	Merck, Darmstadt, D
$Na_2S_2O_3$ x 5 H_2O	p.a.	Merck, Darmstadt, D
NaCl	p.a.	Merck, Darmstadt, D
NaH_2PO_4	p.a.	Merck, Darmstadt, D
NaOH	p.a.	Merck, Darmstadt, D
NaOH, 2 M	p.a.	Merck, Darmstadt, D
Natriumazid	p.a.	Merck, Darmstadt, D
NBT		Gerbu Biotechnik GmbH, Gailberg, D
$(NH_4)_2SO_4$	Reinst, wenn für Fällungen, p.a., wenn für Medien	Merck, Darmstadt, D
Pepton aus Sojabohnenmehl	Für die Mikrobiologie	Merck, Darmstadt, D
Pharmalyte 3-10	ohne Angabe	Amersham Biosciences, Uppsala, SE
Rinderserumalbumin (BSA)	Fraktion V, für biochemische Zwecke	Merck, Darmstadt, D
Roti®Blue, 5 x konzentriert		Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, D
Saccharose	Für die Mikrobiologie	Merck, Darmstadt, D
SDS	research grade	SERVA, Heidelberg, D
Streptavidin-APase		DAKO Cytomation, Hamburg, D
TEMED	p.a.	Merck, Darmstadt, D
Thioglykolsäure		SIGMA–Aldrich, Steinheim, D
Thioharnstoff	p.a.	Merck, Darmstadt, D
Tongranulat, 4-5 mm		Terrasan GmbH, Ingolstadt, D
Tricin	p.a.	Merck, Darmstadt, D
Triethylamin	Biochemika Ultra 99,5 %	SIGMA–Aldrich, Steinheim, D
Trifluoressigsäure	Zur Synthese	Merck, Darmstadt, D
Tris Base	ultra pure	ICN Biomedicals, Inc., Ohio, USA
Tris-HCl	p.a.	Merck, Darmstadt, D
Trypsinogen aus Rinderpankreas	PMSF treated	SIGMA–Aldrich, Steinheim, D
Tween 20	Ph. Eur.	Merck, Darmstadt, D
Wasser, vollentsalzt	0,05 µS/cm	Laboreigene Anlage
Zitronensäure	Biochemika Ultra 99,5 %	SIGMA–Aldrich, Steinheim, D

Chemikalien, die nicht aufgeführt sind, waren grundsätzlich Analysenqualität.

2.1.3 Puffer und Lösungen

Im folgenden sind die Rezepturen der verwendeten Puffer und Lösungen nach ihren Einsatzgebieten (Chromatographie, Gelelektrophorese usw.) geordnet aufgeführt.

2.1.3.1 Tris-Tricin-Gele nach Schägger & v. Jagow (1987)

Für zwei Gele in einer MiniProtean III-Kammer :

Trenngel

(16 % Acrylamid, 1,0 M Tris-HCl, pH 8,45)

5,30 mL	Acrylamid 30 % 37,5:1
3,33 mL	Gelpuffer
1,06 mL	Glyzerin (= 1,33 g)
0,20 mL	LiChroSolv®-Wasser
50 µL	20 %ige SDS–Lösung
5 µL	TEMED
17 µL	10 %ige, frisch angesetzte APS–Lösung

Sammelgel

(4 %Acrylamid, 0,4 M Tris-HCl, pH 8,45)

0,68 mL	Acrylamid 30% 37,5:1
1,29 mL	Gelpuffer
3,21 mL	LiChroSolv-Wasser
20 µL	20 %ige SDS–Lösung
3 µL	TEMED
10,4 µL	10 %ige, frisch angesetzte APS–Lösung

Gelpuffer

(3,9 M Tris-Base)

472,8 g	Tris–Base in ca. 500 mL vollentsalztem Wasser lösen
pH 8,45	einstellen mit HCl (37 %)
ad 1000 mL	mit vollentsalztem Wasser

n.b.: Vollständiges Lösen der Tris-Base fand erst bei Säurezugabe statt.

5 x-Kathodenpuffer

(0,5 M Tris-Base, 0,5 M Tricin, 3,5 mM SDS)

60,55 g	Tris–Base
89,60 g	Tricin
5,00 mL	SDS–Lösung (20 %)
ad 1000 mL	mit vollentsalztem Wasser

Ein Einstellen des pH-Wertes war nicht nötig. Dieser Puffer war bei 4 °C mindestens einen Monat haltbar. Bei Elektrophoresen für Sequenzierzwecke wurde 2 mM Thioglykolsäure als Scavenger für restliches APS zugesetzt.

5 x-Anodenpuffer

(1,0 M Tris, pH 8,9)

121,14 g	Tris–Base in ca. 750 mL vollentsalztem Wasser lösen
pH 8,9	einstellen mit HCl (37 %)
ad 1000 mL	mit vollentsalztem H_20

Probenauftragspuffer, 2 x konz.

0,50 mL	0,5 M Tris-HCl pH 6,8
0,40 g	SDS
1,50 g	Glyzerin
0,15 g	DTT
2 mg	Bromphenolblau
ad 10 mL	vollentsalztes Wasser

2.1.3.2 Eindimensionale Gelelektrophorese nach Laemmli (1970)

Sammelgel

(4 % Acrylamid, pH 6,8)

6,1 mL	vollentsalztes Wasser
2,5 mL	0,5 M Tris-HCl, pH 6,8
50,0 µL	20 % (w /v) SDS
1,3 mL	Acrylamid/Bis (29:1)
50,0 µL	10 % Ammoniumpersulfat
5,0 µL	TEMED

Trenngel

(12 % Acrylamid, pH 8,8)

3,35 mL	vollentsalztes Wasser
2,5 mL	1,5 M Tris-HCl, pH 8,8
50,0 µL	20 % SDS
4,0 mL	Acrylamid/Bis (29:1)
50,0 µL	10 % Ammoniumpersulfat
5,0 µL	TEMED

5x-Probenpuffer

(0,05 M Tris-HCl pH 6,8, 20 % Glyzerin, 1,5 % SDS, 5 % 2-Mercaptoethanol, 0,02 % Bromphenolblau)

1,0 mL	0,5 M Tris-HCl pH 6,8
0,15 g	SDS
2,0 g	Glyzerin
0,5 mL	2-Mercaptoethanol (vor Gebrauch zusetzen)
2 mg	Bromphenolblau
ad 10 mL	vollentsalztes Wasser

5x-Elektrodenpuffer

(1 M Glycin, 0,12 M Tris, 17 mM SDS)

72 g	Glycin
15 g	Tris-Base
5 g	SDS
ad 1000 mL	mit vollentsalztem Wasser

2.1.3.3 Lösungen und Puffer für die 2D-Gelelektrophorese

CHAPS–Quelllösung

(6,71 M Harnstoff, 1,79 M Thioharnstoff, 0,2 % DTT, 0,2 % Ampholyt)

21,0 g	Harnstoff
7,10 g	Thioharnstoff

Beide Bestandteile wurden in 35 mL vollentsalztem Wasser gelöst, auf 50 mL aufgefüllt und über Papierfilter (Schleicher & Schuell 595) filtriert. In 48 mL des Filtrats wurden folgende Stoffe gelöst und mit vollentsalztem Wasser auf 50 mL aufgefüllt:

250 mg	CHAPS
100 mg	0,2 % DTT
300 µL	0,2 % Pharmalyte 3-10

n.b.: Lösung nicht über 37 °C erwärmen.

Glyzerinlösung (50 %)

86,25 g	Glyzerin (87 %)
63,75 g	vollentsalztes Wasser
1 mg	Bromphenolblau

Gelpuffer–gesättigtes 2-butanol:

20 mL	Gelpuffer D
30 mL	2-butanol

Beide Komponenten wurden vermischt und geschüttelt. Zur Phasentrennung wurde 5 min bei 5000 x g zentrifugiert, die organische Phase durch Dekantieren abgetrennt und zum Überschichten der Gele verwendet. Auf das häufig praktizierte Verwenden von 1-butanol wurde wegen der Geruchsbelastung durch Oxidation zu Buttersäure verzichtet.

Äquilibrierpuffer für die IPG-Streifen

(6 M Harnstoff, 0,09 M SDS)

72,0 g	Harnstoff
69,0 g	Glyzerin (87 %)
5,0 g	SDS
6,6 mL	Puffer T (pH 8,8)
ad 200 mL	mit vollentsalztem Wasser

Die Bestandteile wurden in 100 mL voll entsalztem Wasser gelöst und auf 200 mL aufgefüllt. Für die Reduktion wurden 100 mL dieses Puffers mit 2 g DTT gemischt. Für die anschließende Alkylierung wurden 100 mL dieses Puffers mit 4 g Iodacetamid gemischt.

Puffer T

(1,5 M Tris-Base, 0,01 M SDS)

18,2 g	Tris-Base
0,4 g	SDS in 80 mL vollentsalztem Wasser lösen
pH 8,8	mit 4 N HCl
ad 100 mL	mit vollentsalztem Wasser

Dieser Puffer war bei 4 °C mindestens zwei Wochen haltbar.

Gelpuffer D

(1,5 M Tris-Base, 0,01 M SDS)

90,83 g	Tris-Base
2,00 g	SDS in 300 mL vollentsalztem Wasser lösen
pH 8,6	mit 4 N HCl
ad 500 mL	mit vollentsalztem Wasser

Dieser Puffer war bei 4 °C mindestens zwei Wochen haltbar.

Tankpuffer

(0,002 M SDS, 0,21 M Glyzin, 0,025 M Tris)

Gesamtvolumen im Tank: 19,1 L

15 L vollentsalztes Wasser, in der Elektrophoresekammer vorzulegen.

19,9 g	SDS
299,6 g	Glyzin
58,0 g	Tris-Base
3,0 L	vollentsalztes Wasser

Die Komponenten wurden in der angegebenen Menge vollentsalztem Wasser gelöst und anschließend in die Kammer gefüllt. Der Pufferbehälter wurde mit 1,9 L vollentsalztem Wasser nachgespült. Das Nachspülwasser wurde ebenfalls in die Kammer geben.

CHAPS-Lysepuffer

(6,71 M Harnstoff, 1,79 M Thioharnstoff, 65 mM CHAPS)

21,0 g	Harnstoff
7,1 g	Thioharnstoff
ad 50 mL	mit vollentsalztem Wasser

Die Lösung wurde über Papierfilter (Schleicher & Schuell 595) filtriert und zu 48 mL des Filtrats folgende Substanzen zugeben:

2,0 g	CHAPS
0,5 g	DTT 1 %
0,75 mL	Pharmalyte 3-10 (0,5%)
ad 50 mL	mit vollentsalztem Wasser

Dieser Puffer wurde aliquotiert und bei -75 °C gelagert.

Agaroselösung zum Fixieren der IPG-Streifen auf den Gelen

0,6 g	Agarose
100 mL	Puffer aus der Elektrophoresekammer
2 mg	Bromphenolblau

Agarose wurde durch Erhitzen gelöst und Lösung im Wasserbad heißgehalten.

2.1.3.4 Färbelösungen für Tris-Tricin-Gele (RotiBlue)

Fixierlösung für Roti®Blue-Färbung

20 mL	Methanol
80 mL	vollentsalztes Wasser
2,0 mL	H_3PO_4 (85 %)

Färbelösung

60 mL vollentsalztes Wasser
20 mL Methanol
20 mL Roti®Blue

Färbung fand quantitativ in 48 h auf einem Orbitalschüttler bei 50 rpm statt.

2.1.3.5 Färbelösungen für Gele und Blots (Coomassie)

Coomassie-Färbelösung für Gele

(0,1 % CBB, 10 % Essigsäure, 40 % Methanol)

0,50 g CBB unter Rühren lösen in
200 mL Methanol *p.a.,* dann
50 mL Eisessig zufügen,
ad 500 mL mit vollentsalztem Wasser

Nach Einstellen des Volumens über wurde über Faltenfilter (Schleicher und Schuell 595½) filtriert. Für Gele, die nicht zur Sequenzierung dienten konnte technisches Methanol verwendet werden.

Entfärbelösung: wie Färbelösung, nur ohne CBB.

Coomassie-Färbelösung für Blots

(0,1 % CBB, 1 % Essigsäure, 50 % Methanol)

0,50 g CBB unter Rühren lösen in
250 mL Methanol *p.a.,* dann
5,0 mL Eisessig zugeben und
ad 500 mL mit vollentsalztem Wasser

Nach Einstellen des Volumens über wurde über Faltenfilter (Schleicher und Schuell 595½) filtriert.

Entfärbelösung: 50 % Methanol

2.1.3.6 Silberfärbung nach Blum *et al.* (1987)

Benötigt wurden je Lösung 2000 mL für 10 2D-Gele oder 100 mL für ein 1D-Gel.

Fixierlösung

(10 % Essigsäure, 40 % Ethanol)

800 mL	Ethanol
200 mL	Essigsäure
ad 1000 mL	vollentsalztes Wasser

Waschlösung

(30 % Ethanol)

600 mL	Ethanol
ad 2000 mL	mit vollentsalztem Wasser

Thiosulfat–Reagens

(0,8 mM Na-Thiosulfat)

400 mg	Natriumthiosulfat
ad 2000 mL	vollentsalztes Wasser

Silbernitrat–Reagens

(0,01 M Silbernitrat)

4,0 g	Silbernitrat
ad 2000 mL	mit vollentsalztem Wasser
400 µL	Formaldehyd (37 %)

ACHTUNG: Formaldehyd erst unmittelbar vor dem Gebrauch der Lösung zusetzen.

Entwickler

(0,28 M Na-Carbonat, 0,02 mM Na-Thiosulfat)

60,0 g	Natriumcarbonat
1,0 mL	Formaldehyd (37 %)
10 mg	Natriumthiosulfat
ad 2000 mL	Voll entsalztes Wasser

ACHTUNG: Formaldehyd erst unmittelbar vor dem Gebrauch der Lösung zusetzen.

Stopplösung

(0,07 M Glyzin)

10 g	Glyzin
ad 2000 mL	mit vollentsalztem Wasser

2.1.3.7 Kontinuierlicher CAPS-Methanol-Blotting-Puffer

(10 mM_CAPS, 10 % Methanol, pH 11,0)

2,21 g	CAPS in 700 mL vollentsalztem Wasser lösen
100 mL	Methanol *p.a.*
pH 11,0	einstellen mit NaOH (2 M)
ad1000 mL	mit vollentsalztem Wasser

2.1.3.8 Puffer für die Proteinreinigung

TEA-Startpuffer

(20 mM Triethylamin-CO_2, pH 10,0)

2,77 mL	Triethylamin
ad 1000 mL	mit vollentsalztem Wasser
pH 10,0	einstellen mit CO_2

TEA-Elutionspuffer

(20 mM Triethylamin-CO_2, 1,0 M NaCl, pH 10,0)

wie Startpuffer, jedoch mit 1,0 M NaCl (=58,4 g/L)

2.1.3.9 Schrumpflösung für die Archivierung der Gele

(30 % Ethanol, 12 % Glyzerin)

600 mL	Ethanol
276 g	Glyzerin (87 %)
1,2 L	vollentsalztes Wasser

2.1.3.10 Synthetische Würze

Doppelt konzentrierte Zuckerkomponente:

2,3 g	Glucose-Monohydrat
0,6 g	Fructose
0,6 g	Saccharose
10,0 g	Maltose-Monohydrat
6,0 g	Maltodextrin
ad 100 mL	mit vollentsalztem Wasser

Doppelt konzentrierte Säurekomponente:

15 mg	DL-Äpfelsäure
15 mg	Brenztraubensäure
40 mg	Zitronensäure
20 mg	Essigsäure
52 mg	DL-Milchsäure
4 mg	Ameisensäure
ad 100 mL	mit vollentsalztem Wasser

Vor dem Justieren des Volumens wurde der gewünschte pH-Wert eingestellt. Um eine gebrauchsfertige, einfach konzentrierte Lösung zu erhalten, wurden beide Komponenten im Verhältnis 1+1 gemischt.

2.1.3.11 Puffer für *Western Blots*

TBS-Puffer

(20 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, pH 7,5)

2,42 g	Tris-Base
2,92 g	NaCl in 800 mL vollentsalztem Wasser lösen
pH 7,5	mit HCl einstellen
ad 1000 mL	mit vollentsalztem Wasser

Blocking-Puffer

(20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7,5)

2,42 g	Tris-Base
8,76 g	NaCl in 800 mL vollentsalztem Wasser lösen
pH 7,5	mit HCl einstellen
ad 1000 mL	mit vollentsalztem Wasser

Vor Gebrauch wurde 1 g Rinderserumalbumin je 100 mL frisch zugesetzt.

TBS-T-Puffer

(20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0,05 % Tween 20, pH 7,5)

2,42 g	Tris-Base
8,76 g	NaCl in 800 mL vollentsalztem Wasser lösen
pH 7,5	mit HCl einstellen
0,50 g	Tween 20
ad 1000 mL	mit vollentsalztem Wasser

Entwicklerlösung

(100 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 5 mM $MgCl_2$, pH 9,5)

12,1 g	Tris-Base
5,8 g	NaCl in 800 mL vollentsalztem Wasser lösen
1,0 g	$MgCl_2$ x 6 H_2O
pH 7,5	mit HCl einstellen
ad 1000 mL	mit vollentsalztem Wasser

Zu 25 mL Entwickler wurden direkt vor Gebrauch 75 µL BCIP-Lösung und 100 µL NBT-Lösung zugesetzt (Menge für einen Blot 7 cm x 9 cm).

Stopplösung

(10 mM EDTA-Na_2)

3,7 g	EDTA-Na_2 x 2 H_2O
ad 1000 mL	mit vollentsalztem Wasser

NBT-Konzentrat

75 mg	NBT
1,00 mL	70 % N,N´-dimethyl-formamid

BCIP-Konzentrat

50 mg	BCIP
1,00 mL	70 % N,N´-dimethyl-formamid
1,00 mL	vollentsalztes Wasser

2.1.3.12 Puffer und Lösungen zur Messung der Oberflächenhydrophobizität mit ANS

Puffer für die ANS-Lösung

(0,10 M Kaliumphosphat-Puffer, pH 7,0)

14,03 g	K_2HPO_4 x 3 H_2O
5,24 g	KH_2PO_4
ad 1000 mL	mit vollentsalztem Wasser
pH 7,0	überprüfen

Für 25 mL ANS-Lösung wurden 63,3 mg in einen 25 mL-Meßkolben eingewogen und mit 0,10 M Phosphatpuffer aufgefüllt. Die Lösung wurde im Kühlschrank aufbewahrt und in Aluminiumfolie verpackt, um Lichtzutritt zu verhindern.

Probenverdünnungspuffer

(0,01 M Kaliumphosphat-Puffer, pH 7,4)

1,62 g	K_2HPO_4 x 3 H_2O
0,39 g	KH_2PO_4
ad 1000 mL	mit vollentsalztem Wasser
pH 7,4	überprüfen

Citratpuffer pH 3,4 bzw. 4,5

(50 mM Na-Citrat)

9,6 g	Zitronensäure in ca. 600 ml vollentsalztem Wasser lösen
pH 3,4	mit 4 N NaOH einstellen (ggf. pH 4,5 einstellen)
ad 1000 mL	mit vollentsalztem Wasser

2.1.4 Medien

2.1.4.1 Synthetischer nährstoffarmer Agar (SNA) nach Nirenberg (1976), modifiziert

(10 mM KH_2PO_4, 10 mM KNO_3, 2 mM $MgSO_4$, 6,7 mM KCl, 2 mM Glukose, 1,2 mM Saccharose)

1,4 g	KH_2PO_4
1,0 g	KNO_3
0,5 g	$MgSO_4$ x 7 H_2O
0,5 g	KCl
0,4 g	Glukose-Monohydrat
0,4 g	Saccharose
20,0 g	Agar
ad 1000 mL	mit dest. Wasser

Das Medium wurde 20 min bei 121 °C autoklaviert. Petrischalen (ohne Nocken) wurden mit je ca. 25 mL Medium befüllt.

2.1.4.2 YCB-Flüssigmedium

Komponente I (pro Fernbachkolben)

550 mL	Leitungswasser
3,0 g	Ammoniumsulfat
5 Körner	gewaschenes Tongranulat (Plantania)

Die Bestandteile wurden in Fernbachkolben gegeben, mit Watte und Aluminiumfolie verschlossen und bei 121 °C für 20 Minuten autoklaviert.

Komponente II (pro Fernbachkolben)

7,72 g	Hefe-Kohlenstoffbasis (*yeast carbon base*, Difco)
3,63 g	Glukose-Monohydrat
pH 5,5	mit 2 N NaOH
ad 66 mL	mit vollentsalztem Wasser

Die Lösung wurde in 50 mL-Sarstedt-Röhrchen sterilfiltriert (Porenweite 0,2 µm). Bei der obenstehenden Rezeptur ist bereits ein Filtrierverlust von 10 % eingerechnet. Für das fertige Kulturmedium wurden zur Komponente I 60 mL der Komponente II zugegeben. Das Endvolumen im Fernbachkolben betrug damit 600 mL.

2.1.4.3 SC-DO-Medium für Hefen

SC-DO-Medium (*synthetic complete drop out*) ohne Leucin wurde als Selektivmedium eingesetzt für Transformanten von *S. cerevisiae* DSM3820 mit Vektoren basierend auf pYX242.

67 mg	Adenin-hemisulfat	400 mg	L-Phenylalanin
135 mg	L-Arginin	335 mg	L-Threonin
400 mg	L-Asparaginsäure	270 mg	L-Tryptophan
67 mg	L-Histidin	100 mg	L-Tyrosin
200 mg	Isoleucin	67 mg	Uracil
270 mg	L-Lysin	6,7 g	Yeast Nitrogen Base (Difco)
67 mg	L-Methionin	22 g	Glukose-Monohydrat

Aminosäuren in 800 mL VE-Wasser lösen und autoklavieren, Glukose in 100 mL VE-Wasser lösen und autoklavieren, YCB in 100 mL VE-Wasser lösen und sterilfiltrieren (0,2 µm). Lösungen nach dem Autoklavieren vereinigen. Verfestigung zum Gießen von Platten ggf. mit 15 g/L Agar.

2.1.4.4 Malzextraktmedium

30,0 g	Malzextrakt
2,0 g	Sojapepton
pH 6,5	mit 2 N NaOH
ad 1000 mL	mit vollentsalztem Wasser

Das Medium wurde für 15 min bei 115 °C autoklaviert. Verfestigung zum Gießen von Platten erfolgte ggf. mit 15 g/L Agar.

2.1.5 Verwendete Mikroorganismen

In dieser Arbeit wurden die folgenden, in der Stammsammlung des Lehrstuhls für Technische Mikrobiologie befindlichen Mikroorganismen eingesetzt:

Hefen:

S. cerevisiae DSM3820 [pYX242] #970
S. cerevisiae DSM3820 [pYX242-LTP1500] #961
S. cerevisiae DSM3820 [pYX242-FcHyd3] #1064
S. cerevisiae DSM3820 [pYX242-FcHyd5] #858
S. cerevisiae sp. *uvarum* var. *carlsbergensis* W66/70

S. cerevisiae DSM3820 [pYX242] #970 enthält das leere Plasmid pYX242. *S. cerevisiae* DSM3820 [pYX242-LTP1500] #961 enthält ein für LTP1500 aus Weizen kodierendes Plasmid basierend auf pYX242, *S. cerevisiae* DSM3820 [pYX242-FcHyd3] #1064 enthält ein für das Hydrophobin FcHyd3 aus *F. culmorum* TMW 4.0111 kodierendes Plasmid. *S. cerevisiae* DSM3820 [pYX242-FcHyd5] #858 enthält ein für das Hydrophobin FcHyd5 aus *F. culmorum* TMW 4.0111 kodierendes Plasmid. Zusätzlich wurde *S. cerevisiae* ssp. *uvarum* var. *carlsbergensis* W66/70 (Hefebank Weihenstephan, Freising, D) verwendet.

Filamentöse Pilze:

	TMW-Nummer	**Originalbezeichnung**
F. avenaceum	4.1962	
F. equiseti	4.1002	BBA 68556
F. poae	4.0788	IBT 1766
F. tricinctum	4.1405	

Die weiterhin verwendeten Isolate von *F. culmorum* und *F. graminearum* sind in Tabelle 12 bzw. 13 aufgelistet.

Die dort verwendeten Abkürzungen sind: BBA: Biologische Bundesanstalt; NRRL: Northern Regional Research Laboratories; CBS: Centraalbureau voor Schimmelcultures; DSM: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellmustern; E: Dr. Engelhard, Landesanstalt für Ernährung; IBT: IBT Culture Collection of Fungi, Bio-Centrum, Technical University of Denmark; INRA: Institut national de recherche agronomique; LWL: Bayerische Landesanstalt für

Landwirtschaft; NRRL: Northern Regional Research Labroatories; VLB: Versuchs- und Lehranstalt für Brauerei.

2.2 Methoden

2.2.1 Kulturbedingungen

2.2.1.1 Kultur auf SNA-Platten

SNA-Platten wurden zentral mit einem Steinchen aus Kryokonserven der jeweiligen Arten bzw. Stämme beimpft und bei Raumtemperatur kultiviert. Die inokulierten Platten wurden im Wechsel 12 h Dunkelheit und 12 h Belichtung in Form von Weißlicht (Osram L 18W/25 *universal white*, Abstand 45 cm) in Verbindung mit kurzwelligem Licht (Sylvania *Black Light* Blue, F 18W/25 BLB, Abstand 45 cm) ausgesetzt. Eine Kontrolle auf Sporulation erfolgte bei geöffneter Platte unter dem Mikroskop.

2.2.1.2 Flüssigkulturen in Petrischalen

Für das Screening auf die Bildung benetzender Substanzen durch unterschiedliche Stämme von *F. culmorum* bzw. *F. graminearum* wurden je Petrischale 22 mL Malzextraktmedium (flüssig) bzw. YCB-Medium vorgelegt. Jede Petrischale wurde mit einem Steinchen aus der Kryokonserve des jeweiligen Isolats inokuliert. Das Wachstum fand bei ca. 22 °C unter Tageslichteinfluß statt.

2.2.1.3 Schüttelkulturen in YCB-Flüssigmedium

Für die Gewinnung der von *F. culmorum* bzw. *F. graminearum* ausgeschiedenen Proteine wurden diese Pilze in proteinfreiem YCB-Medium basierend auf Hefe-Kohlenstoffbasis (YCB, *yeast carbon base*) herangezogen. Dazu wurden 0,60 L des Mediums in Fernbachkolben mit Sporensuspension (ca. 10^6 Makrokonidien) beimpft und bei 25 °C und 80 U/min in einem abgedunkelten Brutschrank (Certomat BS-1) inkubiert. Die Inkubationsdauer betrug 7 Tage.

2.2.2 Screening auf die Bildung benetzender Substanzen durch *Fusarium*-Arten

Flüssigmedium in Petrischalen wurde mit Stämmen von *F. culmorum* bzw. *F. graminearum*, wie oben beschrieben, inokuliert. Während der Dauer der Kultivierung wurde die Bildung von oberflächenaktiven, benetzend wirkenden Stoffen durch Auflegen von Streifen aus extrem hydrophobem Parafilm™ (Pechiney) überprüft. Die Streifenbreite betrug 15 mm, die Streifen wurden nicht auf das Myzel, sondern in das daneben befindlich Medium gelegt und nach ca. einer Minute wieder entnommen. Das Verhalten des am Streifen anhaftenden Flüssigkeitsfilms wurde visuell bewertet.

Verhalten des Medienfilms	Bewertung	
völliges Ablaufen in Sekunden	-	(negativ)
Anhaften einzelner Tropfen	0	(indifferent)
Anhaften auf der gesamten aufgelegten Fläche, aber langsames Ablaufen	+	(benetzend)
völlige Stabilität des Medienfilms über Minuten	++	(stark benetzend)

2.2.3 Mälzungs- und Darrbedingungen

Mälzung

Kleinmälzungen wurden in Mälzungskästen (Abmessungen (innen) H/B/T in [mm]: 160/130/196, Hordenblech-Schlitze 2 mm x 20 mm) mit 650 g Getreide je Kasten durchgeführt. Die Behälter wurden vor Versuchsbeginn tariert und das Gewicht vermerkt, so dass im folgenden alle Wassergehalte des Keimgutes durch Wiegen bestimmt werden konnten. Inokulation mit Konidien von *F. culmorum* bzw. *F. graminearum* fand im Weichwasser statt. Das Weichwasser wurde zur zweiten Naßweiche wiederverwendet, das Nachspritzen erfolgte mit Leitungswasser.

Zeit	Schritt	Wassergehalt
t=0 h	1. Naßweiche	30 %
nach 18 h	2. Naßweiche	38 %
bei gleichmäßigem Spitzen des Keimguts (t= ca. 42 h)	Aufspritzen	45 %
Dann Keimung bei 16 °C isotherm, 6 Keimtage mit täglichem Wenden und Ergänzen des fehlenden Wassers durch Aufspritzen. Ggf. Nachspritzen am 2. Keimtag auf 48 % Wassergehalt.		

Darrschema

Der Darrpozeß fand in einem Trockenschrank (Memmert) statt, wobei die Grünmalze in max. 3 cm hoher Schicht auf Kassetten aus Filterpapier ausgebreitet wurden. Die nötige Frischluftzufuhr wurde gesichert, indem die Türen des Schrankes ca. 1,5 cm geöffnet blieben.

Dauer [h]	Lufttemperatur [°C]	
1	45	mehrmals wenden
1	55	mehrmals wenden
17	65	
2	80	
2	85	1 x wenden
1	88	

2.2.4 Gelelektrophorese

2.2.4.1 Eindimensionale Gelelektrophorese nach Laemmli (1970)

Die Lösungen für Sammel- und Trenngel wurden in Bechergläsern angesetzt und vor der Zugabe von SDS, TEMED und APS im Vakuum entgast. Das Gießen und die Elektrophorese der Gele (Dicke 0,75 mm) wurden in einer MiniProtean III-Apparatur (Bio-Rad) durchgeführt. Für die Elektrophorese wurden die Proben im Verhältnis 4+1 mit 5x-Probenpuffer versetzt und für 5 min bei 80 °C behandelt. Der Probeneintritt ins Gel fand bei 90 V/30 mA statt, die eigentliche Elektrophorese bei 120 V/50 mA.

2.2.4.2 Eindimensionale Gelelektrophorese nach Schägger & v. Jagow (1987)

Die Bestimmung der Größe der Proteine und des Erfolges der Proteinreinigung, sowie in einigen Fällen die Bestimmung der Proteinkonzentration wurden mittels SDS-PAGE durchgeführt. Wegen der guten Trennleistung im niedermolekularen Bereich und der hohen Toleranz gegenüber Salzen in der Probe kamen Tris-Tricin-Gele nach Schägger & von Jagow zum Einsatz. Im Standardfall wurde die PAGE in einer MiniProtean III-Kammer (Bio-Rad) durchgeführt und die Gele nach dem folgenden Protokoll hergestellt. Die Geldicke betrug 0,75 mm.

Die Lösungen aus Acrylamid, Gelpuffer und Wasser wurden im Exsikkator mittels einer Wasserstrahlpumpe ca. 5 min lang entgast. Dann wurden vor dem Gießen der jeweiligen Gellage SDS-Lösung, TEMED und APS-Lösung zugesetzt. Zum Erzielen einer glatten Kante zwischen Trenn- und Sammelgel wurde das Trenngel mit absolutem Ethanol überschichtet. Nach ca. 20 min wurde der Alkohol entfernt das Sammelgel gegossen und der Kamm zum Formen der Taschen eingesetzt. Sofern die Gele für Trennungen vor einer Edman-Sequenzierung eingesetzt wurden, fand eine gezielte "Alterung" für mindestens 24 h bei Raumtemperatur statt, um nichtpolymerisiertes Acrylamid zu zerstören. Weiterhin wurde in diesem Fall dem Kathodenpuffer Thioglykolsäure (2 mM) als Scavenger gegen restliches Ammoniumpersulfat zugesetzt.

Die Proteinproben wurden im Verhältnis 1+1 mit reduzierendem Probenpuffer gemischt und für 10 min bei 70 °C inkubiert. Nach einer Zentrifugation für 3 min bei 13.000 x g wurden die Proben zusammen mit einem Molekulargewichtsmarker (Precision Plus unstained, Bio-Rad) aufgetragen. Das aufgetragene Volumen betrug in der Regel 10 µL. Der Probeneintritt und die Verdichtung im Sammelgel fanden bei 10 mA/Gel, die Trennung bei 15 mA/Gel statt, die eingestellte maximale Spannung betrug 70 V bzw. 110 V. Eine Konditionierung der Gele (10 mA/Gel, 90 V, 10 min) vor dem Auftragen der Proben verbesserte die Trennung der Proteine. Sofern die Gele für Blots zur N-terminalen Sequenzierung bestimmt waren, fand die Elektrophorese bei 4 °C in der Kühlkammer statt.

2.2.4.3 2-Dimensionale Gelelektrophorese

Die Ausführung der zweidimensionalen Gelelektrophorese orientierte sich an den Vorgaben von Görg *et al.* (2000) und Görg *et al.* (2002)

Gießen der Gele

In der zur Hoefer-DALT-Apparatur gehörenden Gießkammer wurden zwölf Gele gleichzeitig gegossen. Dazu wurden 900 mL der Gellösung in die Kammer gefüllt, das Restvolumen wurde als Polymerisationskontrolle belassen. Nach dem Einfüllen der Gellösung wurde die Höhe des Kopfraums durch Unterschichten mit 50 % Glyzerin eingestellt und zum Erzielen einer glatten Oberkante der Gele mit puffergesättigtem 2-butanol überschichtet. Die Polymerisation erfolgte über Nacht.

Rezeptur für Gele mit ca. 15 % Acrylamid-Gehalt:

487 mL	Acrylamid 29:1, 30 %
250 mL	Puffer D
198 mL	vollentsalztes Wasser
57,5 g	Glyzerin (87 %)
55 µL	TEMED
7,0 mL	frisch angesetzte APS-Lösung (10 %)

Isoelektrische Fokussierung (1. Dimension)
Rehydrieren und *Cup-Loading*

Die IPG-Streifen (pH 3-10, 18 cm, linear) wurden in 500 µL Quellpuffer über Nacht rehydriert und anschließend per *Cup-Loading* mit 50 µg Protein/Streifen, gelöst in 100 µL CAPS-Lsyepuffer, beladen. Die Fokussierung fand bei den unten für 10 IPG-Streifen angegebenen Parametern statt:

Thermostatisierung der Apparatur auf 20 °C			
Schritt 1	150 V	1 mA	150 Vh
Schritt 2	300 V	1 mA	900 Vh
Schritt 3	600 V	1 mA	600 Vh
Schritt 4	1000 V	1 mA	5,0 kVh
Schritt 5	3500 V	1 mA	31,5 kVh
Summe			ca. 38 kVh

Während der Fokussierung wurden mehrmals die Papier-Kontaktstreifen gewechselt.

Rehydrieren mit Einquellen der Probe

Die IPG-Streifen (pH 3-10, 18 cm, linear) wurden in 450 µL Quellpuffer über Nacht in Gegenwart von ca. 600 µg Protein/Streifen rehydriert. Das zu fokussierende Protein wurde in 50 µL CAPS-Lysepuffer gelöst und den Quellpuffer zugegeben. Die Fokussierung fand bei den unten für 10 IPG-Streifen angegebenen Parametern statt:

Thermostatisierung der Apparatur auf 20 °C			
Schritt 1	50 V	1 mA	800 Vh
Schritt 2	300 V	1 mA	600 Vh
Schritt 3	3500 V	1 mA	50 kVh
Schritt 4	1000 V	1 mA	10 kVh
Summe			ca. 60 kVh

Während der Fokussierung wurden mehrmals die Papier-Kontaktstreifen gewechselt.

Aufbewahrung fokussierter IPG-Streifen

Fokussierte IPG-Streifen wurden, sofern eine Lagerung nötig war, in Kunststoff-Folientaschen eingeschweißt, die Folientasche auf einem Karton befestigt, um ein Brechen der Streifen zu vermeiden und bei -75 °C bis zur Verwendung gelagert.

Reduktion und Alkylierung

Die auf den IPG-Streifen fokussierten Proteine wurden für 15 min in 100 mL Äquilibrierpuffer mit 2 g/100 mL DTT reduziert und anschließend für 15 min in 100 mL Äquilibrierpuffer mit 4 g/100 mL Iodacetamid alkyliert. Reduktion und Alkylierung fanden bei Raumtemperatur auf einem Orbitalschüttler (40 U/min) statt.

Vorbereitung der Gele zur Elektrophorese

Die IPG-Streifen wurden nach Reduktion und Alkylierung in den Kopfraum der Gele

eingelegt, am basischen Ende des IPG-Streifens wurde ein mit 10 µL Molekulargewichtsmarker (Precision Plus unstained, Bio-Rad) getränktes *sample application piece* eingesetzt und dann der Kopfraum mit heißer 0,6 % Agarose-Bromphenolblau-Lösung gefüllt.

Elektrophorese-Bedingungen der zweiten Dimension

Die Elektrophorese-Bedingungen für 10 Gele in der Elektrophorese-Kammer sind in folgender Tabelle aufgeführt:

Thermostatisierung auf 15 °C		
1 h	150 V	50 mA
1 h	150 V	80 mA
18-22 h	165 V	165 mA

2.2.5 Färbemethoden

2.2.5.1 Färbung von Tris-Tricin-Gelen mit RotiBlue

Nach Elektrophorese der Gele bis zum Austritt der Bromphenolblau-Front aus dem Gelkörper wurden die Gele für 1 h in 100 mL Fixierlösung auf einem Orbitalschüttler (Certomat R, Braun) bei 50 U/min fixiert. Dann wurde die Fixierlösung abgegossen und 100 mL Färbelösung zugegeben und wiederum bei 50 U/min geschüttelt. Die Färbung fand qualitativ über Nacht, quantitativ in 48 h statt. Waschen und Lagerung der Gele fand in 7,5 % (v:v) Essigsäure statt. Gewaschene Gele wurden vor der Trocknung eingescannt.

2.2.5.2 Silberfärbung nach Blum *et al.* (1987)

Die Silberfärbung von analytischen 1D- oder 2D-Gelen fand nach dem unten angegebenen Färbeprotokoll unter Verwendung der in 2.1.3.6 aufgeführten Lösungen statt. Benötigt werden je 2D-Gele 200 mL jeder Lösung oder 100 mL für ein 1D-Gele (MiniProtean III).

Färbeprotokoll

Schritt	Reagens	Dauer
Fixieren	Fixierlösung	>2 Stunden oder über Nacht
Waschen	Waschlösung	2 x 20 min
Waschen	vollentsalztes Wasser	20 min
Sensibilisierung	Thiosulfat–Reagens	3 min*
Waschen	vollentsalztes Wasser	3 x 20 s
Silberreaktion	Silbernitrat–Reagens	30 min*
Waschen	vollentsalztes Wasser	3 x 20 s
Entwickeln	Entwickler	3-5 min, nach Sicht
Waschen	vollentsalztes Wasser	1 x 20 s
Stoppen	Stopplösung	5 min
Waschen	vollentsalztes Wasser	3 x 10 min

*) Für die qualitative Färbung von 1-D-Gelen mit 6 x 8 cm (MiniProtean III) ist ein Verkürzen auf 1 min (Sensibilisierung) bzw. 20 min (Silberreaktion) möglich.

2.2.5.3 Färbung von Gelen mit Coomassie

Die Coomassie-Färbung von Gelen fand mit einer Lösung von 0,1 % CBB, 10 % Essigsäure, 40 % Methanol statt. Die Gele (MiniProtean III) wurden nach der Elektrophorese aus den Glaskassetten entnommen und jeweils in ca. 80 mL CBB-Lösung gelegt. Die CBB-Lösung mit dem Gel wurde dann für 30 s in einem Mikrowellenofen bei 300 W erhitzt und bis zum Auskühlen der Lösung auf einem Orbitalschüttler bei 50 U/min geschüttelt. Danach wurde mit 10 % Essigsäure, 40 % Methanol bis zum Erreichen eines hinreichend entfärbten Hintergrundes gewaschen. Die Gele wurden anschließend eingescannt und in 7,5 % Essigsäure aufbewahrt.

2.2.5.4 Färben von Blots

Nach dem Blottransfer durch *semi dry*-Blotting wurden die auf den PVDF-Membranen gebundenen Proteinbanden in 0,1 % CBB, 1 % Essigsäure, 50 % Methanol für 5 min gefärbt. Die Färbeschale wurde auf einen Orbitalschüttler bei 50 U/min bewegt. Danach wurde mit 50 % Methanol solange entfärbt, bis sich von der Membran keine Farbstoffschleier mehr lösen. Anschließend wurde die Membran auf Blotting-Papier über Nacht getrocknet. Alle Chemikalien, auch das für Puffer und Färbelösung benötigte Wasser, hatten HPLC-Qualität, sofern die Blots für Sequenzierungen bestimmt waren. Gegebenenfalls wurden die Gele mit CBB zur Kontrolle der Vollständigkeit des Transfers gegengefärbt.

2.2.5.5 Quantitative Färbung von Proteinen im Gel

Im Laufe der Untersuchungen wurde es nötig, die einzelnen Proteine auch in der Mischung des Gesamtproteins quantitativ erfassen zu können, wobei ein ELISA nicht zur Verfügung stand. Es wurden deshalb Protokolle entwickelt, mit eine Bewertung der Mengen durch Silberfärbung im Bereich von 2-200 ng/Bande und 50-10^4 ng/Bande durch Färbung mit Roti®Blue möglich ist (Mini Protean III, Kamm mit 10 Taschen). Als Referenzprotein wurde Trypsinogen (Sigma) eingesetzt, das es mit einer Masse von 24 kDa ähnlichen Diffusionseffekten ausgesetzt ist, wie die zu untersuchenden Proteine.

Quantitative Färbung mit Roti-Blue

Die quantitative Färbung der Gele mit Roti®Blue fand nach den oben beschriebenen Methoden zum Fixieren und Färben in 48 h statt. Danach wurden die Gele auf einem Durchlichtscanner (Epson) eingescannt (300 dpi, 8 bit-Graustufen) und als *.tif-Datei gespeichert. Die Grauwerte der Banden wurden mit BioNumerics-Software integriert und anhand von auf dem Gel vorhandenen Mengenstandards in Massenangaben umgesetzt.

Zur Kontrolle der Linearität des Färbe- und Auswertungsverfahrens wurde eine Reihe von unterschiedlich konzentrierten Trypsinogen-Proben auf ein Gel

aufgetragen, nach dem Lauf mit Roti®Blue gefärbt und densitometrisch ausgewertet. Die integrierten Grauwerte sind gegen die Masse an Trypsinogen der jeweiligen Bande aufgetragen. Lineare Regressionsrechnung ergab für die oben gezeigte Kalibration (50-10^4 ng/Bande) einen Korrelationskoeffizienten r=0,9965. Für die Quantifizierung auf Gelen wurden in der Folge zwei bis drei Mengenstandards eingesetzt.

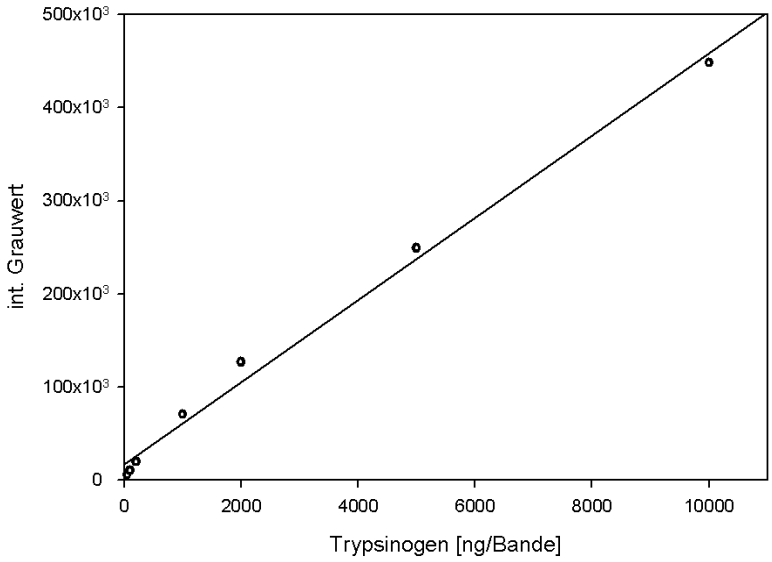

Abbildung 7: Kalibration für die quantitative Färbung von Banden mit 50-10^4 ng Protein in SDS-Gelen mit RotiBlue, integreirter Grauwert der Bande gegen jeweilige Proteinmenge, Regressionsgerade (r=0,9965)

Lineare Regressionsrechnung ergab für die in Abbildung 7 gezeigte Kalibration (50-10^4 ng/Bande) einen Korrelationskoeffizienten r=0,9965. Für die Quantifizierung auf Gelen wurden in der Folge zwei bis drei Mengenstandards eingesetzt.

Quantitative Silberfärbung

Für die quantitative Silberfärbung der Gele wurde eine Methode entwickelt, die sich an dem von Blum *et al.* (1987) publizierten Protokoll orientiert. Nach dem Färben wurden die Gele, wie oben bereits beschrieben, eingescannt und mittels BioNumerics-Software ausgewertet. Je Gel wurden 100 mL der unter Silberfärbung beschriebenen Lösungen verwendet. Zur quantitativen Färbung wurde die Entwicklerlösung wie folgt modifiziert:

Modifizierter Entwickler (0,14 M Na-Carbonat, 0,01 mM $Na_2S_2O_3$)

3,0 g	Natriumcarbonat
50 µL	Formaldehyd (37 %)
0,5 mg	Natriumthiosulfat
ad 200 mL	Voll entsalztes Wasser

Die Lösungen wurden vor Gebrauch frisch zubereitet und die Gele nach dem folgenden Protokoll gefärbt. Der Entwicklungsschritt wurde visuell kontrolliert, um eine Überentwicklung (Entwicklung rötlicher Banden mit Kernbereich) zu vermeiden. Auf jedem Gel wurden mehrere Mengenstandards von Trypsinogen eingesetzt. Zur Kontrolle der Linearität des Färbe- und Auswertungsverfahrens wurde eine Reihe von unterschiedlich konzentrierten Trypsinogen-Proben auf ein Gel aufgetragen, nach dem Lauf gefärbt, gescannt (300 dpi, 8 bit-Graustufen, *.tif-Datei) und ausgewertet. Die für die jeweiligen Banden integrierten Grauwerte sind gegen die Masse an Trypsinogen der jeweiligen Bande aufgetragen. Für die abgebildete Kalibration (2-200 ng/Bande) wurde ein Korrelationskoeffizient r=0,9961 berechnet (Abbildung 8).

Schritt	**Reagens**	**Dauer**
Fixieren	Fixierlösung	über Nacht
Waschen	Waschlösung	2 x 20 min
Waschen	vollentsalztes Wasser	20 min
Sensibilisierung	Thiosulfat–Reagens	3 min
Waschen	vollentsalztes Wasser	3 x 20 s
Silberreaktion	Silbernitrat–Reagens	30 min
Waschen	vollentsalztes Wasser	3 x 20 s
Entwickeln	Entwickler	ca. 5 min, nach Sicht
Waschen	vollentsalztes Wasser	1 x 20 s
Stoppen	Stopplösung	5 min
Waschen	vollentsalztes Wasser	3 x 10 min

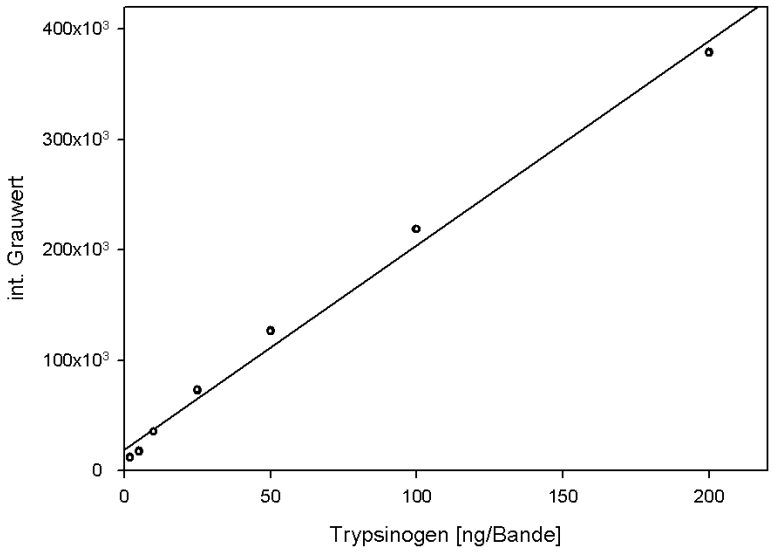

Abbildung 8: Kalibration für die quantitative Silberfärbung von Banden mit 2-200 ng Protein in SDS-Gelen, integreirter Grauwert der Bande gegen jeweilige Proteinmenge, Regressionsgerade (r=0,9961)

2.2.6 Archivierung der Gele

Trocknung

Zum Aufbewahren wurden Laemmli- und Tris-Tricin-Gele auf angefeuchtetes Blottingpapier (GB003, Schleicher & Schuell) aufgelegt und dann mit angefeuchtetem, handelsüblichem Cellophan abgedeckt. Diese Sandwiches wurden dann in einer auf 65 °C geheizten Vakuumtrockeneinheit (MaxiDry Plus, Heto-Holten) für 1,5 Stunden getrocknet.

Schrumpfen

Gele aus der 2D-Gelelektrophorese wurden nach dem Einscannen mit Schrumpflösung (30 % Ethanol, 12 % Glyzerin) über Nacht auf einem Orbitalschüttler bei 40 U/min behandelt und dann in Folientaschen aus Polyethylen eingeschweißt. Die Gele konnten dann über mehrere Monate hinweg bei 4 °C gelagert werden.

2.2.7 Dokumentation von Gelen und Blots

Gele und Blots wurden zur Dokumentation mit einem kombinierten Durchlicht- und Flachbettscanner Epson Expression 1600 eingescannt und ggf. Kontrast und Helligkeit für Druckzwecke optimiert. Gele für densitometrische Untersuchungen wurden nicht verändert ausgewertet.

2.2.8 Reduktion und Alkylierung von Proteinen für Edman-Sequenzierungen

Proteinproben die zur Edman-Sequenzierung eingereicht wurden, wurden mit Probenpuffer in Gegenwart von 10 mM DTT reduziert (10 min/70 °C, Kopfraum des Reaktionsgefäßes mit N_2 spülen). Nach der Reduktion wurde Iodacetamid bis zu einer Konzentration von 40 mM zugesetzt und 15 min bei Raumtemperatur im Dunkeln alkyliert. Anschließend wurde wiederum DTT als Scavenger bis zu einer Konzentration von 50 mM zugesetzt und nochmals für 10 min auf 70 °C erhitzt. Die Proben wurden auf Eis abgekühlt und für 2 min bei 18000 x g zentrifugiert (Verfahren nach persönlicher Mitteilung von Dr. H. Weber, Prosequenz Bioanalytik, Ludwigsburg).

2.2.9 Bedingungen für *semi-dry*-Elektroblotting (Matsudaira 1987)

Nach der Elektrophorese wurden die Gele für 20 min in eiskaltem Blotting-Puffer (10 mM CAPS, 10 % Methanol, pH 11,0) auf einem Orbitalschüttler bei 40 U/min umgepuffert. Während dieser Zeit wurden je Gel 4 Stücke Blotting-Papier GB003 (Schleicher & Schuell) passend zugeschnitten und ebenfalls mit Blotting-Puffer getränkt. Ein gleichgroßes Stück PVDF-Membran wurde durch zweiminütiges Eintauchen in Methanol (*p.a.*) benetzbar gemacht und 5 min in Blotting-Puffer gewaschen. Danach wurde in der Elektroblot-Apparatur (*semi-dry-blotter* HEP-1, peqlab) ein *Blotting-Sandwich* in der unten dargestellten Weise zusammengesetzt (Abbildung 9).

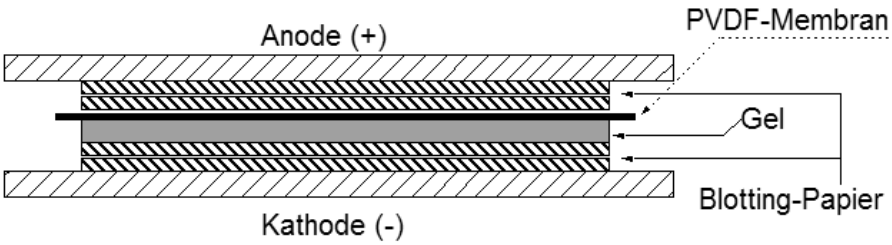

Abbildung 9: Aufbau eines Blotting-Sandwiches für semi-dry-Blotting von SDS-Gelen auf PVDF-Membran

Der Transfer der Proteine aus dem Gel auf die Membran erfolgte bei 0,8 mA/cm² in ca. 1,5 h.

2.2.10 Polymerase-Kettenreaktion und Klonierung der PCR-Produkte

Die Fragmente mit dem vollständigen Gen wurden ausgehend von genomischer DNA mit Arrow Taq DNA Polymerase (MP Biomedicals, Eschwege, D) und den Primern Fc 20 kDa-r/f bzw. Fc 17 kDa-r/f amplifiziert (Tabelle 1). Die Bedingungen der Polymerase-Kettenreaktion waren in beiden Fällen:
Initiale Denaturierung bei 94 °C/4 min, anschließend 35 Zyklen, jeweils aus Denaturierung 45 s/94 °C, Annealing 45 s/58 °C und Elongation 60 s/72 °C. Die abschließende Kettenverlängerung wurde mit 5 min/72 °C durchgeführt. Die Kontrollelektrophorese fand auf einem TBE-Gel mit 1,5 % (w:v) Agarose statt. Sieben PCR-Reaktion von 25 µL wurden zusammengefasst und das enthaltene PCR-Produkt mittels des QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen GmbH, Hilden, D) nach Maßgaben des Herstellers gereinigt. Das gereinigte PCR-Produkt wurde mittels des QuickClone Kit (Genaxxon BioScience GmbH, Biberach, D) in den Vektor pAlli10 ligiert, mit dem *E. coli* TZ101α transformiert wurde. Ligation und Klonierung wurden nach Maßgaben des Herstellers durchgeführt. Das Plasmid wurde aus positiven Transformanten mit dem E.Z.N.A. Plasmid Miniprep Kit I (S-Line) (PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, D) isoliert und mit den Primern M13 uni (-21) und M13 rev (-29) durch MWG Biotech AG, Ebersberg, D sequenziert. Die Sequenzierprimer wurden von MWG Biotech AG zur Verfügung gestellt.

Tabelle 1: Sequenzen verwendeter Oligonukleotid-Primer

Primer	Sequenz
Fc 17 kDa-f	5'-TCA AAC TCA ACA CCA AAA CCA-3'
Fc 17 kDa-r	5'-AAA GAG CAT CGA CTT TTG TTG-3'
Fc 20 kDa-f	5'-AAC CAC TTA ATC TCT TCA CCA-3'
Fc 20 kDa-r	5'-AAG TCT TAT GTA CAG TGC AAA-3'
M13 uni (-21)	5'-TGTAAAACGACGGCCAGT-3'
M13 rev (-29)	5'-CAGGAAACAGCTATGACC-3'

2.2.11 Proteinpräparation

2.2.11.1 Ammoniumsulfatfällung aus dem Kulturüberstand

Das in den Schüttelkulturen enthaltene Myzel wurde durch Filtration in mehreren Stufen entfernt: zunächst über Zellstofflagen, dann über Faltenfilter (385 mm, Typ 595½, Schleicher & Schuell), schließlich mittels Rundfiltern (Durchmesser 150 mm, Schleicher & Schuell, Typ 589^3 Blauband) und Büchnertrichter/Vakuumsaugflasche. Im Anschluss daran wurde das Volumen des Filtrats bestimmt, um die erforderliche Menge Ammoniumsulfat zu ermitteln. Die Fällung fand bis zu einer Sättigung von 90 % (Zusatz von 657 g je Liter) statt, um sicher zu stellen, dass das gesamte gelöste Protein ausgefällt wird. Die Zugabe des Ammoniumsulfats erfolgte in mehreren Gaben unter ständigem Rühren. Ggf. wurde der pH-Wert eingestellt. Die Fällung fand über Nacht bei 4 °C statt. Im Anschluss an die Fällung wurde das Präzipitat durch Zentrifugation bei 17000 x g für 40 Minuten sedimentiert und in 50 mL-Zentrifugenröhrchen überführt. Danach wurde das Präzipitat nochmals mit 90 %iger Ammoniumsulfatlösung gewaschen und erneut zentrifugiert.

2.2.11.2 Lösen des Präzipitats

Das proteinhaltige Präzipitat der Ammoniumsulfatfällung wurde im jeweils zur weiteren Verarbeitung nötigen Puffer über Nacht gelöst und dann bei 25.000 x g für 15 min zentrifugiert, um unlösliche Bestandteile abzuscheiden. Der Überstand

wurde vom Sediment durch Dekantieren getrennt. Zur Sicherheit wurde ggf. eine zusätzliche Filtration über 0,45 µm-Membranfilter durchgeführt.

2.2.11.3 Proteinextraktion aus Getreiden und Malzen für die Messung der Oberflächenhydrophobizität

Die löslichen Proteine von unterschiedlichen Getreide- bzw. Malzproben wurden mit wässriger NaCl-Lösung (0,5 % w:v) extrahiert, um die Oberflächenhydrophobizität vergleichen zu können. Dazu wurden die Proben mittels einer Bühler-Scheibenmühle (Einstellung 2 Skalenteile = 0,2 mm Mahlspalt) vermahlen. In ein 50 mL-Zentrifugenröhrchen wurden 5,0 g der Probe eingewogen, 15 mL Kochsalzlösung zugegeben und für 1,0 h auf dem Überkopfschüttler Heidolph Reax-2, Stufe 4) bei ca. 22 °C extrahiert. Nachfolgend wurden die Proben für 15 min bei 25.000 x g zentrifugiert und der Überstand vom Sediment dekantiert. Der Proteingehalt des Überstandes wurde photometrisch mittels des Bio-Rad Protein Quantitation Assay nach den Maßgaben des Herstellers bestimmt. Proben unterschiedlichen Proteingehaltes wurden durch Verdünnen normalisiert. Im Labor wurden die Proben auf Eis gelagert, längerfrisitge Verwahrung fand bei -20 °C statt.

2.2.12 Chromatographische Methoden

2.2.12.1 Entsalzen von Proteinproben

Vor Ionenaustauschchromatographie bzw. präparativer isoelektrischer Fokussierung wurden die wiederaufgelösten Proteinproben mittels einer Entsalzungssäule (HiPrep 26/10 Desalt, Amersham) entsalzt bzw. umgepuffert. Die Entsalzungssäule wurde nach Herstellervorschriften an einer FPLC-Anlage (Bio-Rad) betrieben. In der hier verwendeten Kombination von Säule und Anlage konnte ein maximales zu entsalzendes Probenvolumen von 5 mL aufgegeben werden, wobei zum Transfer viskoser Proben aus der Probenschleife (5 mL) ggf. mit einem Injektionsvolumen von 7 mL gearbeitet wurde. UV-Absorption (280 nm) und Leitfähigkeit wurden mit einem gekoppelten Detektorsystem bestimmt.

Anhand der UV–Absorption konnte die Elution des Proteins verfolgt werden und dementsprechend das Eluat aufgefangen werden. Mit beginnendem Ausschlag des Leitfähigkeitsdetektors wurde das Auffangen abgebrochen und das weitere Eluat verworfen. Das zugehörige Protokoll ist in Tabelle 2 angegeben, "Puffer A" bezeichnet den Puffer, in den das Protein überführt werden soll. Bei der Überführung in 4 M Harnstoff wurde mit einer Flußrate von 5 mL/min gearbeitet.

Tabelle 2: Protokoll zur Entsalzung mittels HiPrep Desalt 26/10

Schritt-nummer	**Volumen [mL]**	**Schritt**
1	0,0	Turn UV lamp ON
2	0,0	Set UV baseline to 0,0
3	0,0	Isocratic Flow with 100 % Puffer A for 14 mL
4	14,0	Static Loop: Inject 5,0 (7,0) ml sample at 7,00 mL/min
5	19 (21)	Isocratic Flow with 100 % Puffer A for 150 mL at 7,00 mL/min
6	169 (171)	End of Protocol

2.2.12.2 Anionenaustausch-Chromatographie zur Trennung von Proteinen aus *Fusarium spp*.

Die Proben wurden durch Entsalzung in den Startpuffer (20 mM Triethylamin/CO_2, pH 10,0) überführt und auf die Säule (HiLoad 16/10 Q-Sepharose HP, Amersham) aufgebracht. Danach wurden die enthaltenen Proteine nach folgendem Protokoll (Tabelle 3) in Gradientenelution (gegen den Elutionspuffer 20 mM Triethylamin-CO_2, pH 10,0, 1,0 M NaCl) getrennt.

Tabelle 3: Protokoll zur Ionenaustausch-Chromatographie mit HiLoad 16/10 Q-Sepharose HP

Schritt-nummer	Volumen [mL]	Schritt
1	40,0	Collect fractions within 1 time window(s) ending at 220,0 mL
2	0,0	Turn UV lamp ON
3	0,0	Set UV baseline to 0,0
4	0,0	Isocratic flow with 100 % Startpuffer, 0 % Elutionspuffer at 1,60 mL/min for 40 mL
5	40,0	Linear Gradient with 0 % to 25 % Elutionspuffer at 1,60 mL/min for 100 mL
6	140,0	Linear Gradient with 25 % to 60 % Elutionspuffer at 1,60 mL/min for 60 mL
7	200,0	Isocratic flow with 100 % Elutionspuffer, 0 % Startpuffer at 3,20 mL/min for 40 mL
8	240,0	Isocratic flow with 100 % Startpuffer, 0 % Elutionspuffer at 3,20 mL/min for 40 mL
9	280,0	End of Protocol

Die Fraktionensammlung fand in Reagenzgläsern 75 x 11 mm statt. Die Puffer wurden mit 0,02 % Natriumazid konserviert.

2.2.12.3 Anionenaustausch-Chromatographie zur Reinigung von LTP 1500

Getreide-Rohproteinisolat aus Weizen, das u.a. LTP 1500 enthielt, wurde nach Entsalzung mit 20 mM Triethylamin pH 11,1 auf eine Säule vom Typ HiLoad 16/10 Q-Sepharose HP aufgebracht. Ein Einstellen des pH-Wertes war bei diesem Puffer nicht nötig, da der pH durch die Zugabe von Triethylamin alleine erreicht wurde. Elutionspuffer war der Startpuffer mit 1 M NaCl. Die Chromatographie wurde nach dem angegebenen Protokoll (Tabelle 4) ausgeführt. Der Nachweis auf LTP 1500 wurde von Dr. Dieter Hecht, Lehrstuhl für Phytopathologie, Weihenstephan, mittels polyklonaler Antikörper nach dem für *Western blots* angegebenen Protokoll gegen LTP 1500 durchgeführt.

Tabelle 4: Protokoll zur Ionenaustausch-Chromatographie zur Gewinnung von LTP 1500

Schritt-nummer	Volumen [mL]	Schritt
1	40,0	Collect fractions within 1 time window(s) ending at 240,0 mL
2	0,0	Turn UV lamp ON
3	0,0	Set UV baseline to 0,0
4	0,0	Isocratic flow with 100 % Startpuffer, 0 % Elutionspuffer at 1,60 mL/min for 40 mL
5	40,0	Linear Gradient with 10 % to 40 % Elutionspuffer at 1,60 mL/min for 200 mL
6	240,0	Linear Gradient with 40 % to 80 % Elutionspuffer at 1,60 mL/min for 30 mL
7	270,0	Isocratic flow with 100 % Elutionspuffer, 0 % Startpuffer at 3,00 mL/min for 40 mL
8	310,0	Isocratic flow with 100 % Startpuffer, 0 % Elutionspuffer at 3,00 mL/min for 40 mL
9	350,0	End of Protocol

2.2.13 Präparative isoelektrische Fokussierung

Präparative (trägerfreie) isoelektrische Fokussierung von Proteinen aus *F. culmorum* bzw. *F. graminearum* wurde mit dem Rotofor®-Gerät (Bio-Rad) durchgeführt. Die Proben wurden in 4 M Harnstoff über Nacht bei 4 °C gelöst (0,5 g Präzipitat in 20 mL), dann bei 7000 x g zentrifugiert und der durch Dekantieren vom Sediment getrennte Überstand nach der beschriebenen Methode über eine Entsalzungssäule in 4 M Harnstoff entsalzt. Die entsalzte Probe wurde durch Zugabe von 4 M Harnstoff auf 50 mL ergänzt und mit 2,5 mL Ampholyt (BioLyte 3-10, Bio-Rad) versetzt. Die Vorbereitung des Gerätes und die Fokussierung fanden nach den Maßgaben des Herstellers statt. Der *steady state* (konstante Spannungsanzeige) wurde nach ca. 4,5 h erreicht, die Fokussierung wurde bis 6,0 h fortgesetzt.

Die Fraktionen haben ein Volumen von ca. 2,5 mL. Konzentration mehrerer Fraktionen, die das gleiche Protein enthalten, konnte mittels Zentrifugenröhrchen für die Ultrafiltration (Amicon Ultra 15, MWCO 5000) erreicht werden.

2.2.14 Proteingehaltsbestimmungen

2.2.14.1 Proteingehaltsbestimmung nach präparativer isoelektrischer Fokussierung

Proteingehaltsbestimmungen nach dem Konzentrieren der Fraktionen der präparativen isoelektrischen Fokussierung wurden photometrisch bei 210 nm durchgeführt (Spektrophotometer LKB Biochrom 4060, Pharmacia). Zur Kalibration dienten unterschiedlich konzentrierte Lösungen von Rinderserumalbumin in 4 M Harnstoff (10-80 mg/mL mit konzentrationsgleichem Zusatz von Ampholyt wie in der Fokussierung). Die Proben wurden in normierten Quarzglas-Küvetten gegen eine Nullprobe von 4 M Harnstoff mit Ampholytanteil gemessen. Aufpunkt und Steigung der Kalibrationsgeraden wurden mittels linearer Regressionsrechnung bestimmt und damit auf die zu bestimmenden Konzentrationen zurückgerechnet.

2.2.14.2 Photometrische Bestimmung des Proteingehalts

Die Bestimmung des Proteingehaltes in wässrigen Auszügen aus Getreiden und Malzen bzw. in Kongreßwürzen wurde photometrisch mittels des *Bio-Rad Protein Assay Kit* (Bio-Rad) nach den Vorgaben des Herstellers durchgeführt. Die Bestimmung des Proteingehaltes fand dabei gegen eine Verdünnungsreihe von Rinderserum-Albumin statt. Es wurde bei einer Wellenlänge von 595 nm gemessen.

2.2.15 Bedingungen und Verfahren für *Western blots*

Per Immunoblot zu untersuchende Proben wurden mittels Elektrophorese in Tris-Tricin-Gelen aufgetrennt und dann per *semi dry*-Blotting auf PVDF-Membran (Immun-Blot PVDF, Bio-Rad bzw. Immobilon P^{SQ}, Millipore) transferiert. Als Transferpuffer für *Western Blots* wurde CAPS-Methanol-Blotpuffer pH 11 eingesetzt, da Towbin-Puffer für stark alkalische Proteine nicht tauglich ist. Der Transfer erfolgte bei 20 V, 0,8-1 mA/cm², Transferzeit 1,5 h. Das Blotting-Sandwich wurde aufgebaut, wie in den Bedingungen für *semi dry*-Blotting

beschrieben.

Die Detektion geblotteter Proteine mittels primärem und sekundärem Antikörper erfolgte nach der in Tabelle 5 angegebenen Vorschrift (persönliche Mitteilung von Dr. Dieter Hecht, Lehrstuhl für Phytopathologie, Weihenstephan). Als sekundärer Antikörper wurde Anti-Kaninchen-IgG-Antikörper aus Ziege konjugiert mit alkalischer Phosphatase verwendet (DakoCytomation).

Tabelle 5: Bedingungen der Immundetektion für Western blots

Schritt	Behandlung
1	Membran nach Blottransfer 1 min in TBS-Puffer spülen
2	Membran 1 h in Blocking-Puffer (mit 1 % BSA) inkubieren
3	Membran mit primärem Antiserum (1:2000 verdünnt mit TBS-Puffer, 25 mL) für 1,5 h inkubieren
4	Membran 3 x 5 min mit TBS-T-Puffer waschen
5	Membran mit sekundärem Antikörper (1:2000 verdünnt mit TBS-Puffer, 25 mL) für 1,5 h inkubieren
6	Membran 3 x 5 min mit TBS-T-Puffer und 1 x 5 min mit TBS-Puffer waschen
7	Membran in Färbelösung inkubieren bis Banden zu sehen sind (ca. 30 s bis 120 s)
8	Enzymreaktion in EDTA-Lösung stoppen (2 min) und Membran in H_2O_{dest} kurz waschen. Bei Raumtemperatur trocknen.

Zur Steigerung der Empfindlichkeit wurde die Immunfärbung ggf. mit einem biotinylierten Brückenantikörper zur Vervielfachung der Bindestellen (Anti-Kaninchen-IgG-Antikörper aus Schwein konjugiert mit Biotin, DakoCytomation) und Strepavidin-APase (DakoCytomation) nach dem in Tabelle 6 angegebenen Protokoll durchgeführt.

Tabelle 6: Bedingungen der Immundetektion für Western blots mit Brückenantikörper

Schritt	Behandlung
1	Membran nach Blottransfer 1 min in TBS-Puffer spülen
2	Membran 1 h in Blocking-Puffer (mit 1 % BSA) inkubieren
3	Membran mit primärem Antikörper aus Schlachtblut (1:200 verdünnt mit TBS-Puffer mit 0,5 % BSA, 25 mL) für 40 min inkubieren
4	Membran 3 x 5 min mit TBS-T-Puffer und 1 x 5 min mit TBS-Puffer waschen
5	Membran mit Brückenantikörper (1:1500 verdünnt mit TBS-Puffer, 25 mL) für 1,5 h inkubieren
6	Membran 3 x 5 min mit TBS-T-Puffer und 1 x 5 min mit TBS-Puffer waschen
7	Membran mit Streptavidin-APase-Lösung (1:1500 verdünnt mit TBS-Puffer) für 1 h inkubieren
8	Membran 3 x 5 min mit TBS-T-Puffer und 1 x 5 min mit TBS-Puffer waschen
9	Membran in Färbelösung inkubieren bis die Banden zu sehen sind (ca. 60 s)
10	Enzymreaktion in EDTA-Lösung stoppen (2 min) und Membran in H_2O_{dest} kurz waschen. Bei Raumtemperatur trocknen.

2.2.16 Zerschäumungsanalyse

2.2.16.1 Abschäumen des Kulturüberstandes

Das in den Schüttelkulturen enthaltene Myzel wurde durch Filtration in mehreren Stufen entfernt: zunächst über Zellstofflagen (Lohmann & Rauscher), dann über Faltenfilter (385 mm, Typ 595½), schließlich über Rundfilter (Durchmesser 150 mm, Schleicher & Schuell, Typ 589^3 Blauband) und Büchnertrichter abgenutscht. Zur Anreicherung oberflächenaktiver Proteine durch Aggregation an Phasengrenzflächen wurde die Abschäumapparatur (siehe Abbildung 10) mit 0,5 L Kulturüberstand (ggf. mit eingestelltem pH-Wert) befüllt. Durch die Fritte (Porositätsklasse 3, 16-40 µm) wurde Stickstoff geleitet, der Vordruck wurde auf 1,0 bar eingestellt, der Stickstoffdurchfluss mit dem am Volumenstrommesser befindlichen Nadelventil auf 10 L/h herabgeregelt. Der entstehende Schaum wurde in einem Becherglas aufgefangen. Die Drainage aus dem aufgefangenen Schaum wurde dekantiert und in die Apparatur zurückgeführt. Das Abschäumen wurde als beendet betrachtet, wenn kein Schaum mehr durch den Schlauch in das Becherglas gelangte. Der entstandene stabile Schaum wurde in 1 L-

Zentrifugenflaschen überführt und bei 3000 x g 15 min zentrifugiert um den Schaum niederzuschlagen. Das Zentrifugat (Niederschlag und Überstand) wurde in Zentrifugenröhrchen überführt und bei 23000 x g für 15 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen und der Niederschlag ggf. mit entsalztem Wasser gewaschen und erneut zentrifugiert. Der Niederschlag wurde im Vakuum getrocknet.

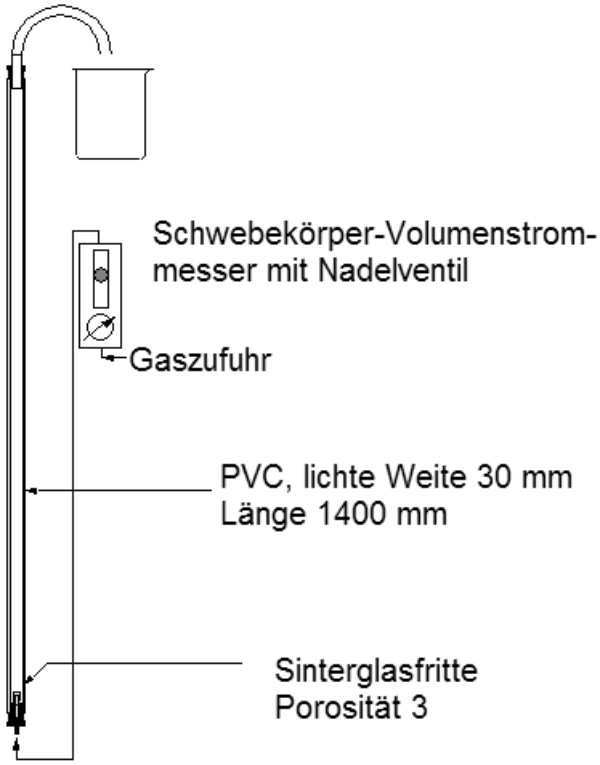

Abbildung 10: Aufbau der Apparatur, die zur präparativen Zerschäumung von Überständen von Kulturen von Fusarium spp. verwendet wurde

2.2.16.2 Behandlung des bei der Zerschäumung aggregierten Proteins mit Trifluoressigsäure

Der getrocknete Niederschlag wurde in ca. 5 mL Trifluoressigsäure gelöst und in einen Rundkolben mit Schliff überführt. Diese Lösung wurde im Rotationsverdampfer zur Trockenheit eingeengt, letzte Trifluoressigsäurereste durch vorsichtiges Einblasen von N_2 in den Rundkolben ausgetrieben. Zur Untersuchung der Probe mittels SDS-PAGE wurde der an der Glaswand anhaftende, proteinhaltige Film mit 100 µL 15 mM Tris-HCl pH 8,8 gelöst. Ein Aliquot davon wurde im Verhältnis 1+1 mit Probenpuffer gemischt und für 10 min

bei 70 °C inkubiert. Nach der thermischen Behandlung wurden die Proben bei 10000 x g für 3 min zentrifugiert und dann mittels Gelelektrophorese untersucht.

2.2.17 Edman-Sequenzierung von Proteinen

Die Edman-Sequenzierungen zur partiellen Bestimmung der Aminosäuresequenzen von untersuchten Proteinen wurden durch Prosequenz Bioanalytik, Reichertshalde 10, Ludwigsburg, D, durchgeführt. Es kam ein Proteinsequenator Modell 476, Applied Biosystems, zum Einsatz. Das Gerät wurde für die N-terminale Sequenzierung geblotteter Proteine mit sog. "*fast cycles*" nach Vorschriften und mit Verbrauchsmaterialien und Chemikalien des Herstellers betrieben.

Die in eingesandten, ausgeschnittenen Gelbanden enthaltenen Proteine wurden nach Entfärbung und Reduktion mittels DTT mit Trypsin (modifiziert, Roche) gespalten. Die ausgewählten Peptide wurden mittels narrow-bore-RP-HPLC unter folgenden Bedingungen getrennt (Auskunft Dr. Weber, Prosequenz Bioanalytik):

Säule:	TOSOH 2µ ODS, 100 x 2 mm
Laufmittel A:	0,1 % TFA in Wasser
Laufmittel B:	0,1 % TFA in Acetonitril

2.2.18 Messung von Oberflächenspannungen

2.2.18.1 Messung von Oberflächenspannungen mittels Tropfenmethode

Die Messung der dynamischen Oberflächenspannung wurde mittels einer eingespannten Eppendorf-Pipette (10-100 µL) durchgeführt, indem solange der Einstellknopf herabgeschraubt wurde, bis der Tropfen an der Pipettenspitze abriß. Am gerade noch nicht abreißenden Tropfen stehen Gewichtskraft des Tropfens und Oberflächenspannung (als Linienkraft entlang des Umfangs der Pipettenspitze) im Gleichgewicht. Je Probe wurden mehrere Wiederholungen durchgeführt. Aus der Gewichtskraft des abreißenden Tropfens und dem Durchmesser D der Pipettenspitze (hier: D=1,20 mm) kann direkt auf die Oberflächenspannung σ

zurückgerechnet werden:

$$\sigma = \frac{V \cdot \rho \cdot g}{D \cdot \pi}$$

2.2.18.2 Messung von Oberflächenspannungen in Mikrotiter-Platten

Die Messung von Oberflächenspannungen im Gleichgewichtszustand erfolgte nach einer vergleichende Meßmethode nach Cottingham *et al.* (2004). Dabei wurde die Veränderung der Krümmung der Flüssigkeits-Oberfläche in Kavitäten einer Mikrotiterplatte in Abhängigkeit von der Oberflächenspannung ausgenutzt: Lösungen hoher Oberflächenspannung ergeben eine nahezu ungekrümmte Oberfläche (Abbildung 11, Fall A), mit sinkender Oberflächenspannung verstärkt sich die Krümmung der Oberflächen (Meniskus). Durch die konkav gekrümmte Oberfläche entsteht eine streuende optische Wirkung, d.h. ein auftreffender Lichtstrahl wird gestreut und die apparente optische Dichte der Lösung steigt an (Fall B), wenn mit einer Faseroptik mit kleinem Durchmesser (z.B. 0,25 mm) gemessen wird. Eine weitere Erhöhung der Dynamik der Antwort kann durch exzentrisches Messen erreicht werden, da dann zusätzlich zur Streuung in der konkaven Fläche auch noch die Brechung des Lichtstrahls durch schräges Auftreffen wirkt (Fall C).

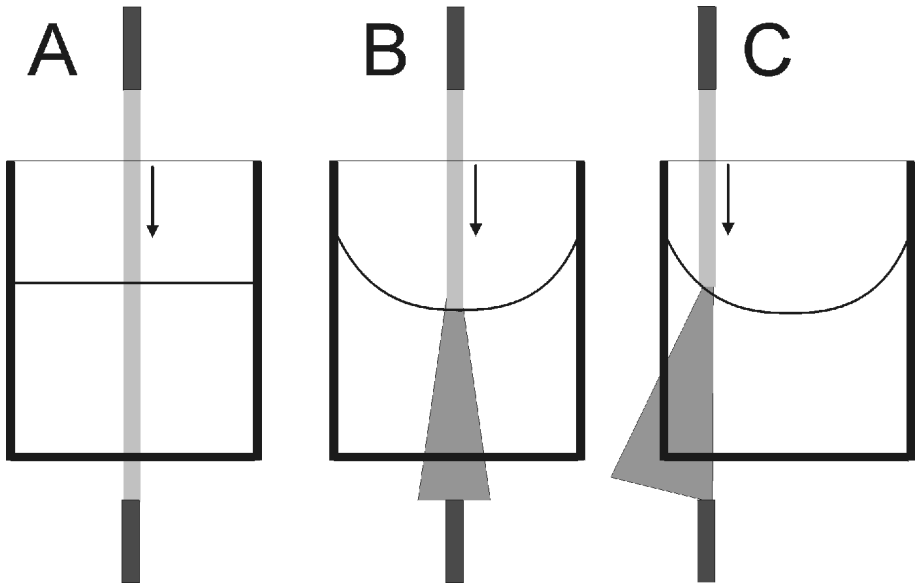

Abbildung 11: Streuende Wirkung der Krümmung der Oberfläche von Flüssigkeiten in Kavitäten auf zentrisch und exzentrisch eintreffende Lichtstrahlen bei der Bestimmung der Oberflächenspannung. Die Faseroptik sendet Licht von oben her aus, die Faseroptik zum Detektor ist unten. A: Hohe Oberflächenspannung, B: niedrige Oberflächenspannung, C: niedrige Oberflächenspannung mit exzentrischer Messung zur Erhöhung der Dynamik.

Für die Oberflächenspannungsmessungen wurden klare Mikrotiterplatten mit 96 Kavitäten und flachem Boden eingesetzt (Typ 82.1581, Polystyrol, Sarstedt). Das Probenvolumen betrug je Kavität 200 µL. Die Messungen wurden mit einem SPECTRAFluor (TECAN) mit einem Filter für Absorptionsmessungen (340 nm) durchgeführt. Die geometrische Plattendefinition wurde gegenüber der Originaldefinition um 2,00 mm verschoben. Dies ergab bei einem Innendurchmesser der Kavitäten von 6,35 mm eine Messung, die 1,18 mm vom Rand entfernt, also sicher im Bereich der Flanke des Meniskus vorgenommen wurde. Die Messungen wurden nach frühestens 15 h Ruhephase bei abgedeckter Mikrotiterplatte vorgenommen. Die Meßwerte der scheinbaren optischen Dichte als Vergleichsmaß für die Oberflächenspannung wurden teilweise in der Form $y = y_0 + a \cdot (1 - e^{-b \cdot x})^c$ als sigmoidale Kurven approximiert (Chapman-Approximation mit vier Parametern in SigmaPlot 8.0). Dieser Kurvenverlauf bedingt einen lokalen Darstellungsfehler insofern, als es mit dieser Kurve nicht möglich ist, einen unstetigen Umbruch der Oberflächenspannung bei der kritischen Mizellkonzentration darzustellen.

2.2.19 Messung der Oberflächenhydrophobizität mit ANS

2.2.19.1 Oberflächenhydrophobizität von pilzlichen Proteinen

Die Messungen zur Oberflächenhydrophobizität orientierten sich an Li-Chan & Nakai (1988), sowie Kato & Nakai (1980) und Uruakpa & Arntfield (2006). Die Proteinproben wurden auf 10 mg/mL in wässriger NaCl-Lösung (0,5 % w:v) eingestellt. Ggf. wurden die Proben bei dieser Konzentration einer Hitzebehandlung unterzogen. Nachfolgend wurden unterschiedliche Volumen dieser Proben zu dem in den Küvetten (Sarstedt, Nr. 67.755) vorgelegten Probenpuffer (0,01 M Kaliumphosphat-Puffer pH 7,4 oder 50 mM Na-Citrat-Puffer pH 3,4 oder pH 4,5) zugegeben, um die in Tabelle 7 aufgeführte Konzentrationsreihe zu erhalten.

Tabelle 7: Pipettierschema für die Messung der Oberflächenhydrophobizität

Proteinkonzentration [%]	**0,0025**	**0,005**	**0,0075**	**0,01**	**0,025**	**0,05**	**0,075**	**0,1**
Volumen Probe [µL]	5	10	15	20	50	100	150	200
Volumen Probenpuffer [µL]	1995	1990	1985	1980	1950	1900	1850	1800

Nach dem Herstellen dieser Verdünnungen wurden die Blindwerte gemessen. Danach wurden je Küvette 10 µL 8 mM ANS-Lösung zugegeben, gemischt und nach 20 min die Fluoreszenz gemessen. Die Messung der Fluoreszenz von ANS (1-anilino-8-naphtalen-sulfonsäure) fand bei λ_{ex} = 390 nm, λ_{em} = 470 nm, Schlitzweite 2,5 nm auf einem Spektralphotometer (LS50, Perkin-Elmer) statt. Die Auftragung der Meßwerte erfolgte als Fluoreszenz über Proteinkonzentration. Die Oberflächenhydrophobizität entspricht der Steigung der Kurve im linearen Anfangsbereich und wurde durch lineare Regressionsrechnung bestimmt. Die Dimension der Oberflächenhydrophobizität S_0 ist 1/%.

2.2.19.2 Oberflächenhydrophobizität von Getreide- und Malzproteinen

Die Oberflächenhydrophobizität der nach dem oben beschriebenen Verfahren (2.2.11.3) gewonnenen Gesamtproteinproben wurden mittels ANS und Fluoreszenzspektroskopie bestimmt. Da die Proben meist Proteingehalte um

3 mg/mL aufwiesen, wurde die Verdünnungsreihe durch Veränderung der Proben- und Puffervolumina an den jeweils eingestellten Proteingehalt angepaßt. Die Messungen wurden in 50 mM Citratpuffer pH 4,5 wie unter _2.2.19.1 beschrieben durchgeführt.

2.2.20 Zusatz von Proben zu Bier und Mineralwasser

Einem gushing-stabilen hellen Lagerbier (P11-Bier, Weihenstephaner Original, Brauerei Weihenstephan, Freising, D) bzw. Mineralwasser (Siegsdorfer Petrusquelle 'spritzig', Siegsdorf, D) wurden Detergentien in unterschiedlicher Menge zugesetzt. Die Flaschen (0,50 L) wurden vor dem Öffnen zum Zusetzen der Detergens-Lösungen nach oben beschriebener Methode im Eisbad auf unter 2 °C gekühlt, um eine unerwünschte CO_2-Entbindung zu verhindern. SDS (Natriumdodecylsulfat) wurde ausgehend von einer Stammlösung mit 25 % w:v, Tween 20 ausgehend von einer Stammlösung mit 10 % w:v, CTAB aus einer Stammlösung mit 0,2 % (w:v) bei 10^{-3}-facher kritischer Mizellkonzentration (KMK) und 10^{-2}-facher KMK zugesetzt. Größere CTAB-Mengen wurden direkt als Pulver eingesetzt. Wurden Volumen über 1,5 mL zugesetzt, wurde vorher ein entsprechendes Teilvolumen entfernt, um die Flaschen nicht zu überfüllen. Je Konzentration wurden drei Wiederholungen angesetzt. Nach dem Zusetzen der Detergens-Lösungen wurden die Flaschen wieder mit neuen Kronkorken verschlossen und für 24 h im Überkopfschüttler bei 28 U/min rotiert. Anschließend an diese Behandlung erfolgte eine Ruhezeit von 1,0 h bevor die Flaschen geöffnet wurden. Der Zusatz von Proteinlösungen erfolgte ebenso.

2.2.21 Überkopfschütteln von Produktproben

Biere oder Wässer, den Produktproben nach der oben beschriebenen Methode zugesetzt waren, wurden in einem vom Verfasser zum Überkopfschüttler umgebauten Betonmischer (Akita, Modell 130) bei 28 U/min geschüttelt. In die Trommel des Betonmischers wurden als Halterung für Getränkekästen axial vier Winkelschienen eingeschweißt und mit Endanschlägen versehen. Der eingeführte Kasten wurde mit einem an einem Scharnier angenieteten Bügel gesichert, der

wiederum durch eine Augenschraube mit Kugelknauf fixiert wurde (Abbildung 12). Herausfallen und Klappern der Flaschen wurden durch eine angepaßte Schichtholzplatte und eine Schaumstoffzulage verhindert. Weiterhin wurde das Gerät durch Anbringen eines Lüftergitters vor dem Lüfterrad am Motor und zusätzliche Ventilationsöffnungen für den Dauerbetrieb tauglich gemacht. Die Flaschen wurden für 24 h im Überkopfschüttler bei 28 U/min rotiert. Anschließend an diese Behandlung erfolgte eine Ruhezeit von 1,0 h bevor die Flaschen geöffnet wurden. Die Frequenz des Schüttlers lag nahe der von Thorne & Helm 1957 publizierten Frequenz von 33 U/min.

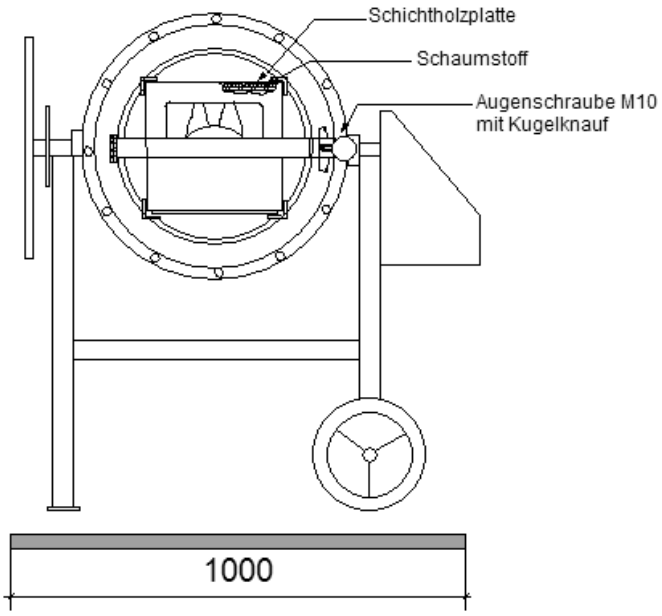

Abbildung 12: Skizze des zum Überkopfschüttler für Bierkästen umgebauten Betonmischers

2.2.22 Durchführung eines Brauversuchs mit transgenen Hefen

Am Lehrstuhl für Technische Mikrobiologie wurden die im folgenden beschriebenen transgenen Hefen durch Dr. rer. nat. Simone Theisen hergestellt (vgl. Tabelle 8). Das Gen für Lipidtransferprotein LTP1500 (AF551849) aus Weizen (*Triticum aestivum*) wurde mit entsprechenden Primern amplifiziert und über die Schnittstellen von EcoRI und XhoI in die *multiple cloning site* des Vektors pXY242 eingefügt. Die für Klasse II-Hydrophobin FcHyd5p (GenBank Accession DQ449530) und Klasse I-Hydrophobin FcHyd3p (GenBank Accession DQ449531) aus *F. culmorum* TMW 4.0111 kodierenden Gene wurden durch *in vitro*-Synthese (GeneArt GmbH, Regensburg, D) hergestellt und auf analoge Weise in den Vektor

pXY242 eingefügt. Der Vektor pYX242 enthält einen Triosephosphat-Isomerase-Promotor, der zur konstitutiven Expression des in den Vektor ligierten Gens führt. Empfängerorganismus für die mit dem Vektor pXY242 durchgeführten Transformationen war jeweils *Saccharomyces cerevisiae* DSM 3820 (DSMZ, Braunschweig, D). Als Kontrollorganismus wurde diese Hefe mit dem leeren, ungeschnittenen Plasmid transformiert. Als weitere Kontrolle wurde *S. cerevisiae* sp. *uvarum* var. *carlsbergensis* W66/70 (Hefebank Weihenstephan, Freising, D) eingesetzt.

Tabelle 8: Für Brauversuche verwendete transgene Hefen. Bezeichnung und Angabe des produzierten Proteins

S. cerevisiae DSM3820 [pYX242] #970	leeres Plasmid, Kontrolle
S. cerevisiae DSM3820 [pYX242-LTP1500] #961	LTP1500 aus Weizen
S. cerevisiae DSM3820 [pYX242-FcHyd3] #1064	FcHyd3p aus *F. culmorum* TMW 4.0111
S. cerevisiae DSM3820 [pYX242-FcHyd5] #858	FcHyd5p aus *F. culmorum* TMW 4.0111

Die transgenen Hefe-Klone *S. cerevisiae* DSM3820 [pYX242-LTP1500] #961, *S. cerevisiae* DSM3820 [pYX242-FcHyd3] #1064 und *S. cerevisiae* DSM3820 [pYX242-FcHyd5] #858 wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit für einen Brauversuch eingesetzt. Daneben dienten *S. cerevisiae* DSM3820 [pYX242] #970 und der kommerziell eingesetzte Stamm *S. cerevisiae* sp. *uvarum* var. *carlsbergensis* W66/70 als Kontrollen. Zur Anzucht dieser Hefen wurden je 50 mL SC-DO-Medium angeimpft und bei 120 U/min und 25 °C für eine Woche bebrütet. Mit diesen Vorkulturen wurden dann jeweils 500 mL SC-DO-Medium (25 g/L Glukose) inokuliert und bei 25 °C und 90 U/min inkubiert. Vier Tage nach der Inokulation wurden je Kolben 50 mL Glukose-Lösung (50 % w:v) zugesetzt. Am sechsten Kulturtag wurden die Kulturen auf 4 °C abgekühlt, um die Sedimentation der Hefezellen zu erreichen. Nach drei Tagen bei 4 °C waren die Hefen vollständig sedimentiert und der Überstand wurde bis auf ein Restvolumen von 150 ml dekantiert. Dann wurden jeweils 20 mL Glukose-Lösung (50 % w:v) zugesetzt und die Kulturen für fünf Stunden bei 25 °C und 90 U/min geschüttelt. Diese Hefesuspensionen wurden zum Animpfen der Würzen in Korneliusbehältern verwendet. Helle Ausschlagwürze (P12) aus Gerstenmalz wurde vom Hofbrauhaus Freising (Freising, D) zur Verfügung gestellt.

S. cerevisiae DMS3820 [pYX242-LTP1500] #961, *S. cerevisiae* DMS3820 [pYX242-FcHyd3] #1064, *S. cerevisiae* DMS3820 [pYX242-FcHyd5] #858, die Plasmide trugen, welche die Produktion der Proteine LTP1500, FcHyd3 und FcHyd5 ermöglichten wurden nach den oben beschriebenen Methoden für einen Brauversuch vorbereitet. *S. cerevisiae* DMS3820 [pYX242] #970 mit leerem Plasmid pYX242 der kommerzielle Hefe-Stamm *S. cerevisiae* sp. *uvarum* var. *carlsbergensis* W66/70 dienten als Kontrollen. Mit den Hefesuspensionen wurden jeweils 15 Liter belüftete, gehopfte Auschlagwürze im Korbneliusbehältern angeimpft. Die Hauptgärung fand bei Raumtemperatur statt, wobei an den Gasanschlüssen der Behälter nach unten gerichtete Kunststoffschläuche befestigt wurden, die einen sterile Austritt des entstehenden Kohlendioxids ermöglichten. Nach sieben Tagen war die Hauptgärung beendet, da keine nennenswerte CO2-Bildung mehr festellbar war. Die Korneliusbehälter wurden auf 4 °C gekühlt und mit sterilem, ölfreiem CO_2 bis zum Erreichen eines CO_2-Gehaltes von 5,0 g/L (Sättigungsdruck 1,0 bar bei 4 °C) karbonisiert. Nach der Sättigung mit CO_2 wurden die Behälter für weitere sieben Tage bei 4 °C gelagert. Danach wurden die Biere unter Gegendruck in neue sterile NRW-Flaschen (500 mL) abgefüllt. Die abgefüllten Flaschen wurden zur Sedimentation der Hefe 14 Tage bei 4 °C gelagert.

Vor der Bestimmung des Überschäumvolumens wurden die Flaschen auf Raumtemperatur (20 °C) gebracht und gewogen. Nachdem bekannt ist, dass Schüttlen bzw. Erschütterungen das Überschäumen von Gushingbieren erhöhen, wurden je vier Flaschen der Biere für 22 h mit 28 U/min über Kopf geschüttelt. Die Flaschen wurden aus dem Schüttler entnommmen und aufrecht für eine Stunde stehen gelassen. Direkt vor dem Öffnen wurden die Flaschen langsam fünf mal über Kopf gedreht und nach einer Ruhephase von 60 s geöffnet. Das Überschäumvolumen wurde aus der Gewichtsdifferenz ermittelt.

3 Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurden Untersuchungen zum Einfluss der von *Fusarium culmorum* (W.G. Smith) Saccardo und *F. graminearum* Schwabe gebildeten oberflächenaktiven Proteine auf das Phänomen des Wildwerdens (Gushing) von Bier durchgeführt. Oberflächenaktive, aggregierende Proteine, die von den genannten Pilzen ausgeschieden werden, stellen einen möglichen Faktor im bislang unzureichend verstandenen Prozeß des primären Gushings dar. Im Gegensatz dazu konnte gezeigt werden, dass eine durch Zusatz von Detergentien erniedrigte Oberflächenspannung alleine nicht im Stande ist, Gushing zu erzeugen. Hierzu mußte zunächst in Reihenuntersuchungen aus einer Vielzahl an Isolaten der beiden Arten ein Arbeitsstamm gefunden werden, der zudem in der Lage war, Gushing im Malz zu erzeugen. Anschließend konnten die Methoden zur Kultivierung des Isolats und zur Präparation der ausgeschiedenen Proteine etabliert werden. Die gewonnenen oberflächenaktiven Proteine wurden hinsichtlich ihres Einflusses auf Gushing untersucht, weiterhin mittels Edman-Abbau teilweise sequenziert und mit 2D-Gelelektrophorese analysiert. Darüber hinaus wurden die Oberflächenhydrophobizität und die Wirkung solcher Proteine auf die Oberflächenspannung untersucht. Zusätzliche Untersuchungen befassten sich mit der Veränderung der Oberflächenhydrophobizität von Proteinen aus Malzen durch eine Infektion mit *Fusarium*-Arten.

3.1 Auswirkungen des Zusatzes von Detergentien zu Bier und Mineralwasser

Eine deutlich herabgesetzte Oberflächenspannung wurde als Kennzeichen von Gushingbieren berichtet (Weideneder 1992, S. 104). Um die Auswirkungen einer gezielt erniedrigten Oberflächenspannung auf ein eventuelles Entstehen von Gushing zu prüfen, wurden die im folgenden beschriebenen Versuche unternommen. Einem auf 0-2°C gekühlten, gushing-stabilen hellen Lagerbier (P11-Bier, Weihenstephaner Original, Brauerei Weihenstephan, Freising, D, MHD 29. April 2005, 0,5 L-NRW-Flaschen) bzw. Mineralwasser (Siegsdorfer Petrusquelle 'spritzig', Siegsdorf, D, 0,50 L, MHD 02.03.08, Ch.-B. L1549) wurden Detergentien in unterschiedlicher Menge aus Stammlösungen zugesetzt. Verwendet wurden SDS

als anionisches, Tween 20 als nichtionisches und CTAB als kationisches Detergens. Nach dem Zusatz der Lösungen wurden die Flaschen mit neuen Kronkorken verschlossen und für 24 h bei Raumtemperatur im Überkopfschüttler bei 28 U/min rotiert. Dieser Behandlung folgte eine Ruhezeit von 1,0 h, bevor die Flaschen geöffnet wurden. Die unbehandelten Kontrollen waren auch nach der mechanischen Behandlung stabil und schäumten nicht über. Gleichfalls erbrachte ein Zusatz von SDS bis zu 0,66 g/Flasche bzw. Tween 20 bis 0,36 g/Flasche kein gushingartiges Überschäumen. CTAB erzeugte ebenfalls bis zu einem Zusatz von rund 1,6 g/Flasche kein Überschäumen. Nachdem CTAB eine Löslichkeit von 3 g/L (in Wasser) aufweist, wurde die milchige Trübung in der Probe mit 1,6 g CTAB/Flasche auf ungelöstes Detergens zurückgeführt. Selbst diese Trübung durch ungelöstes Detergens rief kein Überschäumen hervor (vgl. Tabellen 9-10). Mit diesem Versuch konnte ausgeschlossen werden, dass eine z.B. durch verschleppte Detergentien erniedrigte Oberflächenspannung alleine das auslösende Moment für Gushing ist.

Tabelle 9: Auswirkung des Zusatzes von SDS auf das Überschäumen von Bier

SDS-Konzentration [mg/0,5 L]	n x kritische Mizell-konzentration*	Überschäum-volumen [mL]	Beobachtung
0	0	0	klar
0,33	10^{-3}	0	klar
3,3	10^{-2}	0	klar
33	10^{-1}	0	beginnende Trübung
330	1	0	trüb
660	2	0	stark getrübt

Tabelle 10: Auswirkung des Zusatzes von Tween 20 auf das Überschäumen von Bier

Tween 20-Konzentration [mg/0,5 L]	n x kritische Mizell-konzentration*	Überschäum-volumen [mL]	Beobachtung
0	0	0	klar
0,036	10^{-3}	0	klar
0,36	10^{-2}	0	klar
3,6	10^{-1}	0	klar
36	1	0	klar
363	10	0	klar

Tabelle 11: Auswirkung des Zusatzes von CTAB auf das Überschäumen von Bier

CTAB-Konzentration [mg/0,5 L]	n x kritische Mizell-konzentration*	Überschäum-volumen [mL]	Beobachtung
0	0	0	klar
0,17	10^{-3}	0	klar
1,7	10^{-2}	0	klar
17	10^{-1}	0	klar
167	1	0	leichte Trübung am Boden
$1{,}67 \times 10^{3}$	10	0	milchige Trübung

*) Kritische Mizellkonzentration in 50 mM NaCl.

3.2 Vorarbeiten zur Auswahl der zu untersuchenden Organismen

3.2.1 Identifizierung von Isolaten, die *in vitro* oberflächenaktive Stoffe ausscheiden

Für das *Screening* auf die Ausbildung oberflächenaktiver Proteine durch *F. culmorum* und *F. graminearum* wurde ein Schnelltest eingesetzt, der auf der Veränderung der wasserabweisenden Eigenschaften von Parafilm® beruht: Parafilm ist extrem hydrophob: aufgebrachtes Wasser perlt vollständig ab. Der Grenzflächenkontaktwinkel (Wasser-Parafilm-Luft) ist vergleichbar mit dem von PTFE. Die im Screening eingesetzten, unbeimpften Medien laufen gleichfalls spurlos ab. Scheidet jedoch der Organismus entsprechend amphiphile Stoffe aus, so kann der Medienfilm im Kontaktbereich mehr oder weniger gut anhaften. Das Verhalten des Medienfilms nach dem Wiederabheben vom bewachsenen Kulturmedium wurde visuell beurteilt und als Indikator für die Produktion oberflächenaktiver Proteine angesehen.

In diesem Test wurden nahezu alle Stämme der Arten *F. culmorum* und *F. graminearum* aus der Stammsammlung des Lehrstuhls für Technische Mikrobiologie in Petrischalen mit Flüssigmedium angeimpft und bei Raumtemperatur und unter Tageslichteinfluß bebrütet (Malzextrakt-Bouillon bzw. Hefe-Kohlenstoffbasis-Medium mit Ammoniumsulfat als Stickstoffquelle). Im Kulturzeitraum wurde mehrmals ein Streifen Parafilm® auf das Medium aufgelegt

und nach kurzer Wartezeit abgehoben. Der auf dem Parafilm® befindliche Flüssigkeitsfilm wurde beobachtet und das Oberflächenverhalten (stark benetzend, benetzend, indifferent, nicht benetzend) notiert. Den unten dargestellten Ergebnissen in Form von Tortendiagrammen liegt das Verhalten des Flüssigkeitsfilms am zwölften bzw. 13. Kulturtag zugrunde (Abb.12 bis 15). Weiterhin wurde das Oberflächenverhalten im letzten Drittel der Kulturzeit (>18 Tage) beobachtet, um die Stabilität des Effektes beurteilen zu können. Aufgrund dieser Ergebnisse konnte festgestellt werden, dass ein großer Teil der untersuchten *F. culmorum*- und *F. graminearum*-Isolate oberflächenaktive Stoffe ausschied. Bei *F. graminearum* war die Bildung oberflächenaktiver Stoffe auf ME-Medium ausgeprägter, als auf YCB-Medium. Das Wachstum auf YCB-Medium führte bei *F. graminearum* zu einer deutlich geringeren Anzahl benetzend wirkender Isolate, wobei nahezu alle Isolate, die eine benetzende Wirkung auf YCB-Medium aufwiesen, diese auch in ME-Medium zeigten. Bei wenigen der stark benetzenden Stämme baute sich der oberflächenbenetzende Effekt innerhalb der Untersuchungszeit (bis ca. 30 Tage) wieder ab. Ebenfalls wenige Isolate bildeten unter den Testbedingungen, besonders auf ME-Medium, keinerlei oberflächenaktive Stoffe aus. Hierdurch konnte gezeigt werde, dass einerseits die Fähigkeit, oberflächenaktive Stoffe zu bilden nicht von Isolat zu Isolat gleich ist, sondern auch einer zeitlichen Dynamik unterliegt. Weiterhin ist ein deutlicher Einfluss des Mediums festzustellen. In den Tabellen 12 und 13 sind die Ergebnisse der Reihenuntersuchungen tabellarisch, nach Stamm-Nummern geordnet, aufgeführt.

Tabelle 12: Screening-Ergebnisse für F. culmorum, Bildung oberflächenaktiver Stoffe in YCB-Medium

		TMW-Nummer	**Originalbezeich-nung**	**Tag 12/13, YCB**	**Tag 18/19, YCB**
F.	*culmorum*	4.0101		-	+/-
F.	*culmorum*	4.0102	E 479	++, kein Luftmyzel	++
F.	*culmorum*	4.0103	E 469	-	-
F.	*culmorum*	4.0108	E 147	++	++
F.	*culmorum*	4.0111	BBA 62182	++!, viel Luftmyzel	++!
F.	*culmorum*	4.0112		++	++
F.	*culmorum*	4.0121		++	++
F.	*culmorum*	4.0130		-, kein Luftmyzel	-
F.	*culmorum*	4.0132		+/-	+/-
F.	*culmorum*	4.0137		-	+

		TMW-Nummer	Originalbezeichnung	Tag 12/13, YCB	Tag 18/19, YCB
F.	*culmorum*	4.0138		+	-
F.	*culmorum*	4.0141		++	++
F.	*culmorum*	4.0145	CBS 417.86	+/-	++
F.	*culmorum*	4.0149	DSM 62191	++	++
F.	*culmorum*	4.0156		++	++
F.	*culmorum*	4.0187		+	-
F.	*culmorum*	4.0189		+/-	+/-
F.	*culmorum*	4.0192		+	++
F.	*culmorum*	4.0193		+	+
F.	*culmorum*	4.0194		++	++
F.	*culmorum*	4.0195		++	++
F.	*culmorum*	4.0197		++	++
F.	*culmorum*	4.0198		++	+
F.	*culmorum*	4.0199		+/-	-
F.	*culmorum*	4.0205	E 133	+/-	++
F.	*culmorum*	4.0206	E 145	++	
F.	*culmorum*	4.0207	E 16/1977	++	++
F.	*culmorum*	4.0243		+	++
F.	*culmorum*	4.0244		++	++
F.	*culmorum*	4.0252		++	++
F.	*culmorum*	4.0253		++	-
F.	*culmorum*	4.0254		+/-	+/-
F.	*culmorum*	4.0301		++	++
F.	*culmorum*	4.0318		+	++
F.	*culmorum*	4.0319		+	+/-
F.	*culmorum*	4.0324	DSM 1094	-	++
F.	*culmorum*	4.0328		-	++
F.	*culmorum*	4.0329		+/-	+
F.	*culmorum*	4.0333		+/-	+/-
F.	*culmorum*	4.0358		+/-	++
F.	*culmorum*	4.0526	LWL F4-2	+/-	-
F.	*culmorum*	4.0527	LWL F4-6	++	++
F.	*culmorum*	4.0528	LWL F9-2	+	-
F.	*culmorum*	4.0529	LWL F10-2	++	+/-
F.	*culmorum*	4.0530	LWL F16-4	-!, viel Luftmyzel	-!
F.	*culmorum*	4.0531	LWL F23-5	++	+/-
F.	*culmorum*	4.0532	LWL F25-6	-	-
F.	*culmorum*	4.0533	LWL F29-4	++	++
F.	*culmorum*	4.0534	LWL F29-5	++	++
F.	*culmorum*	4.0535	LWL F51-1	++	+/-

		TMW-Nummer	**Originalbezeich-nung**	**Tag 12/13, YCB**	**Tag 18/19, YCB**
F.	*culmorum*	4.0536	LWL F51-2	-	++
F.	*culmorum*	4.0537	LWL F57-1	++	++
F.	*culmorum*	4.0538	LWL F57-2	-	-
F.	*culmorum*	4.0539	LWL F64-2	++	++
F.	*culmorum*	4.0540	LWL F64-3	++	++
F.	*culmorum*	4.0545	LWL F64-4	++	++
F.	*culmorum*	4.0546	LWL F81-4	-!	-
F.	*culmorum*	4.0547	LWL F83-3	+/-	++
F.	*culmorum*	4.0548	LWL F85-5	-!	-!
F.	*culmorum*	4.0549	LWL F86-2	+	++
F.	*culmorum*	4.0550	LWL F91-4	-	++
F.	*culmorum*	4.0551	LWL F102-2	++	++
F.	*culmorum*	4.0552	LWL F102-10	-	-
F.	*culmorum*	4.0553	LWL F103-1	+	++
F.	*culmorum*	4.0554	LWL F109-8	-	+/-
F.	*culmorum*	4.0555	LWL F113-9	++	+/-
F.	*culmorum*	4.0598		++	++
F.	*culmorum*	4.0610		++	++
F.	*culmorum*	4.0614		+	++
F.	*culmorum*	4.0615		++	++
F.	*culmorum*	4.0730	INRA D1	++	++
F.	*culmorum*	4.0731	INRA C4	+	++
F.	*culmorum*	4.0732	INRA B8	++	++
F.	*culmorum*	4.0733	INRA A2	++	++
F.	*culmorum*	4.0734	INRA A4	++, kein Luftmyzel	++
F.	*culmorum*	4.0735	INRA B4	-!, kein Luftmyzel	++
F.	*culmorum*	4.0736	INRA C1	++	++
F.	*culmorum*	4.0737	INRA C5	++	++
F.	*culmorum*	4.0738	INRA C9	++	++
F.	*culmorum*	4.0739	INRA F1	+	++
F.	*culmorum*	4.0740	INRA K2	++	++
F.	*culmorum*	4.0741	INRA A1	++	++
F.	*culmorum*	4.0742	INRA A5	++	++
F.	*culmorum*	4.0743	INRA A6	++	++
F.	*culmorum*	4.0744	INRA B5	++	++
F.	*culmorum*	4.0745	INRA B10	-, viel Luftmyzel	+/-
F.	*culmorum*	4.0746	INRA E4	++	++
F.	*culmorum*	4.0747	INRA B3	++	++

		TMW-Nummer	Originalbezeich-nung	Tag 12/13, YCB	Tag 18/19, YCB
F.	*culmorum*	4.0748	INRA B6	++	++
F.	*culmorum*	4.0749	INRA C3	++	++
F.	*culmorum*	4.0750	INRA H1	++	++
F.	*culmorum*	4.0751	INRA L4	++	++
F.	*culmorum*	4.0752	INRA N1	++	++
F.	*culmorum*	4.0753	INRA F4	++	++
F.	*culmorum*	4.0754	INRA F2	++	++
F.	*culmorum*	4.0755	INRA K3	+	++
F.	*culmorum*	4.0875	BBA 69883	++	++
F.	*culmorum*	4.0876	BBA 69884	++	++
F.	*culmorum*	4.0895	BBA 63874	++	++
F.	*culmorum*	4.0900	BBA 65219	++	++
F.	*culmorum*	4.0924	BBA 64218	++	++
F.	*culmorum*	4.0941	BBA 62180	++	++
F.	*culmorum*	4.0942	BBA 62182	++	++
F.	*culmorum*	4.0943	BBA 62188	-!	-!
F.	*culmorum*	4.0959	BBA 64223	++	++
F.	*culmorum*	4.0963	BBA 64300	++	++

Tabelle 13: Screening-Ergebnisse für F. graminearum. Bildung oberflächenaktiver Stoffe in YCB-Medium und ME-Bouillon

		TMW-Nummer	Original-bezeichnung	Tag 12 YCB	Tag 20 YCB	Tag 12 ME	Tag 19/22 ME
F.	*graminearum*	4.0122		++	++ !	+	+
F.	*graminearum*	4.0124				-	-
F.	*graminearum*	4.0127				+	+
F.	*graminearum*	4.0133		++	+	+/-	+/-
F.	*graminearum*	4.0135		++	++	+/-	+/-
F.	*graminearum*	4.0139				++	++
F.	*graminearum*	4.0143		-	-	+/-	+/-
F.	*graminearum*	4.0151				++	++
F.	*graminearum*	4.0152		-	-	++	+/-
F.	*graminearum*	4.0154				++	++
F.	*graminearum*	4.0155				+	+/-
F.	*graminearum*	4.0157		-	-	+/-	+/-
F.	*graminearum*	4.0159		+	+	+/-	+/-
F.	*graminearum*	4.0160		+/-	+	+	+/-
F.	*graminearum*	4.0168	DSM 62722	-	-	+	+
F.	*graminearum*	4.0169		++!	++!	++	-

		TMW-Nummer	Original-bezeichnung	Tag 12 YCB	Tag 20 YCB	Tag 12 ME	Tag 19/22 ME
F.	*graminearum*	4.0172		++	++	+	-
F.	*graminearum*	4.0173		-	-	-	+
F.	*graminearum*	4.0175	DSM 4529			+	+ - ++
F.	*graminearum*	4.0177	CBS 104.09	-	-	-	++
F.	*graminearum*	4.0183		+/-	-	-	+/-, viel Luftmyzel
F.	*graminearum*	4.0185		-	-	++	-
F.	*graminearum*	4.0186		-	-	+	+
F.	*graminearum*	4.0188		+	-	+	+
F.	*graminearum*	4.0190		-	-!	+/-	+
F.	*graminearum*	4.0202		+/-	++	+/-	+
F.	*graminearum*	4.0208	DSM 4527	-	-	-	
F.	*graminearum*	4.0351	VLB 63/1			+	+
F.	*graminearum*	4.0352		++	+	+	+/-
F.	*graminearum*	4.0356		+	+	+/-	+/-
F.	*graminearum*	4.0429		++	++	+	+/-
F.	*graminearum*	4.0430		-	-	+/-	+/-
F.	*graminearum*	4.0431				+	+/-
F.	*graminearum*	4.0432		+/-	+	+	+/-
F.	*graminearum*	4.0443	VLB 15	-		++	+
F.	*graminearum*	4.0444	VLB 15/2	+	+	+/-	+
F.	*graminearum*	4.0445	VLB 17	-	-	+	
F.	*graminearum*	4.0446	VLB 20/1	-	+/-	+	+/-
F.	*graminearum*	4.0447	VLB 20/2	+/-	-	+/-	++
F.	*graminearum*	4.0448	VLB 21	-	++	+	+
F.	*graminearum*	4.0449	VLB 63/2	-	-	+	+
F.	*graminearum*	4.0451	VLB 67/2	+	++	+	+
F.	*graminearum*	4.0452	VLB 5564/1	-	+/-	+	++
F.	*graminearum*	4.0453	VLB 5564/2	+	++	+	+/-
F.	*graminearum*	4.0454	VLB 5564/3	+/-	-	+	+
F.	*graminearum*	4.0455		+/-	-	+	+/-
F.	*graminearum*	4.0456		+	+	+/-	+/-
F.	*graminearum*	4.0457		+	++	+	+/-
F.	*graminearum*	4.0458		+/-	+	+/-	+/-
F.	*graminearum*	4.0459		-	++	+	+
F.	*graminearum*	4.0484		+/-	+	+	+/-
F.	*graminearum*	4.0502		-	-	+	+/-
F.	*graminearum*	4.0503		-	-	+/-	+/-
F.	*graminearum*	4.0504		-	+/-	+	+/-
F.	*graminearum*	4.0505		-	-	++	
F.	*graminearum*	4.0506		+/-	+	+	+/-

		TMW-Nummer	Original-bezeichnung	Tag 12 YCB	Tag 20 YCB	Tag 12 ME	Tag 19/22 ME
F.	*graminearum*	4.0507		+/-	+/-	+/-	+/-
F.	*graminearum*	4.0596		++, viel Luftmyzel	++!, viel Luftmyzel	+	-
F.	*graminearum*	4.0600		-	-	+/-	++
F.	*graminearum*	4.0729		-	-	+	++
F.	*graminearum*	4.0799	BBA 65357			+	
F.	*graminearum*	4.0824	BBA 69078	-	-	+	++
F.	*graminearum*	4.0826	BBA 69463	-	-	+	+/-
F.	*graminearum*	4.0834	BBA 69057	+	-	+	+
F.	*graminearum*	4.0859	BBA 69733			+/-	++
F.	*graminearum*	4.0888	BBA 62217	+/-	+	+/-	+
F.	*graminearum*	4.0894	BBA 62722	+/-	+/-	+	+
F.	*graminearum*	4.0910	BBA 69077	-	-	+	+/-
F.	*graminearum*	4.0919	BBA 64884	++	++	+/-	+
F.	*graminearum*	4.0922	BBA 64967	+	+/-	+	+
F.	*graminearum*	4.0958	BBA 64221	-, viel Luftmyzel	-, viel Luftmyzel	+	+/-
F.	*graminearum*	4.0981	BBA 65356	-	-	+	+
F.	*graminearum*	4.0983	BBA 65537	+/-	+/-	+	+/-
F.	*graminearum*	4.0989	BBA 65928	-	-	+	++
F.	*graminearum*	4.0990	BBA 65929	-	-	+/-	++
F.	*graminearum*	4.0993	BBA 67525	+/-	-	+	++
F.	*graminearum*	4.0999	BBA 67754	-	-	+	+/-
F.	*graminearum*	4.1031	BBA 70738	-	-	++	+/-
F.	*graminearum*	4.1042	BBA 67638	+	-	++	+
F.	*graminearum*	4.1043	BBA 67639	-	+	++	++
F.	*graminearum*	4.1410	NRRL5883	-		-	++
F.	*graminearum*	4.1411	NRRL28063	-	-	++	+
F.	*graminearum*	4.1506		+/-, viel Luftmyzel	+/-	-	+/-
F.	*graminearum*	4.1555		-	-	+/-	+/-

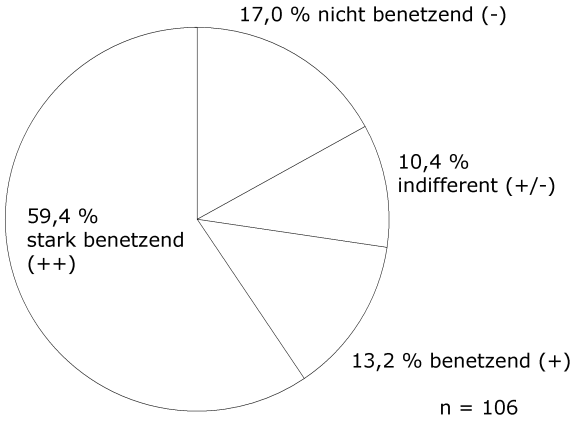

Abbildung 13: Verhalten des Medienfilms von Kulturen von F. culmorum in YCB-Medium auf Parafilm am 12./13. Kulturtag, n=106 Isolate

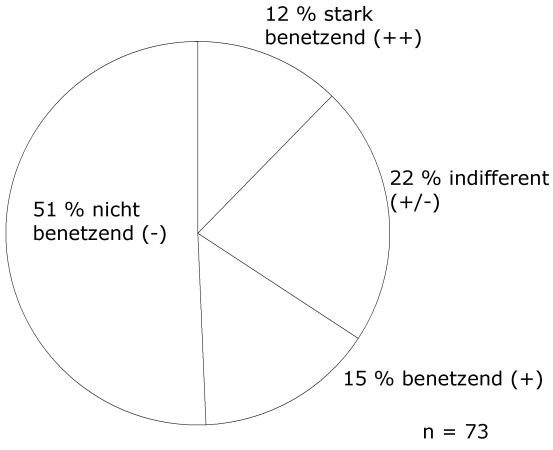

Abbildung 14: Verhalten des Medienfilms von Kulturen von F. graminearum in YCB-Medium auf Parafilm am 12. Kulturtag, n=73 Isolate

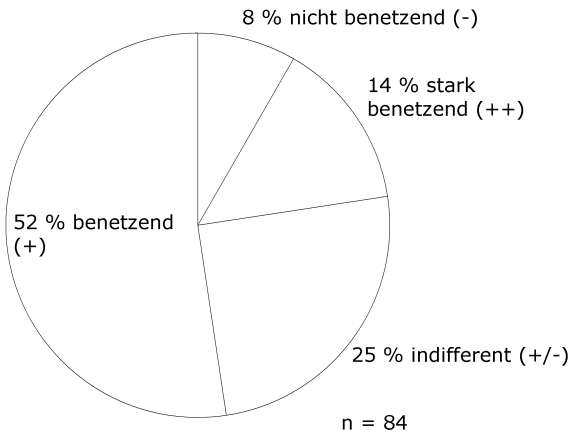

Abbildung 15: Verhalten des Medienfilms von Kulturen von F. graminearum in ME-Medium auf Parafilm am 12. Kulturtag, n=84 Isolate

Für *F. culmorum* wurden folgende Arbeitsstämme ausgewählt:

***F. culmorum* TMW 4.0102:** Ausscheidung oberflächenaktiver Substanzen, keine Luftmyzelbildung;

***F. culmorum* TMW 4.0111:** Ausscheidung oberflächenaktiver Substanzen, jedoch mit starker Luftmyzelbildung. Dieser Stamm sollte wegen der Fähigkeit zur Bildung von Luftmyzel, das normalerweise von hydrophoben Proteinen bedeckt ist, der Hauptarbeitsstamm werden.

Von Arbeiten mit Isolaten von *F. graminearum* wurde anfangs abgesehen. Für Untersuchungen zur Oberflächenaktivität wurde in einem späteren Teil der Arbeit *F. graminearum* TMW 4.0175 eingesetzt, der auf ME-Medium im Schnelltest oberflächenaktive Stoffe aussschied, diese nicht abbaute und in der Testmälzung Gushing hervorrief.

3.2.2 Testmälzung mit den Arbeitsstämmen *F. culmorum* TMW 4.0102 und TMW 4.0111

Mit dem im *Screening* ausgewählten *F. culmorum*-Stamm TMW 4.0111 wurden zwei unabhängige Testmälzungen durchgeführt, um zu überprüfen, ob dieses Isolat konsistent fähig ist, Gushing in Malz auszulösen. Weiterhin wurden zwei Isolate von *F. graminearum* in den Versuch einbezogen. Die Mälzungen wurden mit unbelasteter Weizenrohfrucht durchgeführt. Die Abwesenheit von *Fusarium*-Arten wurde durch Auslegen oberflächendesinfizierter Körner auf SNA-Agar überprüft. Die Rohfrucht wurde vor der ersten Naßweiche gewaschen und im Weichwasser mit Konidien des jeweiligen Organismus infiziert. In beiden Versuchen wurde zudem eine nicht-infizierte Kontrolle gemälzt. Die Mälzung wurde ab dem gleichmäßigen Spitzen der Körner isotherm bei 16 °C für 6 Keimtage durchgeführt. Anschließend wurde, orientiert am Darrschema für helles Malz, abgedarrt. Die Gushingtests (nach Donhauser *et al.*, 1990; MEBAK Band 3, Kap. 9.1) wurden durch das Forschungszentrum Weihenstephan für Brau- und Lebensmittelqualität ausgeführt. Die Ergebnisse der Gushingtests zeigten, dass *F. culmorum* TMW 4.0111 in der Lage war, massives Gushingreaktion von Malz auszulösen und damit als Arbeitsstamm geeignet war (Abbildung 16).

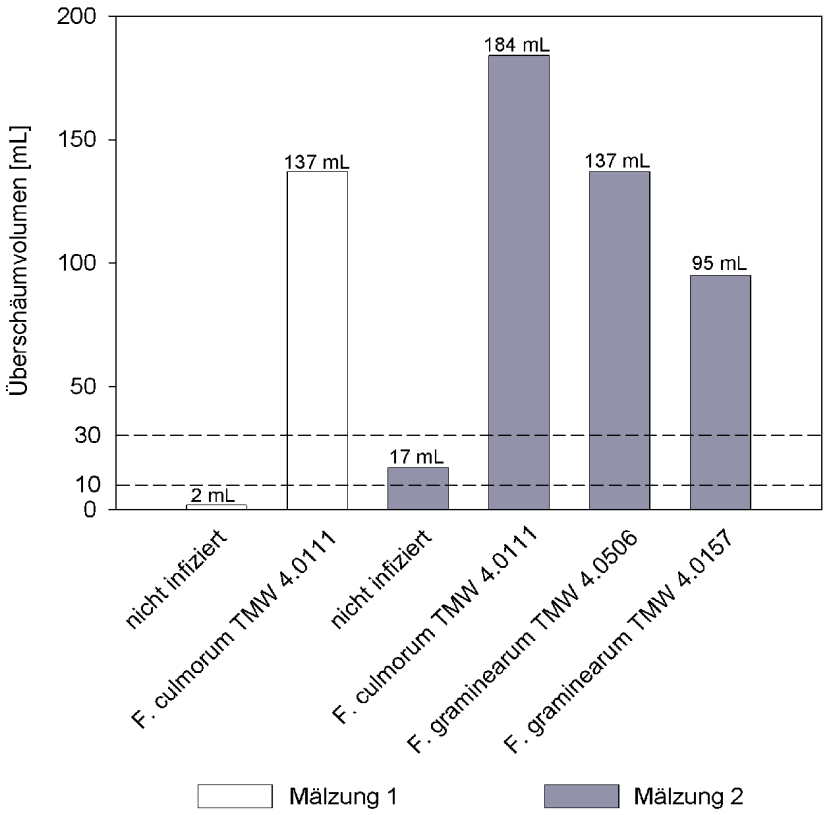

Abbildung 16: Überschäumvolumina der Gushingtest der Weizenmalze nach gezielter Infektion im Weichwasser. Überschäumvolumen 0-10 mL: gushing-stabil; 10-30 mL: labil; >30 mL: instabil.

3.3 Proteinanalytik

In dieser Arbeit wurden zunächst Versuche mit *F. culmorum* TMW 4.0102 durchgeführt, danach wurde vorwiegend mit *F. culmorum* TMW 4.0111 gearbeitet, da dieses Isolat deutlich mehr Protein aussschied, als der erstgenannte Stamm. Im weiteren Verlauf der Arbeit wurden auch Untersuchungen mit den Proteinen von *F. graminearum* TMW 4.0175 durchgeführt.

3.3.1 Zerschäumungsanalyse

Mittels Zerschäumungsanalyse (Durchleiten eines inerten Gases durch eine Flüssigkeitssäule in feinen Blasen) sollten die von den Pilzen ins Medium ausgeschiedenen oberflächenaktiven Proteine angereichert werden. Diese Proteine können sich im Schaum anreichern und ggf. auch in der Grenzfläche der Blasen aggregieren, wobei die Aggregate durch Zentrifugation abgetrennt werden können. Die Zerschäumungsanalyse stellt eine gängige Methode zur Präparation oberflächenaktiver Proteine, auch von Hydrophobinen, dar. Als Medium kam YCB-Flüssigmedium zum Einsatz, da dieses Medium proteinfrei ist und folglich alle präparierten Proteine vom jeweils kultivierten Pilz stammen. Ist durch Zerschäumungsanalyse Schaum zu erhalten, so enthielt die verarbeitete Lösung oberflächenaktive Proteine. Sofern oberflächenaktive Proteine nach einer Einlagerung in eine Phasengrenzfläche (z.B. Gas-Flüssigkeit) stabil aggregieren, sind die Aggregate z.B. durch Zentrifugation zu gewinnen.

3.3.1.1 Zerschäumung von Medien nach Wachstum von *F. culmorum* TMW 4.0102

Zellfreie Kulturüberstände von *F. culmorum* TMW 4.0102 wurden nach siebentägiger Kultivierung zerschäumt und der Schaum nach den angegebenen Methoden verarbeitet. Beim Zerschäumen fiel auf, dass der austretende Schaum während des Vorgangs seine Struktur änderte. Anfangs war der Schaum feinporig

und fest, gegen Ende der Zerschäumung trat grobblasiger Schaum aus der Apparatur aus. Die unterschiedlichen Schaumfraktionen wurden aufgefangen, zentrifugiert und die sedimentierten Proteinaggregate mit TFA löslich gemacht. Die so präparierten Proteine wurden mittels Gelelektrophorese untersucht, wobei kein signifikanter Unterschied im Proteinspektrum der unterschiedlichen Schaumtypen festzustellen war (Abbildung 17). Es bestand daher kein Grund, in den weiteren Untersuchungen eine Trennung unterschiedlicher Schaumtypen vorzunehmen. In den untersuchten Schäumen konnten nur wenige unterschiedliche Proteine festgestellt werden. Die Hauptfraktionen weisen Größen zwischen 10 und 25 kDa auf, wobei ein Protein mit einer Größe von 13-14 kDa in hoher Menge gefunden wurde. Darüber hinaus waren nur wenige höhermolekulare Fraktionen zu finden. Der Schaum wies eine hohe mechanische Stabilität auf: er war, ähnlich wie Eischnee, stabil genug um einen mit der runden Seite nach unten eingeführten Laborlöffel zu stützen (Abbildung 18). Hiermit konnte belegt werden, dass *F. culmorum* in der Lage ist, oberflächenaktive, aggregierbare Proteine zu produzieren.

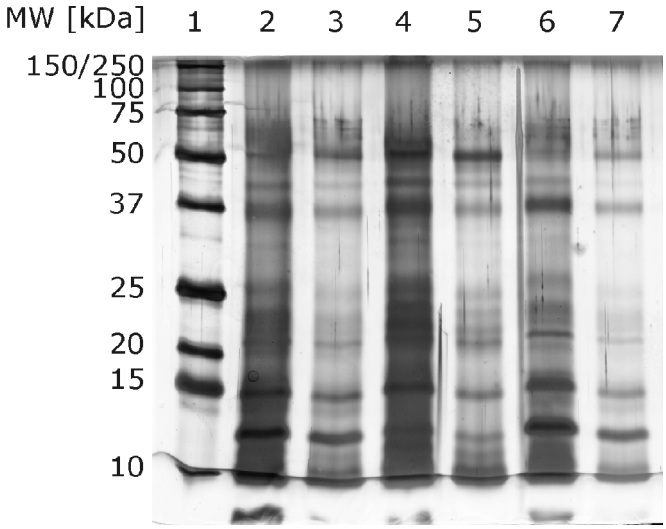

Abbildung 17: Silbergefärbtes Laemmli-Gel mit Protein aus feinem und grobblasigen Schaum, sowie aus Gesamtschaum. Es wurden jeweils zwei unterschiedliche Probemengen aufgetragen. Bahn 1: Molekulargewichtsmarker, Bahnen 2, 3 Gesamtschaum, 4, 5: Feinschaum, 6, 7: Grobschaum.

Abbildung 18: Schaum aus der Zerschäumung eines Mediums nach Wachstum von F. culmorum. Standzeit des Schaumes bis zur Aufnahme ca. 10 min (1000 mL-Becherglas, Laborlöffel steckt mit runder Seite nach unten im Schaum).

3.3.1.2 Gewinnung von schaumaktiven Proteinen aus *F. culmorum* TMW 4.0102 zur N-terminalen Sequenzierung

Das von *F. culmorum* TMW 4.0102 vorwiegend gebildete, ca. 14 kDa große, oberflächenaktive Protein wurde durch Zerschäumung und Präparation der im Schaum aggregierten Proteine gewonnen. Die Gewinnung einer hinreichenden Menge des Proteins war aufwendig. Schließlich konnte eine zur N-terminalen Aminosäuresequenzierung ausreichende Menge erhalten und durch Elektrophorese in Tris-Tricin-Gel gereinigt werden. Die Probe wurde mittels eines glycin-freien Puffers (10 mM CAPS, 10 % Methanol, pH 11) auf PVDF-Membran geblottet (*semi-dry blotting*-Verfahren). Das auf dieser Membran gebundene Protein wurde mit Coomassie-Blau gefärbt. Der N-terminale Edman-Abbau des Proteins erfolgte auf der Membran. Die Sequenzierung ergab folgende N-terminale Aminosäuresequenz, wobei "X" eine nicht bestimmbare Aminosäure, ".../x" einen mehrdeutigen Befund des Abbauzyklusses bedeutete:

ATXPD VTVEI FTDQY XED S/x C/x T/x FIDN K/x (Sequenz 1/TMW 4.0102)

BLAST-Recherchen unter unterschiedlichen Randbedingungen ergaben keinerlei Homologie zu bekannten Proteinen. Ebenso blieb eine BLAST-Recherche vom Typ "*protein query vs. translated database*" (tblastn) ergebnislos. Es handelte sich damit um ein bislang unbekanntes Protein, über dessen biologische Funktion nichts ausgesagt werden kann.

3.3.1.3 pH-Wert-Abhängigkeit des präparierbaren Proteinspektrums von *F. culmorum* TMW 4.0111 in der Zerschäumungsanalyse

Unter den gewählten Kulturbedingungen fiel der pH-Wert im YCB-Medium infolge Säureausscheidung durch *F. culmorum* von pH 5,5 auf Werte < pH 2,0. Es wurde daher an Medien von *F. culmorum* TMW 4.0111 untersucht, ob das Spektrum der in den Schaum übergehenden Proteine eine Abhängigkeit vom bei der Zerschäumung vorliegenden pH-Wert hat. Die pH-Werte wurden mit 2 M NaOH eingestellt.

YCB-Medium wurde nach siebentägigem Wachstum von *F. culmorum* TMW 4.0111 vom Myzel getrennt. Das Medium wies pH 1,7 auf. Für die Untersuchung wurde in einem Aliquot des Mediums der pH-Wert belassen, in einem weiteren Aliquot wurde pH 6,0 eingestellt. Anschließend wurden beide Proben zerschäumt. Die entstehenden Schäume wurden jeweils aufgefangen und zentrifugiert. Die entstandenen Pellets wurden in TFA gelöst, nach Abtreiben der TFA in Puffer aufgenommen und auf ein Tris-Tricin-Gel aufgetragen. Ebenso wurden Proben der nach der Zentrifugation des Schaumes erhaltenen Überstände der Pellets aufgetragen. Bei pH 1,7 aggregierte vorwiegend ein ca. 14 kDa großes Protein (Abbildung 19, Bahn 1), bei pH 6,0 vorwiegend ein ca. 17 kDa großes Protein (Bahn 2). Das 17 kDa große Protein ist im Überstand des Pellets aus der Zerschäumung bei pH 6,0 im Vergleich zu pH 1,7 nahezu verschwunden (Bahn 3 und 4). Damit konnte gezeigt werden, dass die Aggregation der Proteine vom pH-Wert beeinflußt wird. Somit stellt der pH-Wert ebenso ein Hilfsmittel zur selektiven Präparation von unterschiedlichen Proteinfraktionen dar, wie eine Randbedingung zur Bildung von Aggregaten aus diesen Proteinen bei der Zerschäumung.

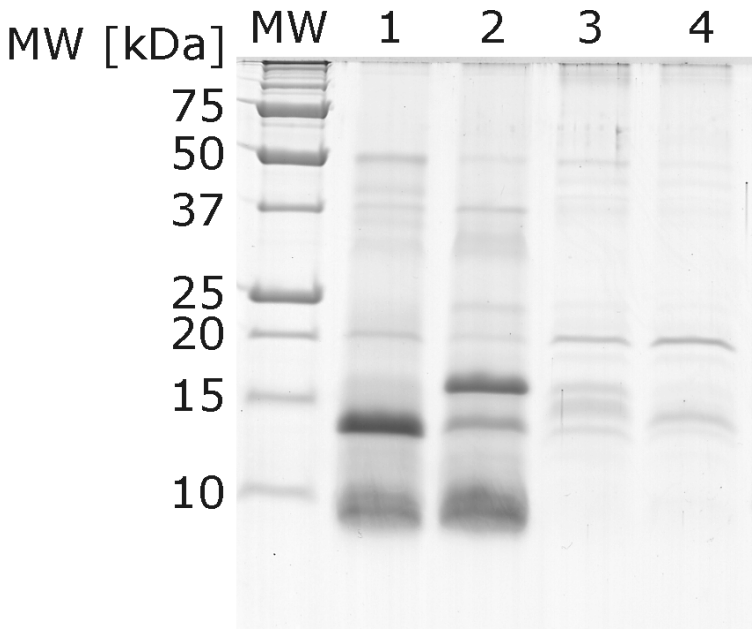

Abbildung 19: Aggregation von Proteinen aus F. culmorum TMW 4.0111 bei Zerschäumungen bei pH 1,7 bzw. pH 6,0.
MW: Molekulargewichtsmarker; 1: bei pH 1,7 aggregierende Proteine; 2: bei pH 6,0 aggregierende Proteine, 3: Proteine im Überstand bei pH 1,7; 4: Proteine im Überstand bei pH 6,0

3.3.1.4 N-terminale Sequenzierung der durch pH-kontrollierte Zerschäumung präparierten Proteine

Die oben gezeigte Abhängigkeit der Präparationsleistung vom pH-Wert bei der Zerschäumung wurde ausgenutzt, um diese Proteine selektiv anzureichern. Die so bei pH 1,7 und pH 6,0 gewonnenen Proteinproben wurden mit DTT reduziert und mit Iodacetamid alkyliert, um eventuell enthaltene Cysteinreste gegenüber den Sequenzierungschemikalien zu stabilisieren. Danach wurden die Proteine mittels Gelelektrophorese in Tris-Tricin-Gelen getrennt und mit CAPS-Blot-Puffer und *semi-dry*-Blotting auf PVDF-Membran (Immobilon P^{SQ}) transferiert. Der Blot (Abbildung 20) wurde mit CBB gefärbt. In weiteren Zerschäumungsanalysen wurde ein 20 kDa großes Protein ebenfalls als oberflächenaktiv identifiziert, da es bei jeder Zerschäumung gefunden wurde. Die Bande dieses Proteins ist ebenfalls auf dem oben gezeigten Blot zu sehen (schwarzes Dreieck, Bereich 1).

Es wurden die folgenden N-terminalen Sequenzen erhalten:

14 kDa NSKPP PNANV ISARI WGDSd cgAK

17 kDa ANQAV VINNC PTTIY VQSFP YNGA

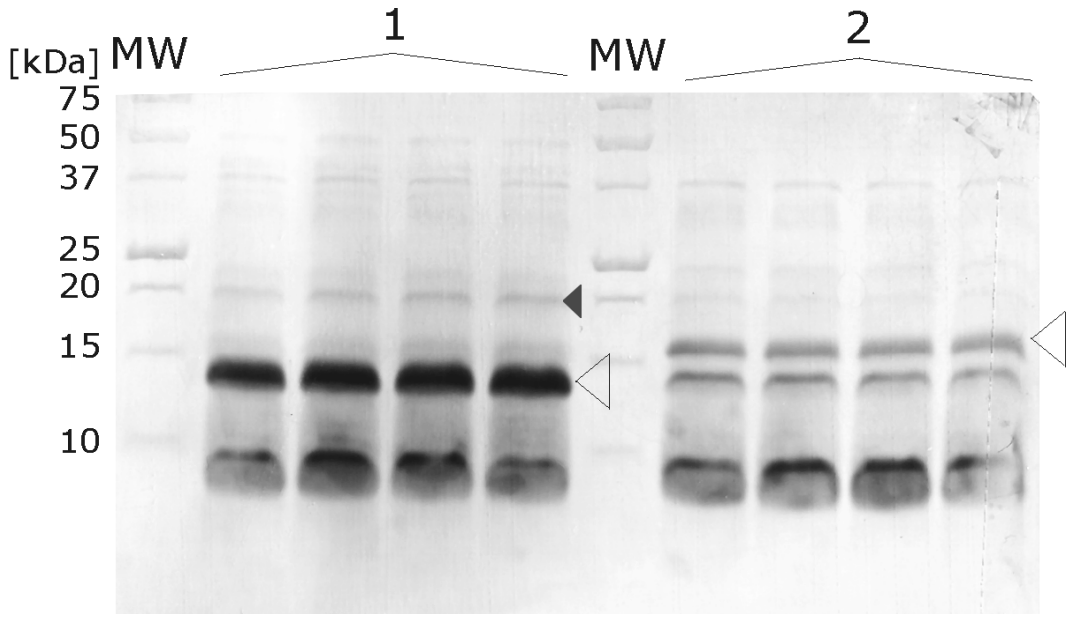

Abbildung 20: CBB-gefärbter Blot der durch Zerschäumung bei pH 1,7 bzw. pH 6,0 präparierten Proteine aus F. culmorum TMW 4.0111.
MW: Molekulargewichtsmarker; Bereich 1: 14 kDa, präpariert bei pH 1,7; Bereich 2: 17 kDa, präpariert bei pH 6,0. Sequenzierte Banden sind jeweils mit einem weißen Dreieck gekennzeichnet. Schwarzes Dreieck: 20 kDa großes Protein.

3.3.1.5 Aggregation von pilzlichen Proteinen als Funktion des pH-Wertes

In weiteren Untersuchungen wurde die pH-Wert-Abhängigkeit der Schaumbildung und Aggregation dieser Proteine in Blasenhäuten für einen bierspezifischen pH-Bereich untersucht. In Aliquoten des Mediums wurden nach dem Entfernen des Myzels unterschiedliche pH-Werte eingestellt, die Aliquote zerschäumt und die erhaltenen Proteinaggregate durch Zentrifugation des Schaums sedimentiert. Nachfolgend wurden die Aggregate durch TFA-Behandlung löslich gemacht und mittels Gelelektrophorese untersucht. Die Quantifizierung der Banden wurde densitometrisch durchgeführt. In diesen pH-Wert-kontrollierten Zerschäumungsversuchen wurde festgestellt, dass eine Aggregation des 14 kDa-Proteins nur bei stark saurem pH-Wert stattfindet. Bei pH 3,5 ist lediglich noch eine Spur dieses Proteins im Pellet zu finden, bei höheren pH-Werten fehlte es völlig. Die für das 17 kDa-Protein festgestellten pH-Wert-Abhängigkeiten sind in

Abbildung 21 dargestellt. Auffällig ist hier eine große Dynamik der Proteinaggregation im Bereich zwischen pH 4,3 und pH 4,8, wobei bei pH 4,8 eine weitaus größere Menge des Proteins aggregiert.

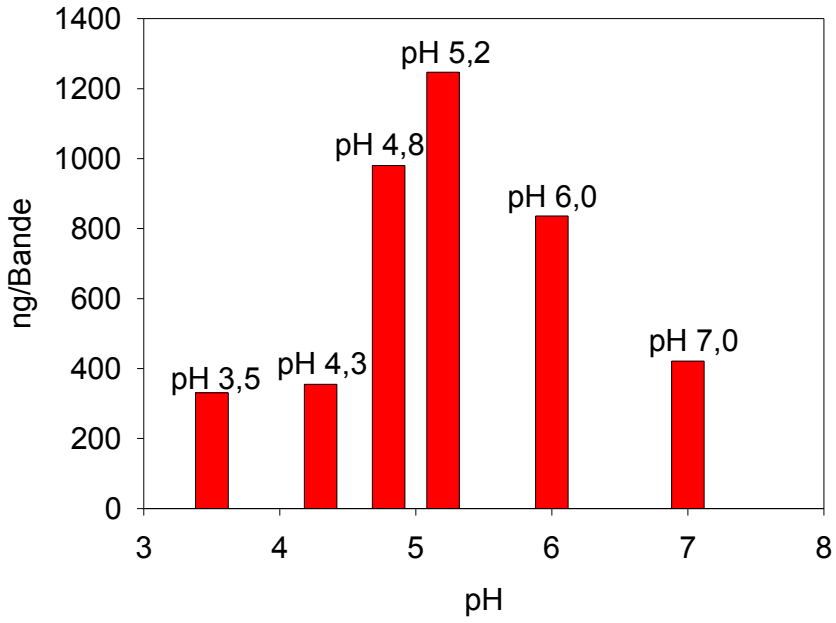

Abbildung 21: Aggregation des 17-kDa-Proteins von F. culmorum bei der Zerschäumung in Abhängigkeit vom eingestellten pH-Wert

3.3.1.6 Sequenzierung interner Peptide oberflächenaktiver Proteine aus *F. culmorum* TMW 4.0111 und Identifizierung der zugehörigen Gene

In 3.3.1.4 wurden bereits Ergebnisse der N-terminalen Sequenzierung des 14 kDa- und des 17 kDa-Proteins aus *F. culmorum* TMW 4.0111 beschrieben. Die bekannten N-Termini reichten noch nicht zur Ermittlung der Proteinsequenz bzw. zu einer Aussage über eine Homologie dieser Proteine mit Hydrophobinen. Die Sequenzierung größere Abschnitte jenseits des N-Terminus war zur weiteren Ermittlung der Protein- bzw. Gensequenz notwendig. Aus diesem Grunde wurden die chromatographisch gereinigten Proteine zur Erzeugung interner Peptide und deren Sequenzierung an ein Labor (Prosequenz Bioanalytik, Ludwigsburg) übersandt. Von allen Proteinen konnten N-terminale Sequenzen und Sequenzen interner Peptide erhalten werden, so dass an diesem Punkt Arbeiten zur

Bestimmung der zugrundeliegenden Gensequenzen ansetzen können. Da im Gegensatz zur Situation bei der N-terminalen Sequenzierung der Proteine mittlerweile größere Mengen verfügbar waren, konnten hier auch die Ergebnisse aus der N-terminalen Sequenzierung verifiziert und vorhandene Ungenauigkeiten und Sequenzierfehler korrigiert werden. Cystein wurde in allen Sequenzen zur Kennzeichnung eventueller Hydrophobin-Motive fett markiert. Hier war besonders die Sequenz der Fraktion 15 des 14 kDa-Proteins bemerkenswert, da diese einen Abstand von elf Aminosäuren zwischen den beiden Cysteinresten aufwies, der für Klasse II-Hydrophobine typisch ist. Weiterhin ist neben dem Abstand der Cysteinreste das Motiv NLDC auch bei anderen Klasse II-Hydrophobinen konserviert. Ein höherer Grad an Homologie als 30-40 % ist bei Hydrophobinen nicht zu erwarten.

Für das 14 kDa-Protein ergaben sich folgende Sequenzen interner Peptide:

Fraktion 9 LSPYG T**C**R
Fraktion 12 HLTGL PTK
Fraktion 13 SVGVY EFGP**C** E
Fraktion 15 **C**SWEV WAYPN LD**C**

Wie schon beim Protein gleicher Größe aus *F. culmorum* TMW 4.0102 ergaben BLAST-Recherchen mit den Sequenzen dieser Peptide unter unterschiedlichen Randbedingungen keinerlei Deckung mit bekannten Proteinen. Ebenso blieb eine BLAST-Recherche vom Typ "protein query vs. translated database (tblastn)" ergebnislos. Es handelte sich damit um ein bislang unbekanntes Protein, dessen biologische Funktion nicht bestimmbar war. Der oben genannte N-Terminus des durch Zerschäumung bei pH 1,7 präparierten Proteins konnte mit einem hypothetischen Protein in der *F. graminearum*-Gesamtsequenz in Verbindung gebracht werden (Koordinaten: 52821 - 52299, Contig: fg_contig_1.160, Exon-Koordinaten: 52821 - 52467; 52408 - 52299):

MVLSLFVTIHQQSQLSNFNTRQHLLYTYRITISKMHFAVAFTTLTALAMGVAADPP *NSKPPPNANVISARIWGDSD CGAK*NNDHNLGEVTLHGDDDGKCSKFSDEVKSVKQYEHDYNCKLVLYSDKNCKRGKK DIKDGQCRATSSHFGSYK VECK

Der gefundene N-Terminus ist kursiv-unterstrichen markiert, wobei für den Bereich von NSKPPPNANV..>>..HFGSYKVECK ein theoretischer pI von 8.23 und ein

Molekulargewicht von 11025.20 Da errechnet werden konnte. Allerdings war es nicht möglich, die oben genannten, internen Peptidsequenzen in dieser Proteinsequenz zu finden.

Für das 17 kDa-Protein:

Fraktion 3 NYS**C**P NpVhL Ya

Fraktion 6 FSEDL R

Fraktion 12 AVVIN D**C**DTA IYVQS VPF (Teilsequenz des N-Terminus)

Mit der Sequenz von Fraktion 12 konnte mit einer tblastn-Recherche ein Treffer für ein hypothetisches Protein, XP_384911.1 bzw. locus tag FG04735.1, von *Gibberella zeae* (Anamorph: *F. graminearum*) erhalten werden. Die Gensequenz des 17 kDa-Proteins von *F. culmorum* TMW 4.0111 wurde aus genomischer DNA durch PCR mit den Primern Fc 17 kDa-f/r und Sequenzierung des klonierten PCR-Produktes erhalten (Genaxxon QuickCLone Kit). Da das Protein stark alkalischen pI besitzt und aus Kulturüberstand durch Zerschäumungsanalyse abgetrennt werden konnte, wurde die im weiteren verwendete Bezeichnung AfpB (*alkaline foam protein B*) gewählt. Die Gensequenz des offenen Leserahmens ist 459 bp lang und auf Aminosäure-Ebene völlig mit der aus *F. graminearum* erhaltenen Sequenz identisch, auf eine Gegenüberstellung der identischen Sequenzen wurde daher verzichtet. Das Gen besteht aus einem offenen Leserahmen ohne Introns. Die aus der Edman-Sequenzierung des Proteins von *F. culmorum* TMW 4.0111 bekannten Fragmente wurden im folgenden kursiv-unterstrichen markiert, das Signalpeptid klein gesetzt. AfpB erhielt die GenBank Accession DQ336149.

Die Gensequenz von AfpB wurde wie folgt bestimmt:

```
1     atgaagttct ctgccctcgc cgccgccgcc gccgtcttcg gctctgctgc cgctgccaac
61    aaggctgtcg tcatcaacga ctgtgacact gccatctatg tccagtccgt tcccttcaac
121   ggcggcgctc ccggcccctt gaccaccctc aagcctggcc agcgattctc tgaggacctc
181   cgcacctctg gctctaccat caagattgcc gacacccgaa ctctcaacaa gcctctcttc
241   ttcggctact cctccgacgc caacaacgtc tactacgagc tcaacactca gtatggcaac
301   cccttcgcca gccagcacaa catcctcaac cctggtgatg gctgccagaa gttcgactgc
361   aaggctggtg acgccaagtg ctacagcacc cccagcagca agaagaacta cagctgccct
421   aaccccgtca ccctctacgc caagatctgc gccaagtaa
```

Aus der Gensequenz wurde die folgenden Proteinsequenz von AfpB abgeleitet (Signalpeptid klein, Peptidsequenzen aus Edman-Sequenzierung kursiv-unterstrichen):

MKFSALAAAAAVFGSAAAANK*AVVINDCDTAIYVQSVPF*NGGAPGPLTTLKPGQR*FSEDLR*TSGSTIKIADTRTLNKP
LFFGYSSDANNVYYELNTQYGNPFASQHNILNPGDGCQKFDCKAGDAKCYSTPSSKK*NYSCPNPVTLYA*KICAK

Für das 20 kDa-Protein:

N-Terminus APEPK TFXLV ALPXK XPFHL
Fraktion 17 SGMGQ GVLQY TGQK
Fraktion 18 LVLYH K
Fraktion 24 NAETE GWKVD Kdngl v

Auch hier konnte mit der Sequenz des N-Terminus mit einer tblastn-Recherche eine Übereinstimmung mit einem hypothetischen Protein, Accession XP_388298 bzw Q4I3T6 (UniProtKB/TrEMBL), locus tag FG08122.1, von *Gibberella zeae* (Anamorph: *F. graminearum*) gefunden werden. Die Gensequenz des im weiteren als AfpA bezeichneten Proteins aus *F. culmorum* TMW 4.0111 wurde aus genomischer DNA durch PCR mit den Primern Fc 20 kDa-f/r und Sequenzierung des klonierten PCR-Produktes erhalten (Genaxxon QuickCLone Kit). Da das Protein ebenfalls stark alkalischen pI besitzt und aus Kulturüberstand durch Zerschäumungsanalyse abgetrennt werden konnte, wurde die Bezeichnung AfpA *(alkaline foam protein A)* gewählt. Dieses Protein wird im weiteren als AfpA *(alkaline foam protein A)* (GenBank Accession DQ336148) bezeichnet.

Gensequenz von AfpA, Intron durch Unterstreichung markiert:

```
1     atgcaattca agactctctt cactgcttct ctcctcagcg gcctcactgt cgccgccccc
61    gagcccaaga cctttggtct cgtcgctctc cgctcaggca gtcctttcca cctctccagc
121   gtcagtgcct ctgagagcgg cttctcgctt ctcctcccca agggcaagca gggtgccaag
181   tgcgtcgaca acaagaagga ggactttgct actttccgca tcagcaagga cggcaagctt
241   gtcctctacc acaagggcaa ggagcagcag gttgcctaca ctgaccgatc cggcatgggt
301   aagttcacat ataatctagg tatataacca gggggcccct gctaacaagt aacccaggcc
361   aaggtgttct ccagtacact ggccagaaga actaccctcg caacgccgag actgagggct
421   ggaaggtcga caaggacggc aacctcgtct ttggcagcaa caacgctggc ttcatggcct
481   gccctggtct caagtccact gacccctgga gcatctgggt cgccaccggt accgaccacc
541   ccggtaacag cgagaaggag tgctacagct tcagcgcccg cgtctctgag accaagaagc
```

601 ctgttagctg catctactcc cagtacagca actaa

Aus der Gensequenz für AfpA abgeleitete Proteinsequenz (Signalpeptid klein, Peptidsequenzen aus Edman-Sequenzierung kursiv-unterstrichen):

MQFKTLFTASLLSGLTVA*APEPKTFGLVALRSGSPFHL*SSVSASESGFSLLLPKGKQGAKCVDNKKEDFATFRISKD
GK*LVLYHK*GKEQQVAYTDR*SGMGQGVLQYTGQK*NYPR*NAETEGWKVDKDGNLV*FGSNNAGFMACPGLKSTDPWS
IWVATGTDHPGNSEKECYSFSARVSETKKPVSCIYSQYSN

Der im folgenden dargestellte Vergleich der Gene von *F. culmorum* TMW 4.0111 und *G. zeae* PH-1 ergab eine Ähnlichkeit von 98 % (622 von 635 Basen), wobei im Gen von *G. zeae* zwei Basen im Intron deletiert sind (Abbildung 22).

```
Fcul-DQ336148      1 ATGCAATTCAAGACTCTCTTCACTGCTTCTCTCCTCAGCGGCCTCACTGT     50
                     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Gzeae-Q4I3T6       1 ATGCAATTCAAGACTCTCTTCACTGCTTCTCTCCTCAGCGGCCTCACTGT     50

Fcul-DQ336148     51 CGCCGCCCCCGAGCCCAAGACCTTTGGTCTCGTCGCTCTCCGCTCAGGCA    100
                     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Gzeae-Q4I3T6      51 CGCCGCCCCCGAGCCCAAGACCTTTGGTCTCGTCGCTCTCCGCTCAGGCA    100

Fcul-DQ336148    101 GTCCTTTCCACCTCTCCAGCGTCAGTGCCTCTGAGAGCGGCTTCTCGCTT    150
                     |.|||||||||||||||||||.|||||||||||||||||||||||||||||
Gzeae-Q4I3T6     101 GCCCTTTCCACCTCTCCAGCGTCAGCGCCTCTGAGAGCGGCTTCTCGCTT    150

Fcul-DQ336148    151 CTCCTCCCCAAGGGCAAGCAGGGTGCCAAGTGCGTCGACAACAAGAAGGA    200
                     ||||||||||||||||||||||||||||||||||.||||||||||||||||
Gzeae-Q4I3T6     151 CTCCTCCCCAAGGGCAAGCAGGGTGCCAAGTGCGCCGACAACAAGAAGGA    200

Fcul-DQ336148    201 GGACTTTGCTACTTTCCGCATCAGCAAGGACGGCAAGCTTGTCCTCTACC    250
                     ||||||||||||||||||||||||||||||||...||||||.||||||||||
Gzeae-Q4I3T6     201 GGACTTTGCTACTTTCCGCATCAGCAAGGACAAGAAGCTCGTCCTCTACC    250

Fcul-DQ336148    251 ACAAGGGCAAGGAGCAGCAGGTTGCCTACACTGACCGATCCGGCATGGGT    300
                     ||||||||||||||||||||.||||||||||||||||||||||||||||||
Gzeae-Q4I3T6     251 ACAAGGGCAAGGAGCAGCAGATTGCCTACACTGACCGATCCGGCATGGGT    300

Fcul-DQ336148    301 AAGTTCACATATAATCTAGGTATATAACCAGGGGGCCCCTGCTAACAAGT    350
                     |||||||| ||||||||||||||||||||||..||||||||||||||||||
Gzeae-Q4I3T6     301 AAGTTCAC-TATAATCTAGGTATATAACCAGGGGATCCCTGCTAACAAGT    349

Fcul-DQ336148    351 AACCCAGGCCAAGGTGTTCTCCAGTACACTGGCCAGAAGAACTACCCTCG    400
                     || ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Gzeae-Q4I3T6     350 AA-CCAGGCCAAGGTGTTCTCCAGTACACTGGCCAGAAGAACTACCCTCG    398

Fcul-DQ336148    401 CAACGCCGAGACTGAGGGCTGGAAGGTCGACAAGGACGGCAACCTCGTCT    450
                     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Gzeae-Q4I3T6     399 CAACGCCGAGACTGAGGGCTGGAAGGTCGACAAGGACGGCAACCTCGTCT    448

Fcul-DQ336148    451 TTGGCAGCAACAACGCTGGCTTCATGGCCTGCCCTGGTCTCAAGTCCACT    500
                     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Gzeae-Q4I3T6     449 TTGGCAGCAACAACGCTGGCTTCATGGCCTGCCCTGGTCTCAAGTCCACT    498

Fcul-DQ336148    501 GACCCCTGGAGCATCTGGGTCGCCACCGGTACCGACCACCCCGGTAACAG    550
                     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Gzeae-Q4I3T6     499 GACCCCTGGAGCATCTGGGTCGCCACCGGTACCGACCACCCCGGTAACAG    548

Fcul-DQ336148    551 CGAGAAGGAGTGCTACAGCTTCAGCGCCCGCGTCTCTGAGACCAAGAAGC    600
                     ||||||||||||||||||||||||||||||||||.||||||||||||||||
Gzeae-Q4I3T6     549 CGAGAAGGAGTGCTACAGCTTCAGCGCCCGCGTCGCTGAGACCAAGAAGC    598

Fcul-DQ336148    601 CTGTTAGCTGCATCTACTCCCAGTACAGCAACTAA    635
                     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Gzeae-Q4I3T6     599 CTGTTAGCTGCATCTACTCCCAGTACAGCAACTAA    633
```

Abbildung 22: Alignment der Gensequenzen von AfpA (Fcul-DQ336148) und dem homologen Protein (Q4I3T6) aus G. zeae PH-1

Das folgende Alignment vergleicht die aus dem Gen von AfpA abgeleitete Aminosäuresequenz mit den Sequenzen ähnlicher Proteine anderer Pilze (Abbildung 23). Die Zuweisung der Accession-Bezeichnungen zu den Proteinen ist am Ende des Alignments dargestellt. Durch die Homologien im Alignment kann davon ausgegangen werden, dass AfpA das erste isolierte Protein einer bislang nicht als Gruppe beschriebenen Proteinfamilie ist. Die weiteren im Alignment aufgeführten Proteine sind nur als hypothetische Proteine bekannt. PhiA und BinB

sind in Expressionsstudien auf genetischer Ebene und durch ein Knockout-Experiment untersucht worden, wurden jedoch noch nicht als Protein gereinigt.

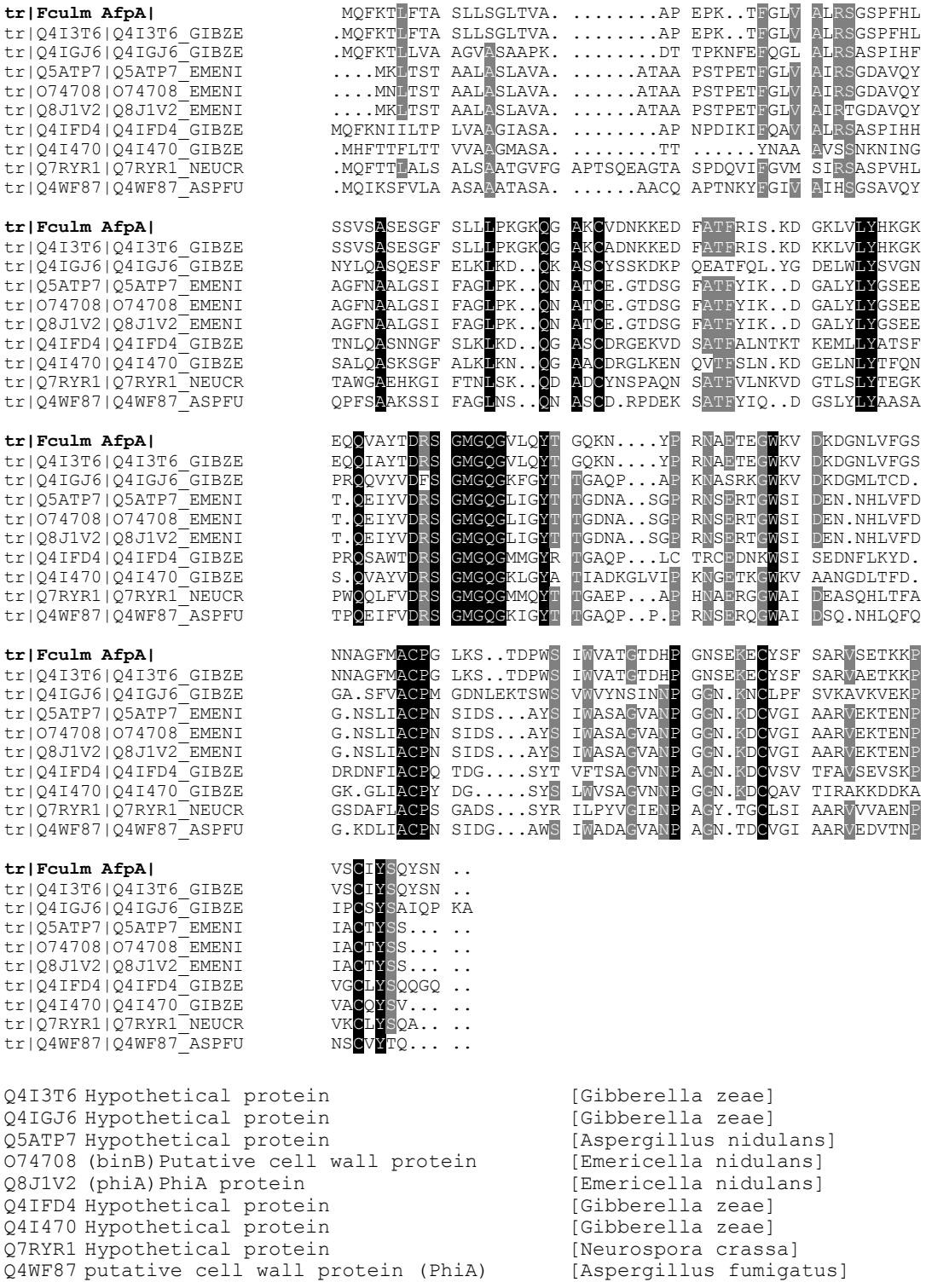

Abbildung 23Alignment der Aminosäuresequenzen von AfpA, Q4I3T6 und weiterer homologer Proteine. Identische Aminosäuren sind schwarz, solche mit ≥80 % Homologie grau hinterlegt.

Mithin handelte es sich den neu identifizierten Proteinen AfpA und AfpB, die mit für Hydrophobine einschlägigen Präparationsmethoden präpariert wurden, nicht um Angehörige der speziellen Gruppe der Hydrophobine. Gleichwohl waren diese von *F. culmorum* TMW 4.0111 ausgeschiedenen Proteine aggregierbar und oberflächenaktiv und zeigten Eigenschaften, die von Hydrophobinen erwartet wurden. Aufgrund der im oben gezeigten Alignment dargelegten konservierten Bereiche gehörte AfpA mit PhiaA und BinB zu einer bislang nicht untersuchten Gruppe pilzspezifischer Proteine, die möglicherweise wie Hydrophobine an der Morphogenese von filamentösen Pilzen beteiligt ist.

3.3.1.7 Strukturanalyse von AfpA-Protein aus *F. culmorum* TMW 4.0111

Neben den im oben gezeigten Alignment vorhandenen konservierten Aminosäuren existieren weitere strukturelle Ähnlichkeiten, die vermuten lassen, dass es sich bei den mit AfpA verwandten Proteinen um eine bislang unbeschriebene Proteinklasse handelt. Hochgradige Homologien werden nur mit den oben genannten (hypothetischen) Proteinsequenzen erhalten. PhiA und BinB aus *E. nidulans* sind durch automatische Analysenmethoden in PFAM als eine anonyme Proteinfamilie erfaßt. AfpA aus *F. culmorum* und PhiA aus *E. nidulans* wurden als Repräsentanten dieser noch nicht untersuchten Proteinklasse zur Strukturanalyse herangezogen. Die Spaltstelle des Signalpeptids von PhiA wurde mittels SignalP Server 3.0 bestimmt. Die Sequenzen der reifen Proteine PhiA und AfpA wurden mittels des PROFsec-Tools zur Vorhersage der Sekundärstrukturen von Proteinen analysiert. PROFsec ist Bestandteil der in Form des PredictProtein-Servers angebotenen Dienste (Rost, 2001; Rost et al., 2004). Zum Vergleich mit Hydrophobinen wurde die Strukturvorhersage ebenfalls mit SC3-Hydrophobin durchgeführt. Für alle untersuchten Proteine wurde ein hoher Anteil an β-Faltblatt ('*extended*') im Wechsel mit ungeordneter Loop-Struktur vorhergesagt, wobei α-Helix-Anteile weitgehend fehlen (Abbildung 24).

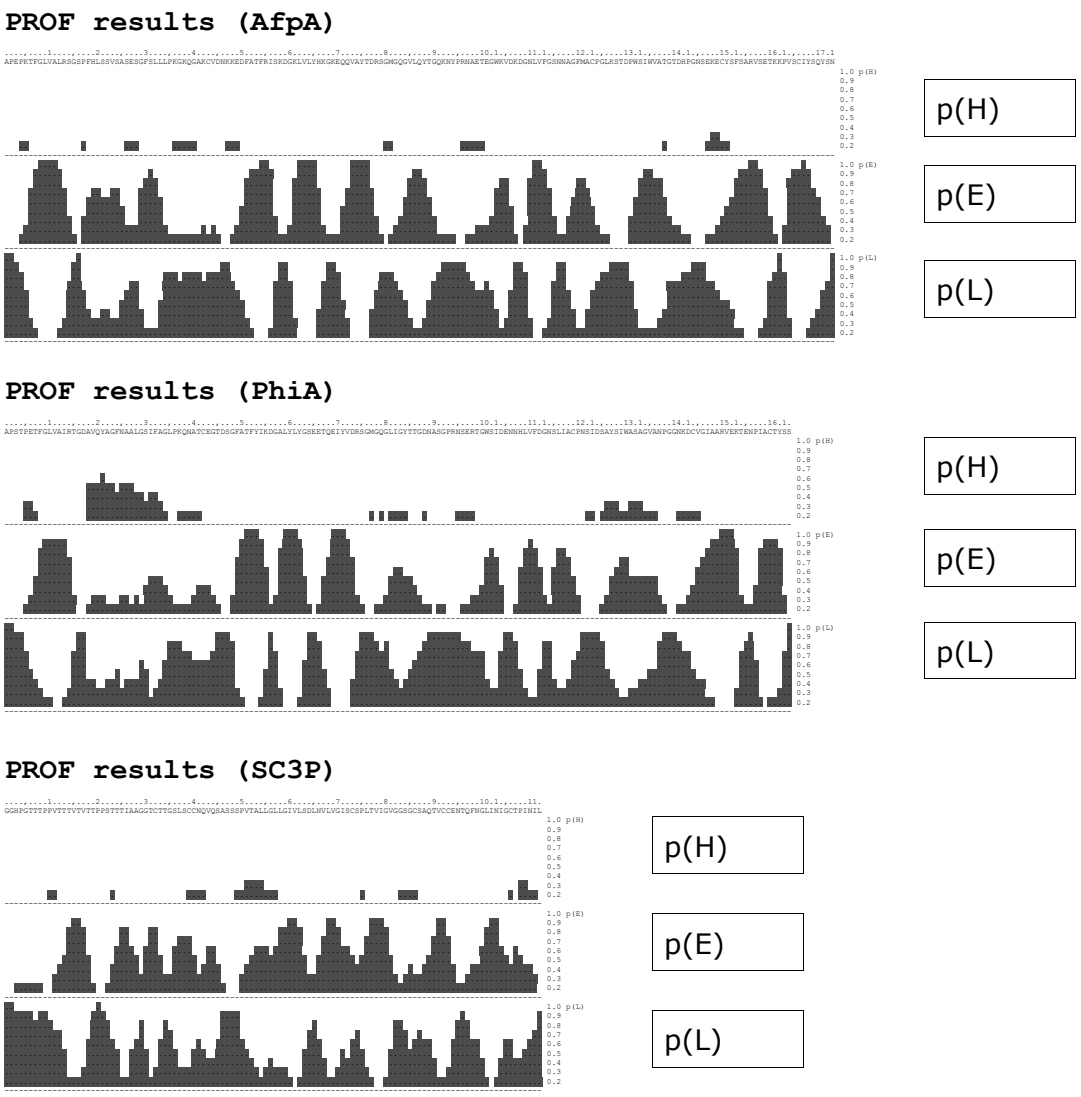

Abbildung 24: Vorhersage der Verteilung von α-Helix, β-Faltblatt und Loopstruktur in AfpA, PhiA und SC3P mit PROFsec-Tool. p(H): Wahrscheinlichkeit für Helix, p(E): Wahrscheinlichkeit für Faltblatt, p(L): Wahrscheinlichkeit für Loopstruktur (1=hoch, 0=niedrig).

Weitere strukturelle Ähnlichkeiten zwischen zunächst AfpA und PhiA ließen sich aus den nach Kyte und Dolittle erstellen Hydrophobizitätsplots ableiten. Die β-Faltblatt-Regionen stellen auch Bereiche hoher Hydrophobizität dar, die durch hydrophile Bereiche getrennt sind (Abbildung 25,26). Die Hydrophobizitätsplots von AfpA und PhiA sind nahezu kongruent, obwohl sich diese Proteine auf Aminosäureebene, abgesehen von konservierten Aminosäuren, durchaus unterscheiden. Darüber hinaus besteht auch bei SC3P ein massiver Wechsel von hydrophilen und hydrophoben Bereichen (Abbildung 27).

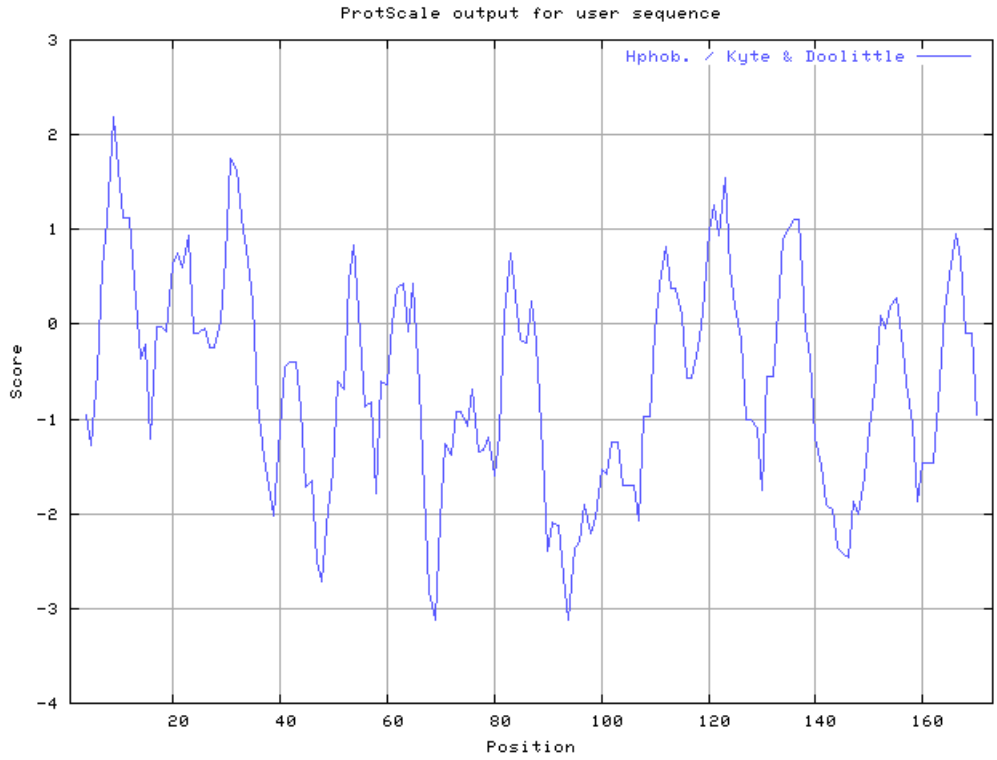

Abbildung 25: Hydrophobizitätsplot von AfpA aus F.culmorum nach Kyte und Dolittle, Fenster 7 Aminosäuren

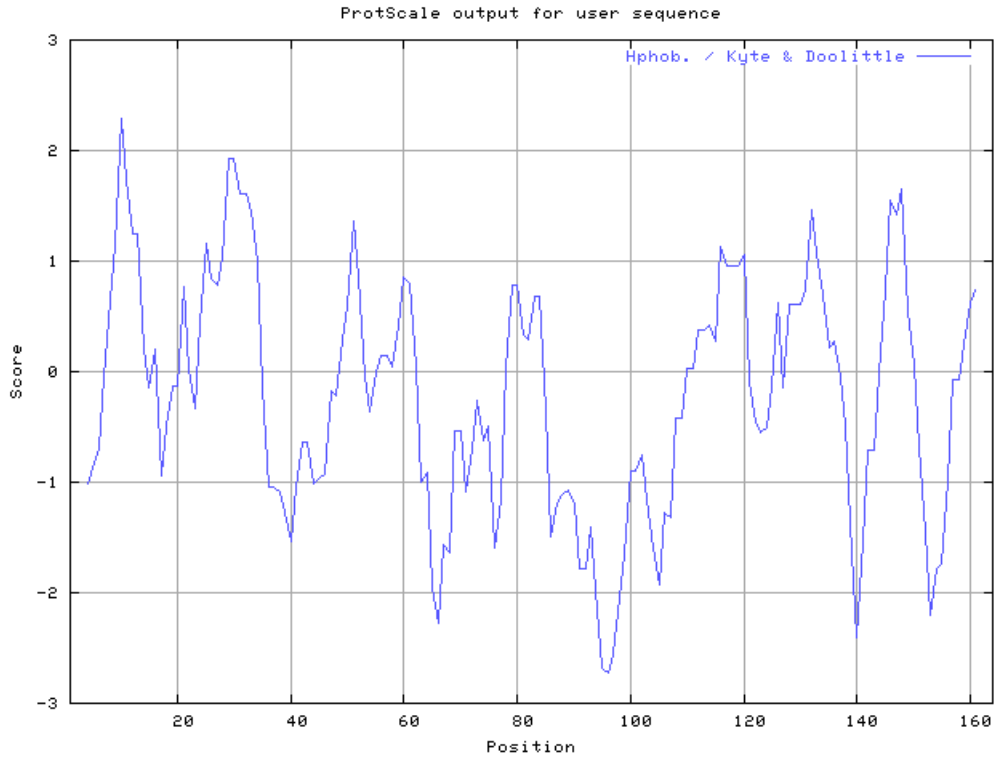

Abbildung 26: Hydrophobizitätsplot von PhiA aus E. nidulans nach Kyte und Dolittle, Fenster 7 Aminosäuren

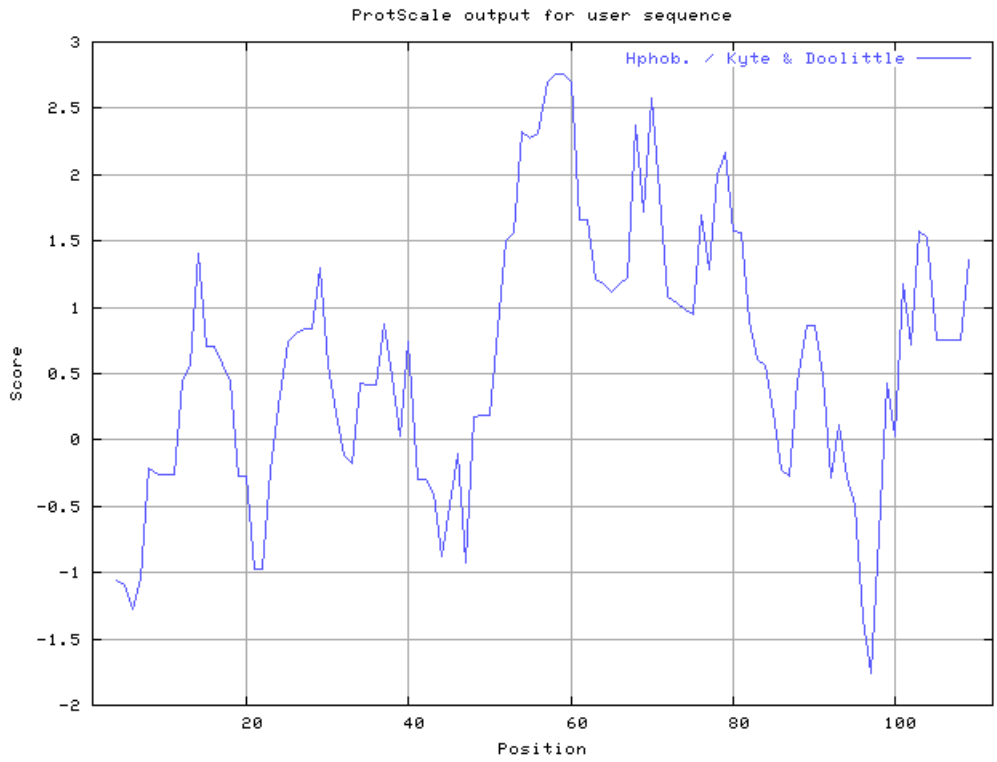

Abbildung 27: Hydrophobizitätsplot von SC3P aus S. commune nach Kyte und Dolittle, Fenster 7 Aminosäuren

3.3.2 Ergebnisse der Edman-Sequenzierung eines sauren, sekretierten Proteins von *F. graminearum* TMW 4.0502

F. graminearum schied ebenso, wie *F. culmorum* Proteine aus, deren pI in dem für Hydrophobine erwarteten sauren pH-Bereich lag. Im Gegensatz zu *F. culmorum* waren bei *F. graminearum* jedoch deutlich mehr Isoformen der Proteine zu finden. YCB-Flüssigmedium in Fernbach-Kolben wurde mit Konidien von *F. graminearum* TMW 4.0502 beimpft. Die Kultur wuchs bei 25 °C und 80 U/min im klimatisierten Inkubator für 7 Tage. Anschließend wurde nach Abtrennung des Myzels eine Ammoniumsulfatfällung der Proteine bis zu 95 % Sättigung durchgeführt. Ein Teil des Präzipitats wurde in 4 M Harnstoff wieder aufgelöst, über eine Entsalzungssäule entsalzt und anschließend mittels präparativer isoelektrischer Fokussierung im pH-Gradienten pH 3-10 getrennt. Die ersten sauren Fraktionen wurden vereinigt und in Amicon-Ultrafiltrationsröhrchen (MWCO 5000 Da) konzentriert.

Mit diesem Material wurden nun zwei Tris-Tricin-Gele beladen und damit das eine enthaltene Protein elektrophoretisch von schwachen Verunreinigungen gereinigt. Eines der Gele wurde anschließend mit kolloidalem Coomassie-Farbstoff (RotiBlue) gefärbt, die gefärbten Banden mehrerer Bahnen ausgeschnitten und zur Sequenzierung interner Peptide übergeben. Tryptischer In-Gel-Verdau und Sequenzierung wurden durch Fa. Prosequenz Bioanalytik, Ludwigsburg, D, durchgeführt. Die Proteine des zweiten Gels wurden per *semi-dry*-Blotting (CHAPS-Methanol-Blotpuffer) auf PVDF-Membran (Immobilon P^{SQ}) transferiert und die Membran nachfolgend mit Coomassie-Farbstoff gefärbt. Der so gefärbte Blot wurde zur N-terminalen Sequenzierung ebenfalls an Prosequenz Bioanalytik eingesandt.

Für den N-Terminus wurde folgende Sequenz festgestellt:

X/A/K TSVF EVKDF TAS X/C I A/C HXTX

Obwohl durch den Verdau nach verlängerter Reaktionszeit mehrere Peptide erzielt und durch chromatographische Methoden getrennt wurden, konnte nur eines der Peptide erfolgreich sequenziert werden:

SNTVG EHFIP XXLNF QN X/E

Eine Datenbank-Recherche in der *F. graminearum*-Gesamtsequenz erbrachte eine Homologie zu einem hypothetischen Protein (fg07807, hypothetical protein, Contig: fg_contig_1.320 / Exons: 92403-92518,92569-92887, über http://mips.gsf.de/genre/proj/fusarium/singleGeneReport.html?entry=fg07807), dessen abgeleitete Aminosäuresequenz im folgenden dargestellt ist. Das Signalpeptid ist kleiner gesetzt, die aus der Edman-Sequenzierung bekannten Fragmente sind kursiv-unterstrichen markiert.

MKFSAATLLAAAASVSA*ATAVFEVKDFTASCIAHST*FCDYEFKVIQPHSMETWEHAVFCNARAQSTDYTLPD
IKDGKCKDSSRTFTVTRGDKGLLVKISQPVSPK*SNTVGEHFIPNSLLFQSE*VPNAEVQMYNGPKDFEFT
QSS

3.3.3 Optimierung der Kulturbedingungen und Entwicklung von Methoden zur Proteinpräparation

Nachdem für *F. culmorum* TMW 4.0111 durch Zerschäumungsanalyse drei oberflächenaktive, aggregierende Proteine identifiziert wurden, war es möglich, die Methoden und Bedingungen der Proteinpräparation zu optimieren. Zunächst wurde festgestellt, dass diese Protein durch Ammoniumsulfatfällung in größerer Menge zu gewinnen sind, als durch Zerschäumung und Präparation aus dem Schaum. Die Fällung fand, wie für kleine Proteine üblich, bei Sättigungen über 50 % statt. In den weiteren Schritten wurde daher mit Ammoniumsulfatfällung bis zu einer relativen Sättigung von 90 % gearbeitet. Bei der Ammoniumsulfatfällung rahmte ein Teil des präzipitierten Proteins auf, da offensichtlich die Dichte des Präzipitats niedriger war, als die Dichte der zu 90 % gesättigten Ammoniumsulfatlösung. Unterschiede im Proteinspektrum des sedimentierenden bzw. aufrahmenden Anteils bestanden nicht, wie der Vergleich der Chromatogramme der Ionenaustauschchromatographie an HiLoad 16/10 Q Sepharose High Performance (Amersham) zeigte (Abbildung 28).

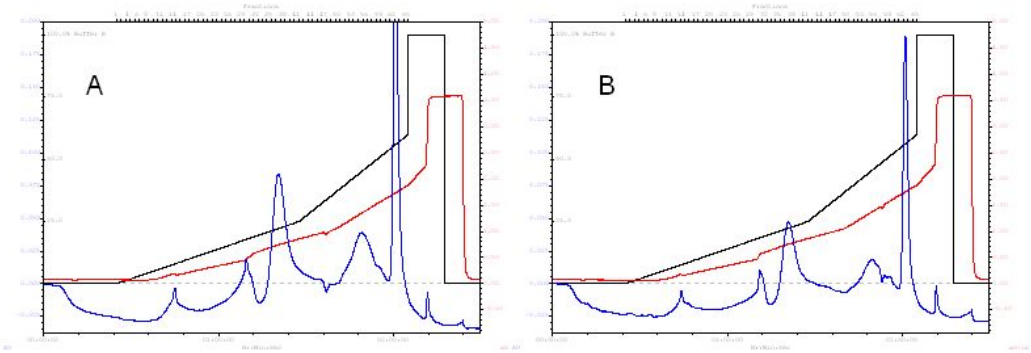

Abbildung 28: Chromatogramme der Ionenaustauschchromatographie des aufrahmenden (A) und sedimentierenden (B) Proteinpräzipitats von F. culmorum TMW 4.0111 (blau: UV-Absorption 280 nm, rot: Leitwert [mS/cm], schwarz: Anteil Elutionspuffer)

Da die Bildung dieser Proteine in Schüttelkulturen nicht völlig stabil war, wurden im nächsten Schritt die Kulturbedingungen zum Erreichen stabiler, hoher Konzentrationen dieser Proteine optimiert. Zu den untersuchten Parameter gehörten die Ammoniumsulfatkonzentration im YCB-Medium, Zugabe von Tongranulat, Lichteinfluß und die Art des für das Medium verwendeten Wassers (Leitungswasser oder entsalztes Wasser). Als optimierte Bedingungen wurden 5 g/L Ammoniumsulfat und der Zusatz von 5 Hydrokultursteinchen (Plantania) je

Fernbach-Kolben, sowie eine Inkubation im abgedunkelten Schüttler für sieben Tage erhalten. Innerhalb von sieben Tagen war der im Medium enthaltene Zucker zum größten Teil verbraucht (Abbildung 29), d.h. die Kulturen waren nach sieben Tagen nahezu am Ende der Wachstumsphase. Die Zuckergehalte wurden enzymatisch bestimmt (D-Glukose-UV-Kit, r-biopharm, nach Vorgaben des Herstellers eingesetzt). Die Optimierung der Kulturbedingungen und die Methodenentwicklung zur chromatographischen Reinigung dieser Proteine wurde vom Autor der vorliegenden Arbeit, sowie im Rahmen einer vom Autor betreuten Diplomarbeit durchgeführt.

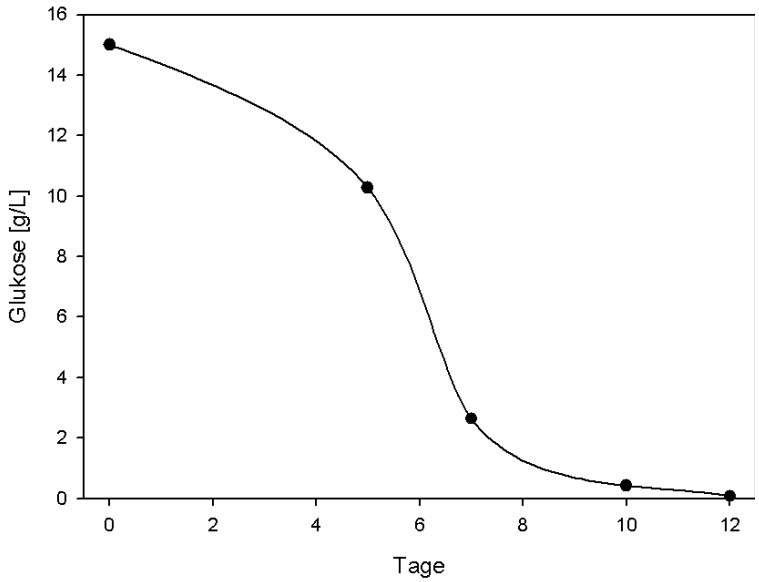

Abbildung 29: Zuckergehalt des YCB-Mediums einer Schüttelkultur von F. culmorum TMW 4.0111 über zwölf Tage

3.3.3.1 Vorversuche für die Reinigung größerer Proteinmengen

Für weitere Untersuchungen der Proteine war die Reinigung größerer Proteinmengen nötig. Dazu wurden Vorversuchen mit unterschiedlichen Chromatographie-Säulen unternommen. Es wurden dabei Anionenaustausch-, Kationenaustausch- und hydrophobe Interaktionschromatographie sowie Gelfiltration verglichen. Die Entsalzung/Umpufferung der Proben wurde in dieser ersten Testphase durch PD 10-Säulen (Amersham) nach Vorschriften des Hersteller bewerkstelligt. Die verwendeten Chromatographiesäulen waren HiTrap-Säulen mit einem Säulenvolumen von 1 mL und stammten aus Testkits der Firma

Amersham Pharmacia Biotech, die Gelfiltrationssäule war HiLoad 16-60 Superdex 75 *prep grade* (Amersham). Chromatographiebedingungen für die HiTrap-Säulen waren: Flußrate 1,00 mL/min, linearer Gradient in 20 mL 0-100 % Elutionspuffer. Bei der Gelfiltration wurde mit einer Flußrate von 0,80 mL/min eluiert.

Säulentyp	Startpuffer	Elutionspuffer
HiTrap Q XL (stark basischer Anionenaustauscher)	20 mM Triethylamin/CO_2 pH 10	20 mM Triethylamin/CO_2 pH 10; 1 M NaCl
HiTrap SP S (stark saurer Kationen-austauscher)	20 mM Citrat pH 3,5	20 mM Citrat pH 3,5; 1 M NaCl
HiTrap Phenylsepharose (hydrophobe Interaktion)	50 mM $NaPO_4$ pH 7,5; 1,5 M $(NH_4)_2SO_4$	50 mM $NaPO_4$ pH 7,5
HiLoad 16-60 Superdex 75pg (Gelfiltration)	50 mM Citrat,pH 7,5; 0,15 M NaCl	

Im Vergleich der vier chromatographischen Verfahren ließ sich eine gute Trennung der Proteine durch Anionenaustauschchromatographie bewerkstelligen. Es fiel auf, dass bei der Kationenaustauschchromatographie, der hydrophoben Interaktionschromatographie und auch bei der Gelfiltration insgesamt weniger Protein eluierte, als bei der Anionenaustausch-Chromatographie. Der fehlende Anteil war nach der Elution noch immer an der Säule gebunden und ließ sich erst durch Spülen mit 1 M NaOH entfernen.

Mit Anionenaustauschchromatographie war es möglich, alle drei Proteine in nur einem Arbeitsschritt zu trennen. Es wurde daher für den folgenden Verlauf der Arbeit eine Hochleistungs-Anionenaustauschsäule HiLoad 16/10 Q-Sepharose HP (Amersham) verwendet. Mit dieser Trennsäule sollte die Trennleistung verbessert und außerdem die Menge der gewonnenen Proteine gesteigert werden. Die Protein-Bindekapazität der Säule beträgt ca. 600 mg. Um die Leistung dieser Trennsäule voll ausnutzen zu können, waren größere Mengen von entsalztem Protein nötig, als die Entsalzung mittels PD 10-Säulen liefern konnte. Es wurde daher zusätzlich eine präparative Entsalzungssäule, HiPrep 26/10 Desalt (Amersham), eingesetzt, auf der je Lauf 5 mL Probe entsalzt werden konnten. Für die weitere Verwendung der isolierten Proteine war es von Vorteil, dass das verwendete Puffersystem Triethylamin/CO_2 flüchtig ist und daher ggf. beim Lyophilisieren entfernt werden

konnte.

3.3.3.2 Entsalzung mit der präparativen Entsalzungssäule HiPrep 26/10 Desalt

Da die Proteine aus den Kulturen durch Ammoniumsulfatfällung abgetrennt wurden, war nach dem erneuten Lösen ein für ionenchromatographische Verfahren zu hoher Salzgehalt in den Proben. Auf Dialyse sollte wegen der Unsicherheit des Vorgangs, des Aufwandes und der Gefahr der Adsorption der Proteine an den Dialyseschlauch verzichtet werden. Die Verwendung der präparativen Entsalzungssäule HiPrep 26/10 Desalt (Amersham) ermöglichte es, eine für die Hochleistungs-Anionenaustauschersäule adäquate Menge an entsalztem, umgepuffertem Protein bereitzustellen. Pro Lauf konnten ca. 0,2 g Protein entsalzt werden. Da in der Regel drei Läufe in Folge durchgeführt wurden, wurden 0,7 g Präzipitat über Nacht in 15 mL entsalztem Wasser gelöst. Nach Zentrifugation für 15 min bei 25000 x g wurden 5 mL des Überstandes in die Probenschleife der FPLC-Anlage injiziert und das Entsalzen fand nach dem in dieser Arbeit beschriebenen Protokoll statt. Der Verlauf der UV-Absorptionskurve als Maß für die Konzentration der Proteine, sowie der Leitwert sind in Abbildung 30 exemplarisch dargestellt. Durch manuelles Auffangen des deutlich vom Salzpeak isolierten Proteinpeaks war es damit möglich, völlig umgepufferte Proteinlösungen für die Chromatographie bzw. präparative isoelektrische Fokussierung zu erhalten.

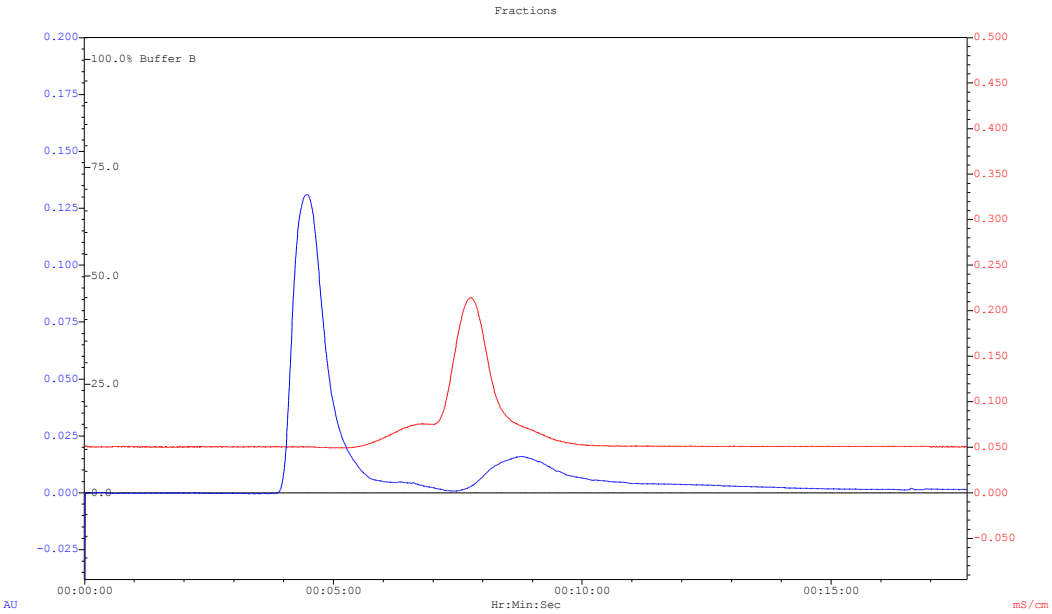

Abbildung 30: Chromatogramm der Entsalzung des gelösten Proteinpräzipitats von F. culmorum TMW 4.0111 mit HiPrep 26/10 Desalt (blau: UV-Absorption 280 nm, rot: Leitwert [mS/cm])

3.3.3.3 Reinigung der pilzlichen Proteine durch Anionenaustausch-Chromatographie

Die Verwendung einer Hochleistungs-Anionenaustauschersäule HiLoad 16/10 Q Sepharose High Performance (Amersham) konnte durch höhere Kapazität (Bettvolumen 23 mL) die Menge und aufgrund besserer Trennleistung auch die Reinheit der fraktionierten Proteine gegenüber den HiTrap-Testsäulen steigern. Als Puffersystem wurde 20 mM Triethylamin/CO_2 pH 10,0 eingesetzt. Der Elutionspuffer enthielt zusätzlich 1,0 M NaCl. In einem ersten Versuch wurden die auf der Säule gebundenen Proteine mit einem linearen Gradienten von 0-60 % Elutionspuffer eluiert. In Abbildung 31 ist das zugehörige Chromatogramm dargestellt.

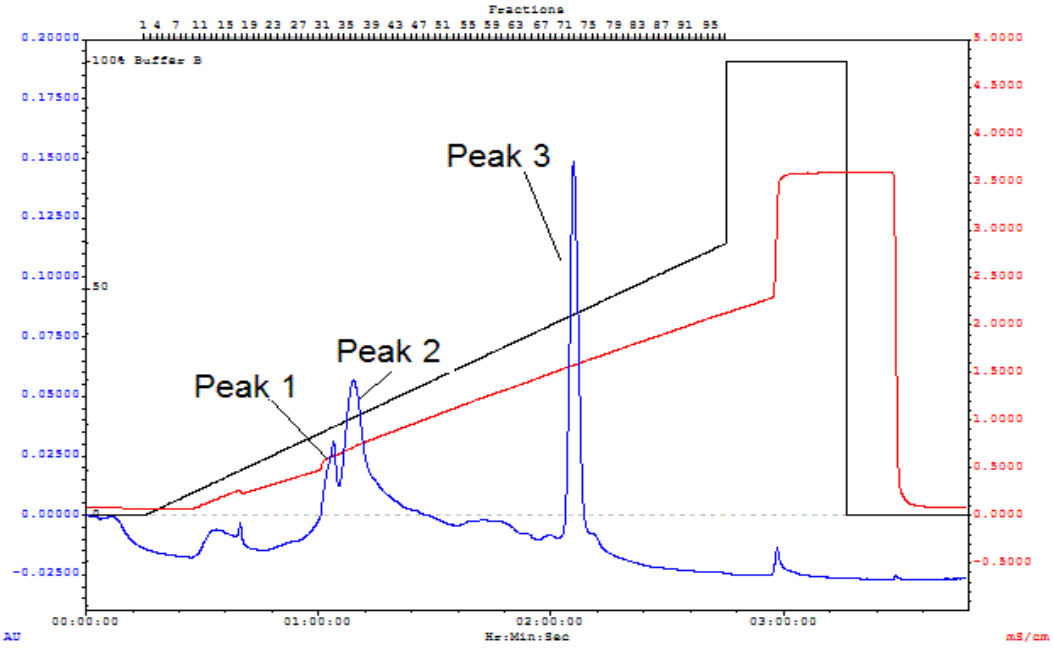

Abbildung 31: Anionenaustauschchromatographie des gefällten und entsalzten Proteins von F. culmorum TMW 4.0111 mit HiLoad 16/10 Q Sepharose HP, eluiert im linearen Gradienten 0-60 % Elutionspuffer (blau: UV-Absorption 280 nm, rot: Leitwert [mS/cm], schwarz: Anteil Elutionspuffer am Eluenten)

Das Eluat wurde in 1 mL-Fraktionen durch den Fraktionensammler gesammelt. Das Chromatogramm zeigt im wesentlichen drei Peaks, die zentralen Bereiche dieser Peaks wurden abgenommen und unverdünnt mittels Gelelektrophorese in Tris-Tricin-Gel untersucht. In Abbildung 32 ist das silbergefärbte Gel mit einzelnen Fraktionen der Trennung dargestellt. Es ist darin ersichtlich, dass die drei Peaks den drei Zielproteinen zuzuordnen sind. In Fraktion 32 (Peak 1) findet sich ein Protein mit ca. 17 kDa (AfpB), in Fraktion 36 (Peak 2) ein 20 kDa (AfpA) und in Fraktionen 72/73 (Peak 3) ein 14 kDa großes Protein.

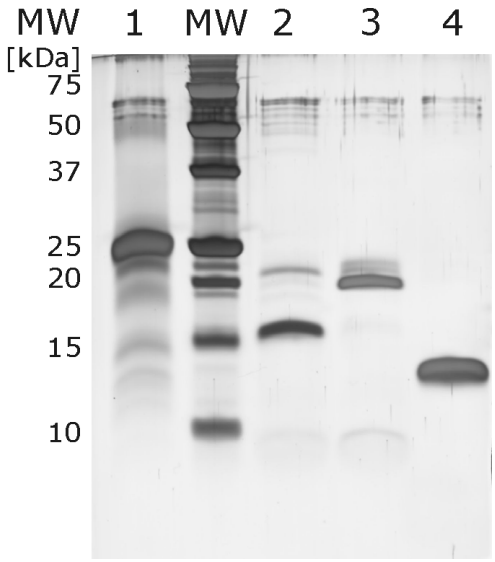

Abbildung 32: Silbergefärbetes SDS-Gel der Hauptfraktionen der Proteine von F. culmorum TMW 4.0111 nach Trennung auf HiLoad 16/10 Q Sepharose HP.
1: Trypsinogen 2000 ng; MW: Größenstandard, 2: Fraktion 32, 17 kDa (AfpB), 3: Fraktion 36, 20 kDa (AfpA), 4: Fraktionen 72+73, 14 kDa

In Bahn 2 ist eine leichte Verunreinigung von AfpB mit einem Protein von etwa 20 kDa zu erkennen. Als Reaktion darauf wurde für zukünftige Läufe das Standardprotokoll so abgeändert, dass mit einem zweiteiligen Gradienten eluiert wurde. Im Bereich dieser dicht beieinander liegenden Peaks wurde mit einem flacheren Gradienten eluiert, dadurch konnten die beiden Peaks voneinander getrennt werden. Im Bereich des 14 kDa-Protein wurde mit einem steileren Gradienten eluiert, da dieses Protein gut von den Begleitproteinen abgesetzt ist. Abbildung 33 zeigt das Chromatogramm einer solchen Trennung. Die Chromatographie mit zwei verschiedenen Gradienten erfolgte nach dem im Methodenteil angegebenen Protokoll. Man erkennt im Vergleich zu Abbildung 31 eine deutlich bessere Trennung der beiden Peaks von AfpA und AfpB bis nahe an die Basislinie.

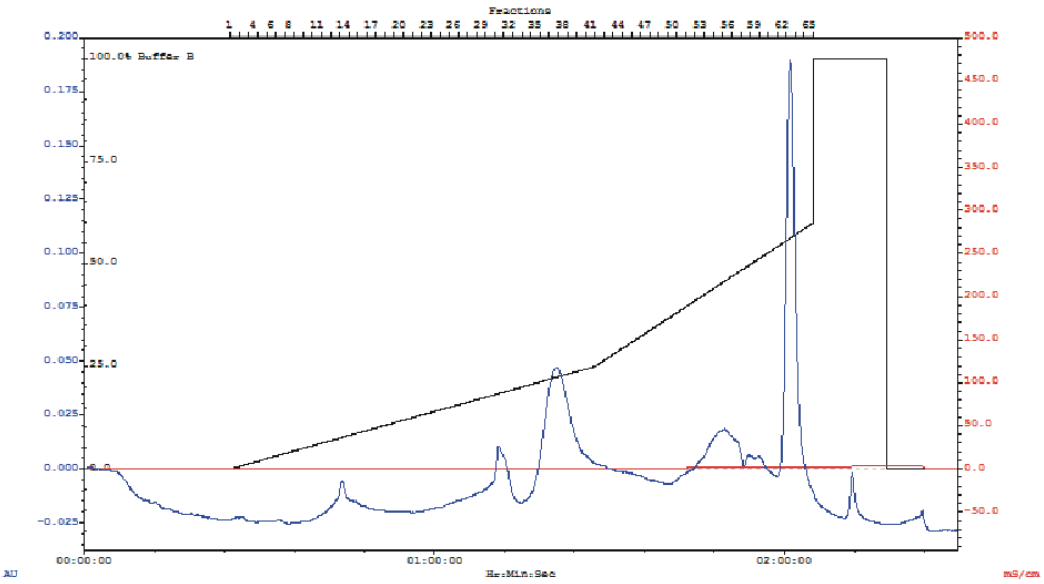

Abbildung 33: Verbesserung der Trennung des gefällten und entsalzten Proteins von F. culmorum TMW 4.0111 mit HiLoad 16/10 Q Sepharose HP durch Elution mit zwei linearen Gradienten 0-25 % und 25-60 % Elutionspuffer (blau: UV-Absorption 280 nm, rot: Leitwert [mS/cm], schwarz: Anteil Elutionspuffer am Eluenten)

3.3.4 Bildung von Filmen durch die oberflächenaktiven Proteine von *F. culmorum* TMW 4.0111

Untersuchungen zur Bildung von Oberflächenfilmen aus den Proteinen von *F. culmorum* konnten erfolgreich durchgeführt werden. Eine entsalzte Lösung der Proteine aus dem Stamm TMW 4.0111 wurde in *Amicon Centriprep Concentrators* (MWCO 3 kDa) aufkonzentriert. Bei der Durchströmung der Membran wurden die Proteine zurückgehalten und konnten aggregieren. Dabei bildete sich ein stabiler, makroskopisch sichtbarer Proteinfilm, der sich in wässrigem Milieu nicht wieder auflösen ließ. Dieser Proteinfilm war weiterhin in einer Lösung mit 4 % SDS stabil und konnte während einer thermischen Behandlung über 17 min bei 85 °C in 4 % SDS weder aufgelöst noch koaguliert werden. Der Film war jedoch in 8 M Harnstoff löslich und zeigte nach Gelelektrophorese Banden des 14 kDa großen Proteins und von AfpB (vgl. Abbildung 34, Bahn 2). Dies zeigte, dass die Bildung von Aggregaten nicht nur ein Protein selektiv betreffen kann, sondern Mischaggregate durchaus möglich und stabil sind. Die Stabilität des Films in heißer SDS-Lösung und seine Unlöslichkeit in wässrigem Milieu entsprechen ebenfalls dem von

Hydrophobinen erwarteten Verhalten.

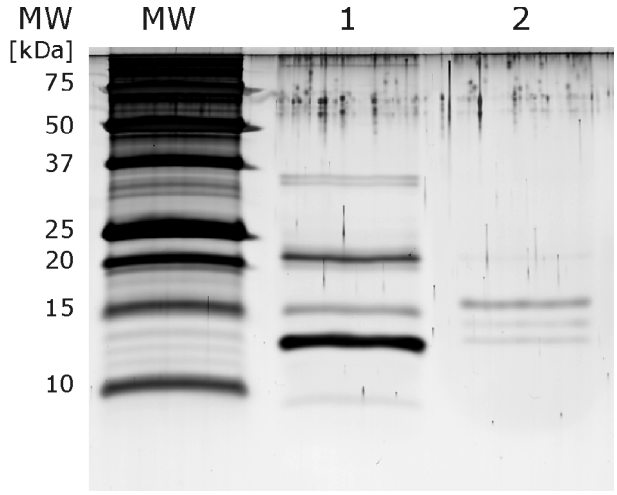

Abbildung 34: SDS-PAGE eines filmartigen Aggregats aus von F. culmorum TMW 4.0111 ausgeschiedenen Proteinen, das beim Durchströmen einer Membran mit 5 kDa MWCO gebildet wurde.
MW: Molekulargewichtsmarker, 1: Proteine der Flüssigphase, 2: Proteine im aufgelösten Proteinfilm

3.4 Beeinflussung von Gushing durch von *F. culmorum* TMW 4.0111 ausgeschiedene Proteine

Zur Untersuchung ihres Einflusses auf das Gushing von Bier wurden die drei gereinigten Proteine aus *F. culmorum* TMW 4.0111 einzeln und in Mengen von 0,5 mg/Flasche (= 1 mg/L für 14 kDa bzw. AfpA) und 0,12 mg/Flasche (AfpB) in ein Bier mit leichtem Gushing-Potential (untergäriges helles Lagerbier, Überschäumvolumen 29 mL) eingesetzt. Die so behandelten Flaschen und Kontrollflaschen wurden für 48 h bei 28 rpm bei Raumtemperatur über Kopf geschüttelt (vom Autor umgebauter Akita-Betonmischer, vgl. 2.2.21). Nach einer einstündigen Pause wurden die Flaschen geöffnet und das Überschäumvolumen (im weiteren „ÜSV") bestimmt. In diesem Zusammenhang wurden auch die Auswirkungen des Würzekochprozesses in Form einer Reaktion der Proteine mit reduzierenden Zuckern, hier Maltose als Hauptbestandteil der Würzezucker, auf die Proteine und ihren Einfluss auf Gushing untersucht. Dazu wurden die Proteine in einer Maltoselösung (2 %, w:v, Proteinkonzentration ca. 1 mg/mL) gelöst und 60 min bei 95 °C inkubiert. Die so behandelten Proteine wurden ebenfalls in den

genannten Mengen in das Bier gegeben. Dabei stellte sich heraus, das Protein mit 14 kDa und AfpA das ÜSV deutlich erhöhten (ÜSV 55 bzw. 43 mL). Zudem wurde bei dem Protein mit 14 kDa und AfpA dieser Effekt durch die thermische Behandlung in Gegenwart von Maltose nochmals massiv verstärkt (ÜSV 100 mL bzw. 91 mL). Der Zusatz proteinfreier Maltose-Lösung ins Bier veränderte das Überschäumvolumen dagegen nicht (ÜSV 29 mL). Das 17 kDa-Protein veränderte in unmodifizierter bzw. maltose-behandelter Form das ÜSV nur geringfügig. Damit konnte festgestellt werden, dass mindestens zwei der drei präparierten Proteine bereits in geringster Menge (um 1 ppm) einen gushing-verstärkenden Effekt haben, der sich bei thermischer Behandlung mit reduzierendem Zucker nochmals verstärkt. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Abbildung 35 dargestellt. Gushing-stabile Biere konnten jedoch durch diese Behandlung nicht zu Gushing angeregt werden. Dies legt nahe, dass zur Auslösung von Gushing die An- oder Abwesenheit weiterer Faktoren nötig ist.

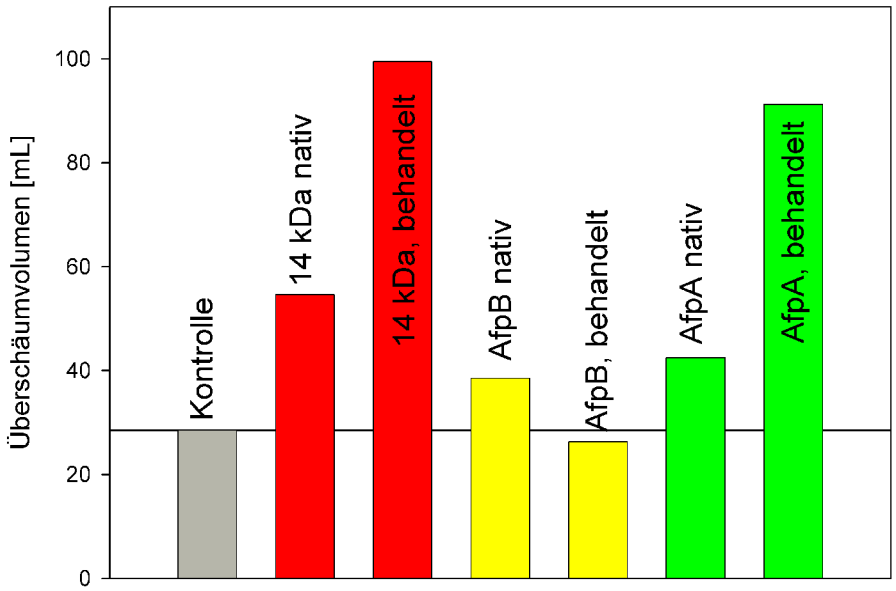

Abbildung 35: Beeinflussung von Gushing durch die Proteine von F. culmorum TMW 4.0111 ohne und mit Modifikation durch thermische Behandlung mit Maltose

3.5 Untersuchungen von Proteinen von *Fusarium* spp. mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese

3.5.1 Charakterisierung der oberflächenaktiven Proteine von *F. culmorum* TMW 4.0111

Mit dem Ziel einer chemisch-physikalischen Charakterisierung der drei oberflächenaktiven Proteine aus *F. culmorum* TMW 4.0111 wurden die isoelektrischen Punkte mittels 2D-Gelelektrophorese bestimmt (Abbildung 36). Im Zuge dieser Arbeiten wurde auch die Bildung von Maillard-Produkten aus der Reaktion dieser Proteine mit Maltose durch die oben beschriebene thermische Behandlung untersucht. Für das 14 kDa-Protein ergab sich ein pI von etwa 3,5. Ein pI in diesem Bereich ist wiederum typisch für Hydrophobine und auch für früher in der Literatur beschriebene Gushing-Faktoren, bei denen es sich um kleine, saure Proteine handelte, die jedoch zum damaligen Zeitpunkt nicht weiter untersucht werden konnten (Weidenender 1992, Amaha 1973, Amaha & Kitabatake 1981). Die isoelektrischen Punkte der Proteine mit 17 kDa (AfpB) bzw. 20 kDa (AfpA) betrugen ca. pH 9 im Rahmen der Linearität der IPG-Streifen. Sie lagen, ähnlich wie ns-LTPs und LTP1500, im stark basischen Bereich. Dies legte nahe, dass auch basische pilzliche Proteine am Phänomen des Gushings beteiligt sein können. Der Wechsel des Gelsystems von Tris-Tricin-Gelen bei eindimensionaler Gelelektrophorese zu einem für 2D-GE geeigneten Geltyp bedingte eine geringfügig andere Position der Proteine gegenüber dem Molekulargewichtsmarker bei 2D-GE.

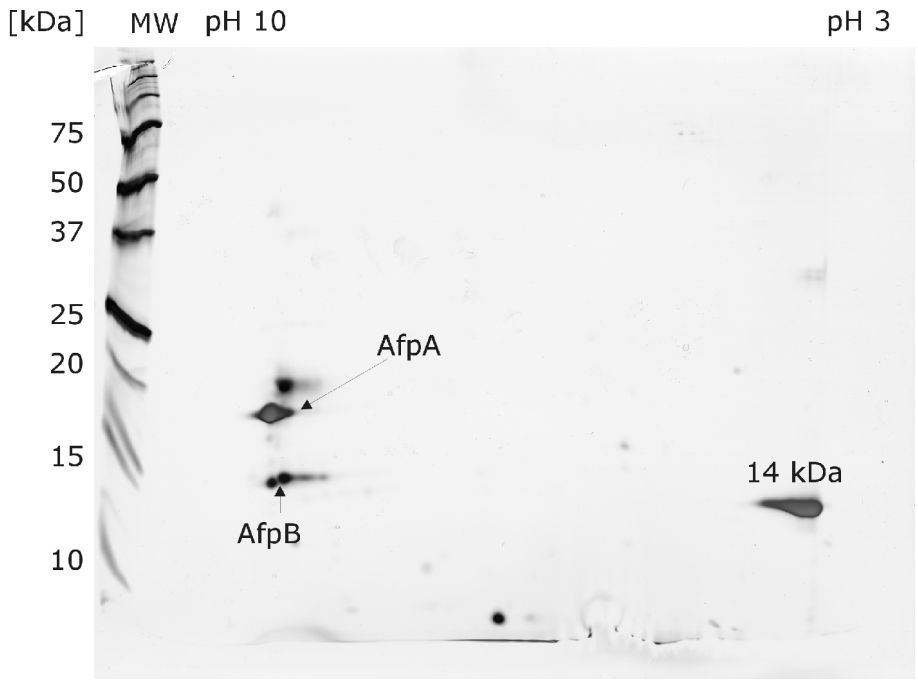

Abbildung 36: 2D-Gel der nativen sekretierten Proteine (Exoproteom) von F. culmorum TMW 4.0111, Linearer IPG-Streifen pH 3-10 und Silberfärbung.

Weiterhin konnte für das Protein mit 14 kDa und, besonders deutlich, AfpA eine Veränderung des Musters im 2D-Gel durch thermische Behandlung mit wässriger Maltoselösung belegt werden. Durch die Reaktion der Proteine in der heißen Maltoselösung entstanden aus einem Proteinspot mehrere im pI-Wert verschobene Spots (Abbildungen 37 und 38). Dies kann durch Maillardreaktion bzw. Desaminierung erfolgen, jedoch zeigte AfpA in keine Verschiebung des pI nach Erhitzung in reinem Wasser (Daten hier nicht gezeigt). Bei der Maillard-Reaktion ändert sich durch die kovalente Kopplung des polaren Zuckers auch die Polarität des gesamten Moleküls. In beiden Fällen liegt jedoch mindestens eine Veränderung des pI durch die vorhergehende Behandlung vor, so dass hierin eine mögliche Erklärung für die Veränderung des Überschäumvolumens in dem oben beschriebenen Versuch vorliegt. AfpB trat dagegen bereits im nativen Zustand in Isoformen auf, wodurch sich sein indifferentes Verhalten beim Zusatz mit Maltose erhitzter und nativer Proben zu Gushingbier erklären ließe.

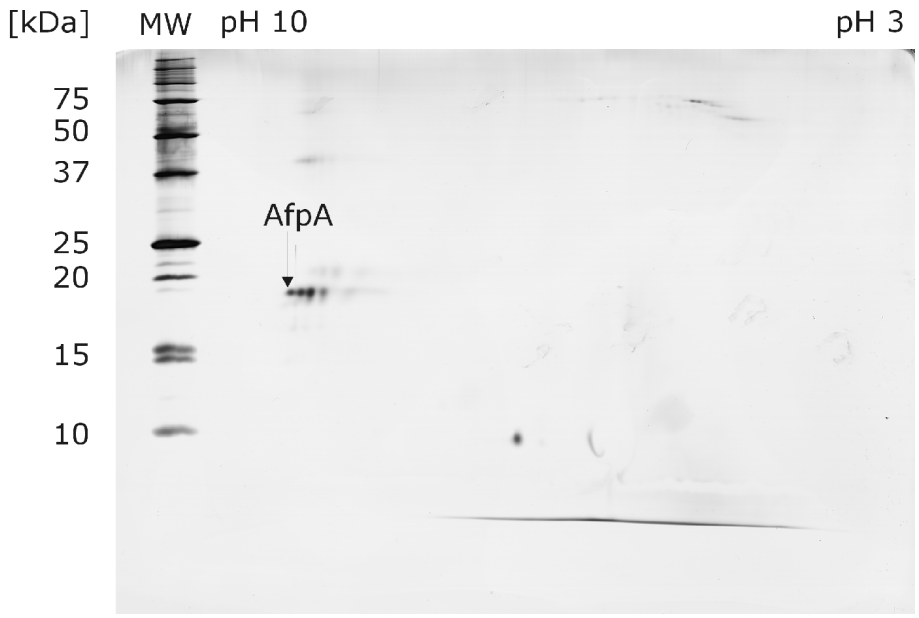

Abbildung 37: Isoelektrische Polymorphismen von AfpA aus F. culmorum TMW 4.0111 nach thermischer Behandlung mit Maltose. Linearer IPG-Streifen pH 3-10 und Silberfärbung.

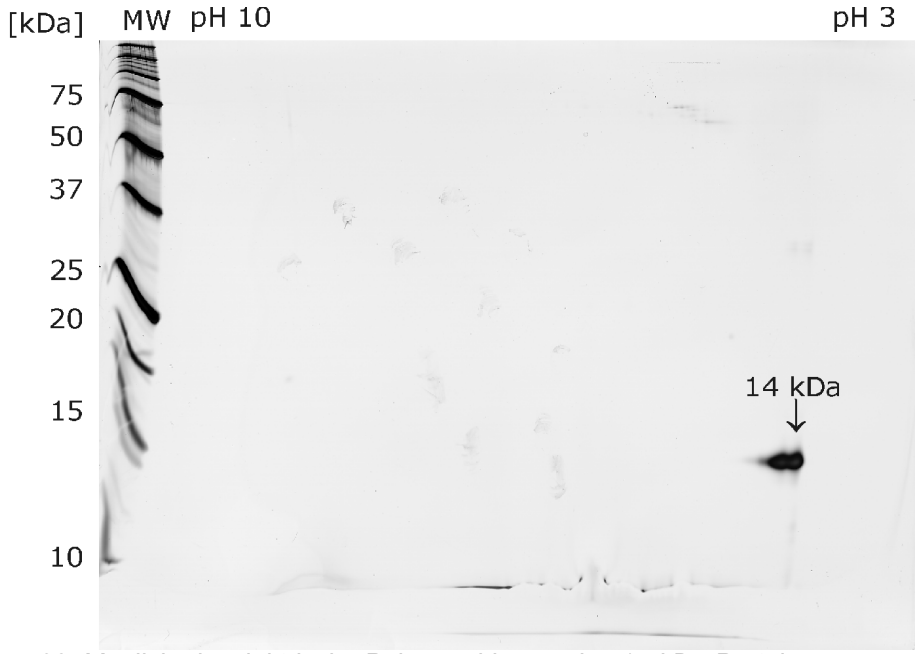

Abbildung 38: Mögliche isoelektrische Polymorphismen des 14 kDa-Proteins aus F. culmorum TMW 4.0111 nach thermischer Behandlung mit Maltose. Linearer IPG-Streifen pH 3-10 und Silberfärbung.

3.5.2 Thermische Behandlung von 14 kDa-Protein und AfpA mit synthetischer Würze

Die Auswirkungen einer thermischen Behandlung dieser Proteine wurden unter Bedingungen, die denen der Würzekochung möglichst nahekommen, untersucht. Es war nicht möglich, die aus dem Malz stammenden Proteine z.B. aus Vorderwürze zu entfernen, um lediglich die Zuckeranteile zu gewinnen. Daher wurde synthetische Würze hergestellt, die die charakteristische Konzentrationen der Zucker und organischen Säuren enthielt (vgl. 2.1.3.10). Die Gehalte an unterschiedlichen Zuckern orientierten sich dabei an den Angaben von Narziß (1995), die Konzentrationen der organischen Säuren an MEBAK III (1996, S. 87-88). Lediglich Maltotriose wurde nicht verwendet, da dieser Zucker nicht in den nötigen Mengen beschafft werden konnte.

AfpA und 14 kDa-Protein aus *F. culmorum* TMW 4.0111 wurden einer thermischen Behandlung mit dieser synthetischen Würze unterzogen. Es wurden je 0,5 mg der gereinigten Proteine im gleichen Ansatz (500 µL) mit synthetischer Würze bei pH 5,5 für 60 min bei 95 °C behandelt. Anschließend wurde 2D-Gelelektrophorese durchgeführt. Das 2D-Gel (Abbildung 39) zeigte im wesentlichen die gleichen Effekte wie bei der Behandlung mit Maltose. Es entstand wiederum eine Kette von Proteinspots.

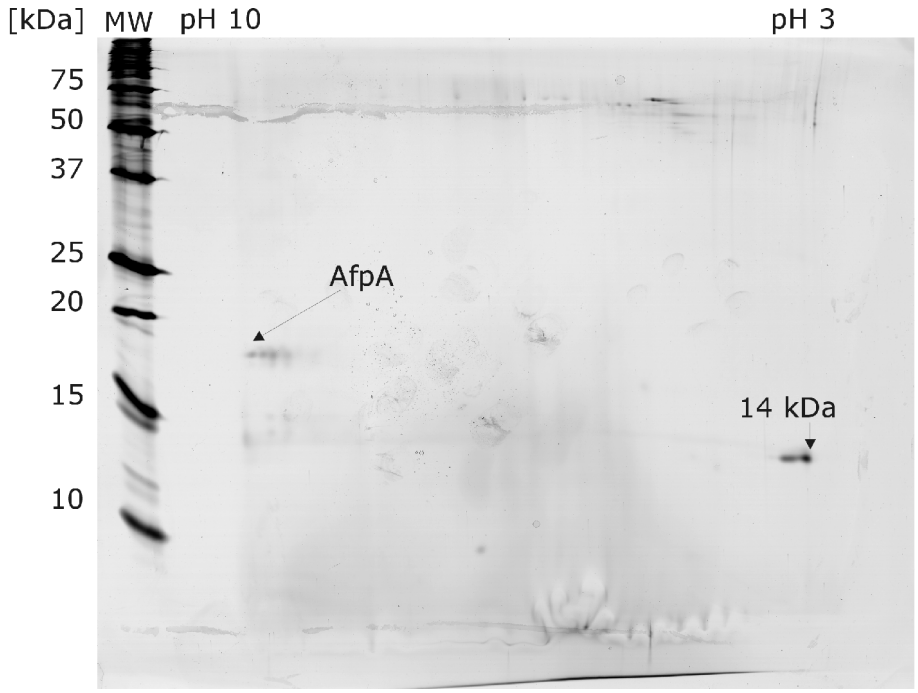

Abbildung 39: Isoelektrische Polymorphismen von 14 kDa-Protein und AfpA aus F. culmorum TMW 4.0111 nach thermischer Behandlung in synthetischer Würze. Linearer IPG-Streifen pH 3-10 und Silberfärbung

3.5.3 Reaktion der Proteine von *F. culmorum* TMW 4.0111 mit Maltose unter forcierten Bedingungen

Die von *F. culmorum* TMW 4.0111 ausgeschiedenen Proteine wurden für eine Stunde bei 95 °C in 12 % (w:v) Maltose, 50 mM Natriumphosphat-Puffer, pH 6,0 behandelt (Proteinkonzentration ca. 1 mg/mL). Danach wurden die Proteine auf einem linearen IPG-Streifen pH 3-10 fokussiert und mittels SDS-PAGE nach ihrer Größe getrennt. Dabei war eine starke Modifikation der Proteine zu beobachten: Ein Anteil des 14 kDa-Proteins wurde um ca. 1,4 pH-Einheiten auf pH 4,8 verschoben, bei den basischen Proteinen (ca. pI 9) traten Spots bis in den Neutralbereich (AfpA) und bis in sauren pH (AfpB) auf, wobei auch das Molekulargewicht dieser Spots zunahm (Abbildung 40). Die Zunahme des Molekulargewichts deutet zusammen mit der Verschiebung des pI-Wertes auf einen massiven Einfluss der Maillardreaktion hin. Ähnliche Auswirkungen konnten für LTP1500 in Weizenbieren festgestellt werden (persönliche. Mitteilung Dr. Dieter Hecht, Lehrstuhl für Phytopathologie, Weihenstephan und Zapf *et al.* 2005).

Weiterhin ergibt sich eine strukturelle Ähnlichkeit dieser künstlich induzierten Modifikationen zu den in Abbildung 41 gezeigten Isoformen der von *F. graminearum* ausgeschiedenen Proteine.

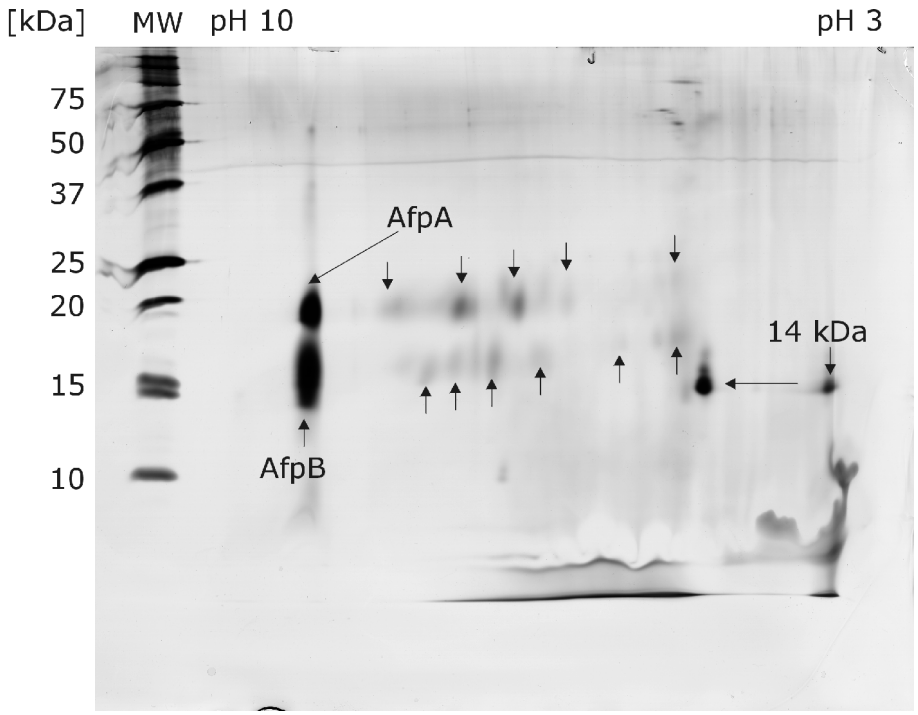

Abbildung 40: Modifikation der Proteine von F. culmorum durch Behandlung in 50 mM Phosphatpuffer pH 6,0, 12 % Maltose für 1,0 h bei 95 °C. Die Pfeile deuten die Veränderung der Proteinspots an.

3.5.4 Untersuchung des Exoproteoms von *F. graminearum*-Isolaten

Kulturen von *F. graminearum*-Isolaten wurden in der für *F. culmorum* beschriebenen Weise in Fernbach-Kolben mit YCB-Medium durchgeführt. Auch hier betrug die Kulturdauer sieben Tage bei 25 °C, 80 U/min. Die durch die Pilze ausgeschiedenen Proteine wurden durch Ammoniumsulfatfällung präzipitiert. Anschließende 2D-Gelelektrophorese zeigte eine strukturelle Ähnlichkeit des Exoproteoms von *F. graminearum* zu *F. culmorum* durch das Vorhandensein von Proteinen ähnlichen pIs bei ähnlicher Größe: stark basische Proteine mit Größen unter 25 kDa, sowie teilweise saure Proteine um ca. 15 kDa. Auffällig ist jedoch die deutlich größere Modifikation der Proteine in Form von isoelektrischen

Polymorphismen: von nahezu jeden Protein scheinen mehrere Isoformen ausgeschieden zu werden (Abbildung 41). Weiterhin war auffällig, dass ein gewisser Anteil der untersuchten Isolate keine sauren Proteine ausscheidet (Abbildung 42). Isolate ohne Ausscheidung von sauren Proteinen wiesen meist auch im Parafilm-Schnelltest eine schlechtere Benetzung des an sich hydrophoben Parafilms auf, als solche Isolate mit Ausscheidung von sauren Proteinen (vgl. Tabelle 14).

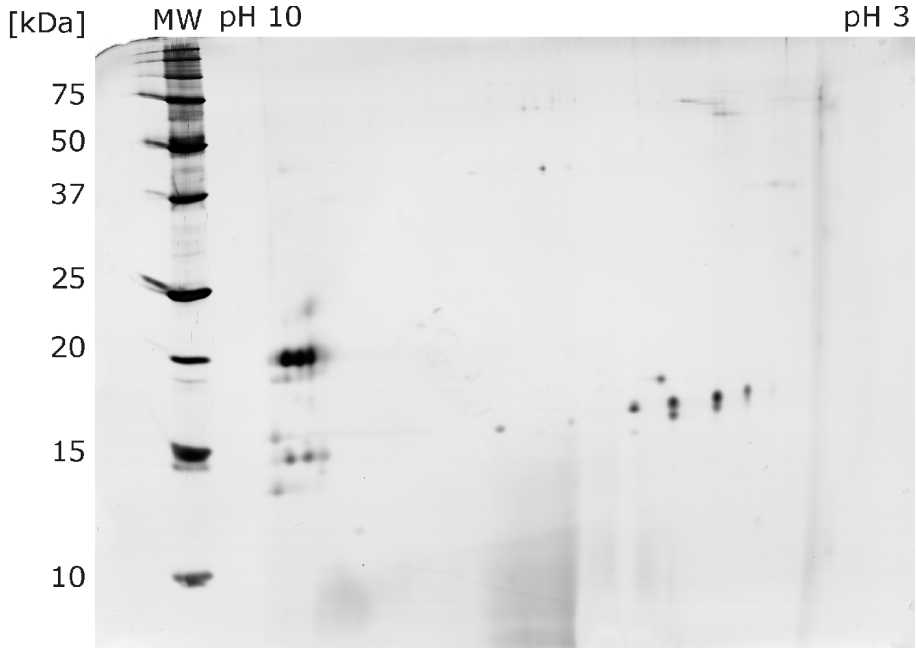

Abbildung 41: Exoproteom von F. graminearum TMW 4.0502, linearer IPG-Streifen pH 3-10 und Silberfärbung

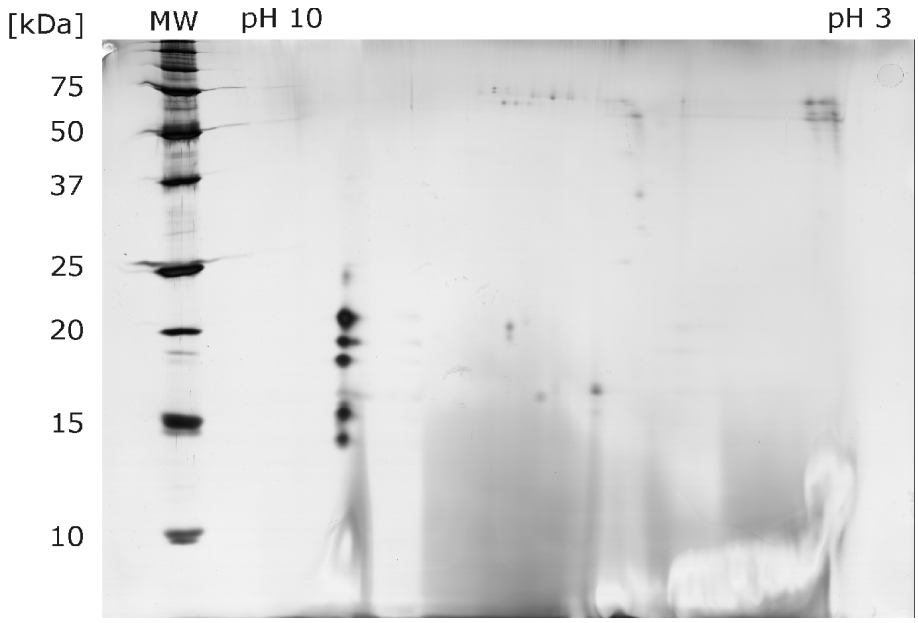

Abbildung 42: Exoproteom vonF. graminearum TMW 4.0503, linearer IPG-Streifen pH 3-10 und Silberfärbung

Tabelle 14: Verhalten unterschiedlicher Stämme von F. graminearum im Parafilm-Schnelltest und Spektrum gebildeter Proteine

Stamm	Benetzung auf YCB	Benetzung auf ME	stark basische Proteine (ca. 15-20 kDa)	stark saure Proteine (ca. 15 kDa)
4.0122	++	+	+	+
4.0169	++	+	+	+
4.0186	-	+	+	-
4.0502	-	+	+	+
4.0503	-	+/-	+	-
4.0505	-	+/-	+	-
4.0506	+	+	+	+
4.1555	-	+/-	+	+/-

3.6 Präparative isoelektrische Fokussierung

Die präparative isoelektrische Fokussierung wurde als Alternative zur Anionenaustausch-Chromatographie eingesetzt, da sich im Laufe der Arbeit herausstellte, dass die durch Chromatographie erzielbaren Proteinmengen, Milligramm-Mengen je Lauf, für weitere Versuch zu gering waren. Weiterhin neigten die Proteine aus *F .culmorum* TMW 4.0111 zur irreversiblen Aggregation auf der Ionentauschermatrix. Dieser Effekt ist möglicherweise auf die durch die Adsorption an den Ionentauscher lokal erhöhte Konzentration dieser Proteine zurückzuführen, wobei dann ab einer bestimmten Oberflächenbelegung stabile Aggregation eintreten müßte. Bei der präparativen isoelektrischen Fokussierung werden Proteine dagegen trägerfrei in einem nur durch Membranen kompartimentierten pH-Gradienten in Flüssigphase getrennt. Der pH-Gradient wird über die Zugabe eines geeigneten Ampholyten und die saure bzw. basische Elektrolytlösung erzielt. Für die Trennung der Proteine aus *F .culmorum* TMW 4.0111 wurde ein Ampholyt für den Bereich pH 3-10 eingesetzt. Zur Fokussierung wurde eine Rotofor®-Anlage (Bio-Rad) mit 60 mL Kapazität eingesetzt (Abbildung 43).

Abbildung 43: Zur präparativen isoelektrischen Fokussierung von Proteinen aus Fusarium spp. verwendete Rotofor-Zelle (Bio-Rad) mit Spannungsquelle

Um einer Aggregation der Proteine aus *Fusarium* ssp. vorzubeugen wurde die Fokussierung in 4 M Harnstoff durchgeführt. Mit diesem Verfahren konnten je Lauf ca. 100 mg reines saures Protein (14 kDa) von *F .culmorum* TMW 4.0111 gewonnen werden, eine weitere Trennung der basischen Proteine konnte mit diesem Verfahren wegen des nahezu identischen pIs mehrerer Proteine nicht erreicht werden. In Abbildung 44 ist die mit diesem Verfahren erzielte

Fraktionierung durch Gelelektrophorese dargestellt. Links im Gel ist in den sauren Fraktionen nahe pH 3 das 14 kDa große Protein sichtbar, im Neutralbereich sind nicht näher charakterisierte, unscharf begrenzte Banden, im alkalischen Bereich auf der rechten Seite befinden sich neben AfpA-Protein auch geringe Mengen kleinerer Proteine um 16-17 kDa, sowie Fragmente unter 10 kDa.

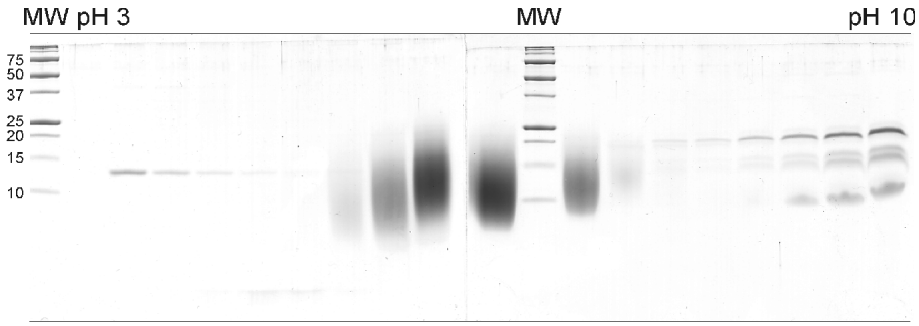

Abbildung 44: Gele der Fraktionen 2-19 (v.l.n.r.) aus der präparativen isoelektrischen Fokussierung im Bereich pH 3-10 der von F. culmorum TMW 4.0111 ausgeschiedenen Proteine.
MW: Molekulargewichtsmarker [kDa].

3.7 Untersuchungen mit polyklonalen Antiseren gegen Proteine aus *F. culmorum* TMW 4.0111

3.7.1 Herstellung der polyklonalen Antiseren

Die grenzflächenaktiven, gushing-verstärkenden Proteine mit 14 kDa und 20 kDa (AfpA) aus *F. culmorum* TMW 4.0111 wurden durch Anionenaustausch-Chromatographie und präparative isoelektrische Fokussierung in der benötigten Menge gereinigt. Die Reinheit der Proteine wurde durch Gelelektrophorese überprüft. Die gereinigten Proteine wurden an Dr. Frank Rabenstein (Bundesanstalt für Züchtungsforschung, Institut für Resistenzforschung und Pathogendiagnostik, Aschersleben, D) übergeben. An der Bundesanstalt für Züchtungsforschung wurden auf der Basis dieser Proteine polyklonale Antikörper in Kaninchen hergestellt. Die im folgenden gezeigten Ergebnisse beruhen auf Versuchen mit Testseren nach der zweiten Immunisierung der Tiere. Teile der im folgenden geschilderten Versuche fanden im Rahmen einer weiteren vom Autor betreuten Diplomarbeit statt.

3.7.2 Spezifität der Antiseren gegen Proteine aus *F. culmorum* und *F. graminearum*

Aus Schüttelkulturen von Isolaten von *F. culmorum* und *F. graminearum* wurden die von den Pilzen ausgeschiedenen Proteine durch Ammoniumsulfatfällung präzipitiert. Diese Präzipitate wurden für die Untersuchung der Spezifität der Antiseren gegen das 14 kDa- bzw. 20 kDa-Protein aus *F. culmorum* TMW 4.0111 eingesetzt. Abgewogene Mengen der Präzipitate wurden in Wasser resuspendiert, mit Probenpuffer versetzt und mittels Elektrophorese in Tris-Tricin-Gelen getrennt. Nach der Elektrophorese erfolgte der Blottransfer auf PVDF-Membran und die Immunfärbung (Verdünnung der Antiseren 1:2000). Die Präzipitate einiger *F. culmorum*-Isolate waren nahezu unlöslich und gaben daher nur relativ schwache Signale. In Abbildung 45 waren die extrem schwachen Signale in Bahn 3 (4.0108) und Bahn 10 (4.0610) auf die fehlende Löslichkeit des Präzipitats zurückzuführen. Bei allen anderen Isolaten war zumindest eine schwache Reaktion erkennbar, die jedoch teilweise nicht wiedergegeben werden konnte, da die schwachen violetten Banden kaum vom Scanner erfaßt wurden. Weiterhin ist in Abbildung 45 eine Kreuzreaktion des 14 kDa-Antiserums mit einem 20 kDa-Protein zu beobachten. Die Reaktion von Proteinen aus *F. culmorum*-Isolaten mit dem Antiserum gegen AfpA-Protein war weitaus gleichmäßiger und für alle untersuchten Isolate nahezu gleich gut (Abbildung 46).

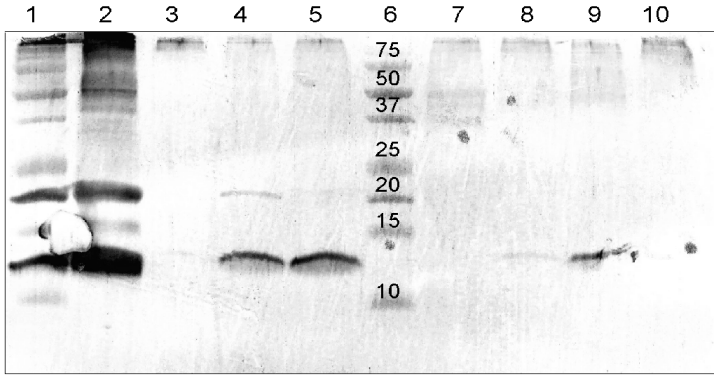

Abbildung 45: Reaktion von 14 kDa-Antiserum mit Proteinen von F. culmorum-Isolaten. Bahn 1: Molekulargewichtsmarker; Bahn 2: 4.0111, 40 µg Präzipitat; Bahn 3: 4.0108, 27 µg; Bahn 4: 4.0530, 27 µg; Bahn 5: 4.0546, 27 µg; Bahn 6: Molekulargewichts-marker; Bahn 7: 4.0548, 28 µg; Bahn 8: 4.0141, 41 µg; Bahn 9: 4.0732, 48 µg; Bahn 10: 4.0610, 27 µg

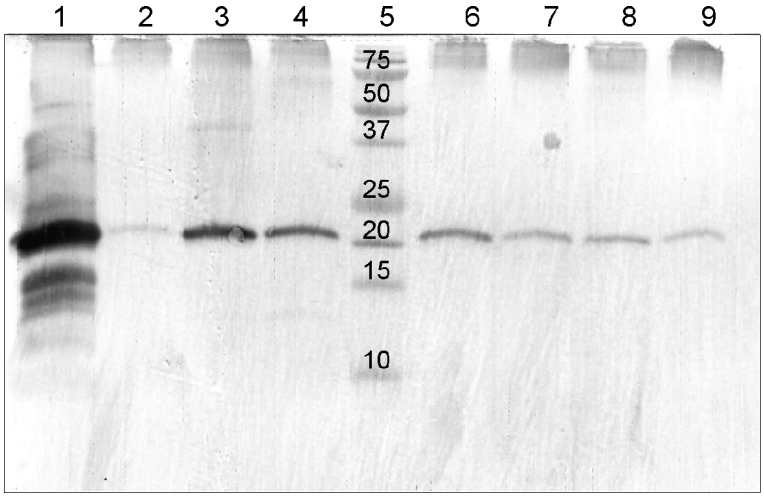

Abbildung 46: Reaktion von AfpA-Antiserum mit Proteinen von F. culmorum-Isolaten. Bahn 1: 4.0111, 40 µg; Bahn 2: 4.0108, 27 µg; Bahn 3: 4.0530, 27 µg; Bahn 4: 4.0546, 27 µg; Bahn 5: Molekulargewichtsmarker; Bahn 6: 4.0548, 28 µg; Bahn 7: 4.0141, 41 µg; Bahn 8: 4.0732, 48 µg; Bahn 9: 4.0610, 27 µg

Das Antiserum gegen das 14 kDa-Protein aus *F. culmorum* besaß eine Kreuzreaktion gegen ca. 20 kDa große Proteine (vgl. Abbildung 47). Da bei *F. graminearum* kein oder kaum Protein mit 14 kDa/pI 3,4 ausgeschieden wurde, wirkte die Kreuzreaktion vorwiegend gegen die vorhandenen ca. 20 kDa großen basischen Proteine, eine minimale Anfärbung um 14 kDa war erkennbar. Diese Proteine mit ca. 20 kDa wurden vom spezifischeren Antiserum gegen das AfpA-Protein aus *F. culmorum* ebenfalls erfaßt (Abbildung 48). Besonders das Antiserum gegen AfpA besaßen damit eine reproduzierbare Reaktivität gegen Proteine aus *F. culmorum* und *F. graminearum.*

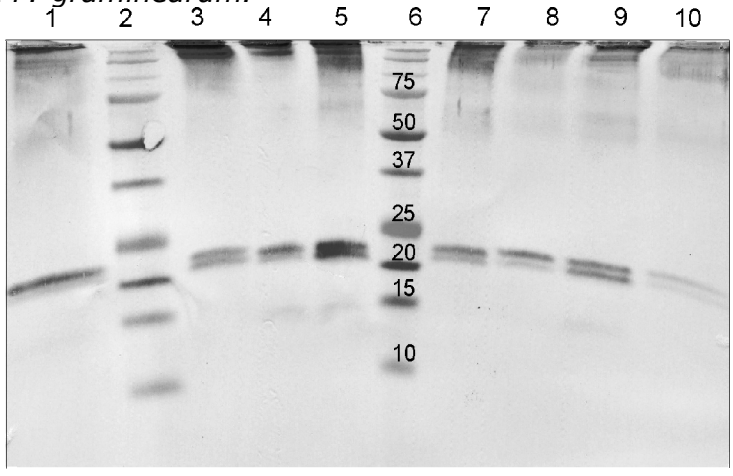

Abbildung 47: Reaktion von 14 kDa-Antiserum mit Proteinen von F. graminearum-Isolaten. Bahn 1: 4.0502, 20 µg; Bahn 2: Molekulargewichtsmarker; Bahn 3: 4.0503, 47 µg; Bahn 4: 4.0506, 20 µg; Bahn 5: 4.1555, 20 µg; Bahn 6: Molekulargewichtsmarker; Bahn 7: 4.0122, 20 µg; Bahn 8: 4.0596, 42 µg; Bahn 9: 4.0600, 52 µg; Bahn 10: 4.0186, 55 µg

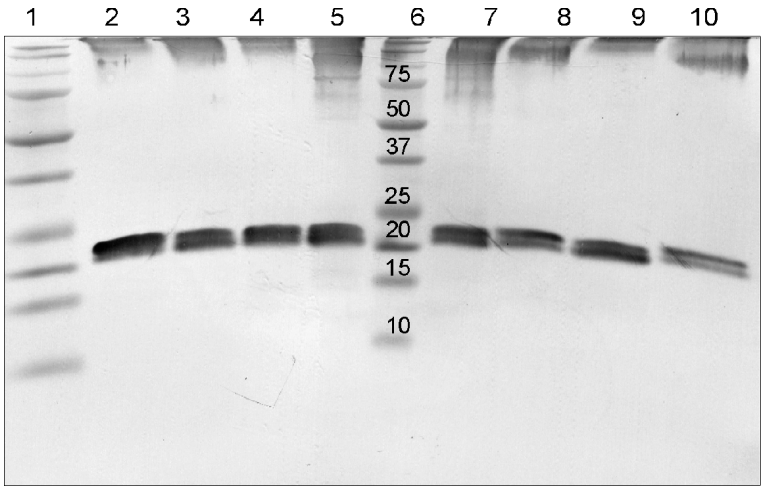

Abbildung 48: Reaktion von AfpA-Antiserum mit Proteinen von F. graminearum-Isolaten. Bahn 1: 4.0502, 20 g; Bahn 2: Molekulargewichtsmarker; Bahn 3: 4.0503, 47 µg; Bahn 4: 4.0506, 20 µg; Bahn 5: 4.1555, 20 µg; Bahn 6: Molekulargewichtsmarker; Bahn 7: 4.0122, 20 µg; Bahn 8: 4.0596, 42 µg; Bahn 9: 4.0600, 52 µg; Bahn 10: 4.0186, 55 µg

3.7.3 Untersuchung der Kreuzreaktionen der Antiseren mit Proteinen anderer *Fusarium*-Arten

Um die Kreuzreaktivität der Antiseren gegen das 14 kDa- bzw. AfpA-Protein aus *F. culmorum* TMW 4.0111 zu untersuchen, wurden extrazelluläre Proteine von *F. avenaceum* TMW 4.1862, *F. equiseti* TMW 4.1002, *F. poae* TMW 4.0788 und *F. tricinctum* TMW 4.1405 präpariert. Als Positiv-Kontrolle diente Protein von *F. culmorum* TMW 4.0111. Die Gewinnung der Proteine fand nach den beschriebenen Methoden über Schüttelkulturen in Fernbachkolben und Ammoniumsulfatfällung bis 95 % Sättigung statt.

1,0 mg (*F. avenaceum, F. tricinctum*) bzw. 4,0 mg (*F. equiseti, F. poae*) des Präzipitats der Ammoniumsulfatfällung wurden in 250 µl einfach konzentriertem Probenpuffer suspendiert, 10 min bei 70° C inkubiert und anschließend zentrifugiert (3 min, 10000 x g). Je Bahn wurden 10 µL der Probe auf Tris-Tricin-Gele aufgetragen und mit den fertigen Gelen *Western Blots* durchgeführt.

Das 14 kDa-Antiserum (Abbildung 49 A) zeigte eine Kreuzreaktion gegen ein

20 kDa-Protein von *F. culmorum* TMW 4.0111. Weiterhin war auch eine Bande mit ca. 34 kDa sichtbar. Dabei könnte es sich um ein Dimer aus 14 kDa + 20 kDa-Protein handeln, das über die Kreuzreaktivität des Antiserums mit angefärbt wurde. Das 14 kDa-Antiserum zeigte im Bereich um 14 kDa keine Kreuzreaktionen mit extrazellulären Proteinen der genannten *Fusarium*-Arten. Lediglich für *F. poae* wurde eine deutliche Reaktion bei ca. 34 kDa festgestellt. Das bereits bei *F. culmorum* TMW 4.0111 spezifischer reagierende AfpA-Antiserum zeigte ebenfalls im Bereich um 20 kDa keine deutlichen Kreuzreaktion mit Proteinen der genannten *Fusarium*-Arten (Abbildung 49 B). Hier war jedoch wiederum eine schwache, ca. 34 kDa große Bande bei *F. poae* zu beobachten, die der Kreuzreaktionen analog war, die bereits beim 14 kDa-Antiserum in Abbildung 49 A beobachtet wurde. Die Antiseren sind im Rahmen des durchgeführten Vergleiches gruppenspezifisch für *F. culmorum* und *F. graminearum*.

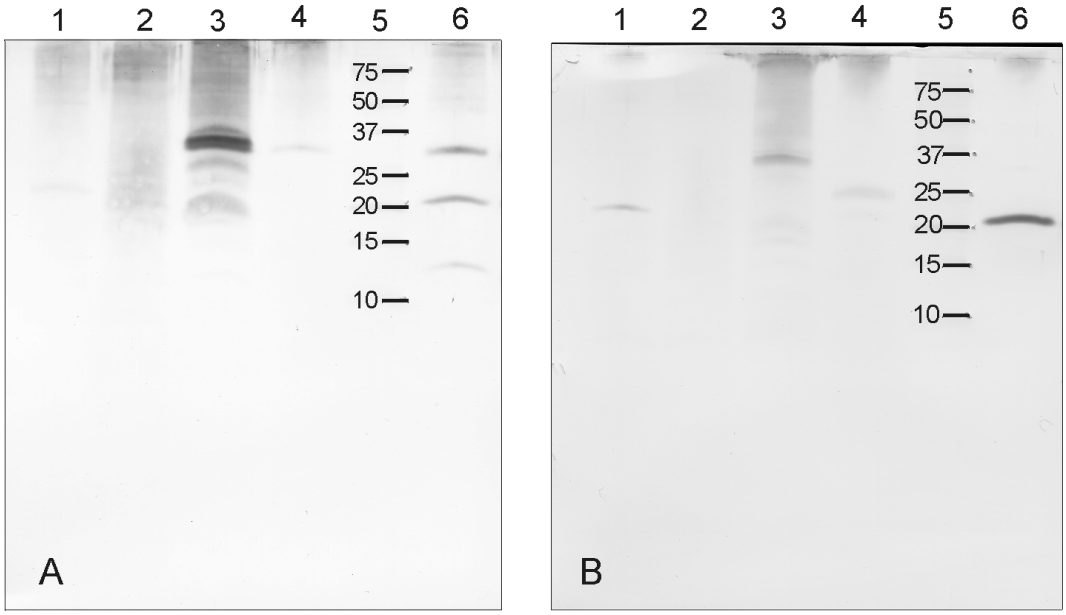

Abbildung 49: Kreuzreaktion der Antiseren gegen 14 kDa-Protein [A] und AfpA-Protein [B] aus F. culmorum TMW 4.0111 mit extrazellulären Proteine von weiteren Fusarium-Arten. Bahn 1: F. avenaceum; 2: F. equiseti; 3: F. poae; 4: F. tricinctum; 5: Molekulargewichtsmarker [kDa], 6: F. culmorum TMW 4.0111 (2 µg, Positivkontrolle).

3.7.4 Untersuchung nativer und hitzebehandelter Proteine von *F. culmorum* TMW 4.0111

Entsalztes, lyophilisiertes Gesamtprotein von *F. culmorum* TMW 4.0111 wurde mit 50 mM Na-Phosphatpuffer pH 6,0 bzw. 50 mM Na-Phosphatpuffer pH 6,0 mit 12 % (w:v) Maltose aufgenommen. Die Protein-Konzentration betrug 4 mg/mL. Eine Probe wurde nur in Puffer gelöst, eine weitere Probe wurde in Phosphatpuffer gelöst und 1 h bei 95 °C inkubiert. Eine dritte Probe wurde in maltosehaltigem Puffer gelöst und ebenfalls 1 h bei 95 °C inkubiert. Eine hitzeinduzierte Koagulation der gelösten Proteine trat nicht auf, die Lösungen blieben völlig klar. Dies belegte zudem die Hitzestabilität dieser von *F. culmorum* TMW 4.0111 ausgeschiedenen Proteine. Bei der maltosehaltigen Probe war nach der Hitzebehandlung eine deutliche Braunfärbung der Lösung erkennbar, die die Maillardreaktion belegt.

Von den so behandelten Proben wurde jeweils 30 µg/Tasche auf mehrere Tris-Tricin-Gele aufgetragen und durch Elektrophorese aufgetrennt. Ein Satz der Gele wurde durch Elektroblotting auf PVDF-Membran übertragen und mit Antiserum gegen das 14 kDa- bzw. AfpA-Protein aus *F. culmorum* TMW 4.0111 behandelt. Ein weiterer Blot wurde direkt mit Coomassie-Farbstoff gefärbt, ein weiteres Gel wurde silbergefärbt (Abbildung 50). Auf dem Coomassie-gefärbten Blot (A) und dem silbergefärbten Gel (B) waren die Banden bei erhitztem Protein (jeweils Bahn 1) und nativem Protein (Bahn 3) jeweils identisch. Damit konnte belegt werden, dass eine Hitzebehandlung keine Fragmentierung des Proteins hervorruft. Für die Proben mit dem mit maltosehaltigem Puffer hitzebehandelten Protein (Bahn 2) war eine jeweils höhere Lage und ein Unscharf-werden der Banden zu beobachten (Markierung mit "]" in Abbildung 50 C und D). Gleichzeitig war in dieser Probe die Anfärbbarkeit mit Silber drastisch reduziert. Die reduzierte Silberfärbbarkeit von Maillardprodukten von Proteinen beruht auf der Blockierung der für die Silberfärbung nötigen reaktiven NH_2-Gruppen (Aktivierung/Reaktion mit Formaldehyd) durch die kovalente Kopplung von reduzierenden Zuckern. Die höhere Lage und Unschärfe der Banden ist über die Erhöhung der Masse des Proteins durch unterschiedlich viele angehängte Maltosereste erklärbar. Die *Western Blots* (Abbildung 50 C und D) belegten eine Reaktivität der Antiseren auch mit hitzebehandelten Proteinen, sowie die Reaktivität gegen Proteine mit Maillardprodukten, wie sie auch z.B. aus dem Brauprozeß zu erwarten wäre. Weiterhin wurden auf den *Western Blots* Oligomer-Banden der Proteine angefärbt

(Markierung mit "*"). Es. wurden Oligomere mit folgenden Molekulargewichten gefunden: 28 kDa (=2x14 kDa), 34 kDa (=14+20 kDa), 40 kDa (=2x20 kDa), ca. 48 kDa (=2x14 kDa+20 kDa), sowie ca. 80 kDa (4x20 kDa). Dabei blieben die Aggregate auch in Gegenwart von SDS und Hitze in der thermischen Behandlung im Probenpuffer stabil.

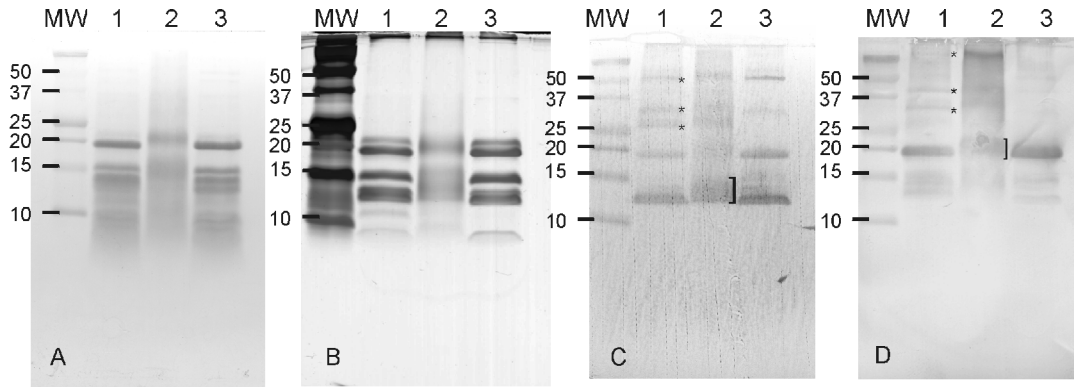

Abbildung 50: Untersuchung von Proteinen aus F. culmorum TMW 4.0111 nach Erhitzung in Puffer (1), Erhitzung in Puffer mit Maltose (2) und nativ (3) mit verschiedenen Färbeverfahren.
A: coomassie-gefärbter Blot, B: silbergefärbtes Gel, C: Western Blot mit Antiserum gegen 14 kDa-Protein, D: Western Blot mit Antiserum gegen AfpA-Protein.
MW: Molekulargewichtsmarker [kDa].

3.7.5 Detektion grenzflächenaktiver Proteine aus *Fusarium* spp. in infizierten Malzen durch *Western Blotting*

Befallsfreier Weizen wurde einerseits direkt vermälzt, andererseits im Weichwasser mit Konidiensuspensionen unterschiedlicher *Fusarium*-Isolate infiziert. Die Grünmalze wurden nach einem Darrschema für helles Malz bis 85 °C abgedarrt. Die verwendeten Organismen und die Überschäumvolumina im Gushingtest nach Donhauser *et al.* (1990) sind in Tabelle 15 aufgeführt. Weiterhin wurden ein zu Gushing führendes Praxismalz (Weizen, ÜSV im Weißbier ca. 180 mL) und die aus einem Teil der Probe ausgelesenen relevanten roten Körner untersucht. Eine aus einem Anbauversuch stammende Gerste mit extremer natürlicher Feldinfektion wurde ebenfalls vermälzt und untersucht.

Tabelle 15: Überschäumvolumen der künstlich infizierten Malze

Probe	Infektion mit	Überschäumvolumen [mL]
A	*F. graminearum* TMW 4.0157	95
B	*F. graminearum* TMW 4.0506	137
C	*F. culmorum* TMW 4.0111	184
D	befallsfrei	17
E	befallsfrei	2
F	Praxismalz	ca. 180
G	rote Körner aus Praxismalz	nicht bestimmbar
H	Gerstenmalz, natürliche Feldinfektion aus Anbauversuch (43 % *F. graminearum*, 21 % *F. culmorum*)	

Aus diesen Malzen wurden Kaltwasserauszüge mit wässriger Kochsalzlösung (0,5 % w:v) hergestellt, indem 10 g fein geschrotetes Malz mit 25 mL Kochsalzlösung versetzt wurden. Die Extraktion der "roten Körner" wurde mit 1,0 g roten Körnern und 2,5 mL Kochsalzlösung durchgeführt Die Proben wurden dann für 1,0 h auf dem Überkopfschüttler (Heidolph Reax-2, Stufe 4) extrahiert, bei 25000 x g zentrifugiert und der Überstand zur Ammoniumsulfatfällung eingesetzt. Ammoniumsulfat wurde dem dekantierten Überstand in mehreren Portionen bis zur Sättigung zugesetzt. Das Präzipitat wurde durch Zentrifugation sedimentiert und zur Untersuchung eingesetzt.

10 mg des Präzipitats der Ammoniumsulfatfällung wurden in 200 µl einfach konzentriertem Probenpuffer suspendiert, 10 min bei 70° C inkubiert und anschließend zentrifugiert (3 min 10000 x g). Je Bahn wurden 15 µL der Probe aufgetragen (entsprechend ca. 750 µg des Präzipitats) und mit den fertigen Gelen *Western Blots* mit biotinyliertem Brückenantikörper und Streptavidin-APase durchgeführt. Zusätzlich wurde eine Positivkontrolle mit ca. 2 µg Exoprotein von *F. culmorum* TMW 4.0111 geladen. Die Färbung mit dem 14 kDa-Antiserum zeigte keine spezifischen Signale bei den Malzen (Daten hier nicht gezeigt). Die Reaktion mit dem 20 kDa-Antiserum (Abbildung 51) erbrachte dagegen - teilweise unscharf begrenzte - Banden knapp oberhalb im Bereich der Positivkontrolle bei allen infizierten Malzen. Dieses Signal war beim Proteinisolat aus den roten Körnern besonders stark ausgeprägt und noch beim ursprünglichen Malz, aus dem die roten Körner ausgelesen wurden, schwach feststellbar (schwarze Dreiecke). Die

gleiche Bande fehlte beim nicht infizierten Malz. In zwei weiteren zu Gushing führenden Malzen konnten ebenfalls Reaktionen in Bereich der Positivkontrolle erhalten werden (Daten hier nicht gezeigt). Die teilweise unscharfe Begrenzung der Banden war analog zu dem in einem vorhergehenden Versuch erzielten Effekt, bei dem Maillardprodukte dieser Fusarium-Proteine mit Maltose zeugt wurden (Abbildung 50 C). Die Reaktion des Antiserums mit Proteinextrakten aus Fusarium-befallenen Malzen bedeutet, dass die basischen Proteine um 20 kDa auch von *F. culmorum* und *F. graminearum* während der Mälzung gebildet werden. Für das von *F. culmorum* TMW 4.0111 ausgeschiedene Protein dieser Größe konnte ein verstärkender Einfluss auf Gushing gezeigt werden (vgl. 3.4).

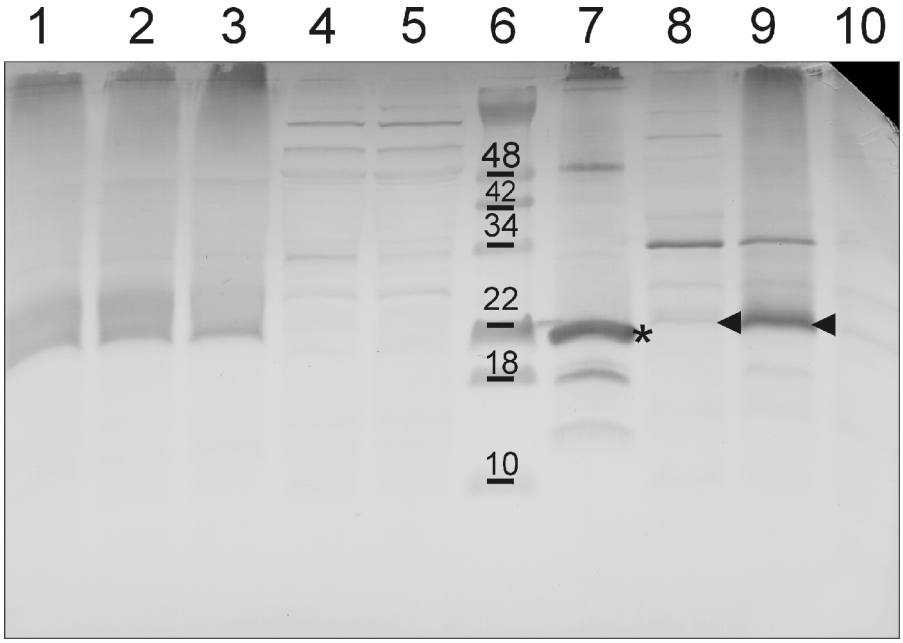

Abbildung 51: Western Blots der Proteine aus infizierten Malzen mit AfpA-Antiserum mit positiver Reaktion bei den Malzen mit Befall durch Fusarium spp.
Bahn 1: Malz A, 2: Malz B; 3: Malz C; 4: Malz D (befallsfrei); 5: Malz E (befallsfrei), 6: Molekulargewichtsmarker [kDa], Fermentas, 7: Positivkontrolle (*), 2 µg Protein aus F. culmorum TMW 4.0111, 8: Malz F (Praxismalz), 9: rote Körner aus Malz F, 10: Malz H

3.7.6 Stabilität von AfpA-Homologen im Maischprozeß

Die Stabilität der durch das AfpA-Antiserum detektierbaren Proteine (AfpA-Homologe) während des Maischens wurde untersucht. Dazu wurde Malzschrot aus mit *F. graminearum* TMW 4.0506 infiziertem Malz nach dem in Tabelle 16 angegebenen Maischverfahren verarbeitet. Es wurden 70 g Schrot (Mahlspalt

0,8 mm) mit 300 mL entsalztem Wasser in einem Kongreßmaischbad eingemaischt. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden je 10 mL Probe entnommen und die enthaltenen Proteine, nach dem Entfernen des Feststoffanteils durch Zentrifugation, mittels Ammoniumsulfatfällung bis zur Sättigung präzipitiert. Das Präzipitat wurde wie in 3.7.5 beschrieben zum *Western Blotting* mit biotinyliertem Brückenantikörper und Streptavidin-APase eingesetzt. Als Positivkontrolle diente ein Kaltwasserauszug aus dem gleichen Malz (Probe 1).

Tabelle 16: Maischverfahren für die Untersuchung der Stabilität der durch das AfpA-Antiserum detektierten Proteine

Schritt	**Temperatur [°C]**	**Zeit [min]**	**Probenahme**	**Proben-nummer**
Einmaischen	45	0	sofort nach Einmaischen	2
Aufheizen	65	20	nach Erreichen von 65 °C	3
Rast	65	50	am Rastende	4
Aufheizen	70	55	nach Erreichen von 70 °C	5
Rast	70	85	am Rastende	6
Aufheizen und Abmaischen	80	95	nach Erreichen von 80 °C	7

Über den gesamten Maischprozeß hinweg konnte, wie auch beim Kaltwasserauszug (Probe 1 = Bahn 1), im Bereich ab 22 kDa eine Anfärbung durch die Reaktion mit dem Antikörper festgestellt werden (vgl. Abbildung 52). Die Intensität der Anfärbung dieser Banden nahm über den Maischprozeß geringfügig ab, gleichzeitig trat ab Probe 5 eine Bande mit ca. 15 kDa auf, bei der es sich um ein Fragment des detektierten Proteins handeln könnte. Am Ende des Maischens wurde noch immer eine deutliche Reaktion durch die Immundetektion erhalten. Daher kann davon ausgegangen werden, dass ein nicht unerheblicher Anteil der über das Malz eingebrachten pilzlichen Proteine bis zum Ende des Maischens erhalten bleibt.

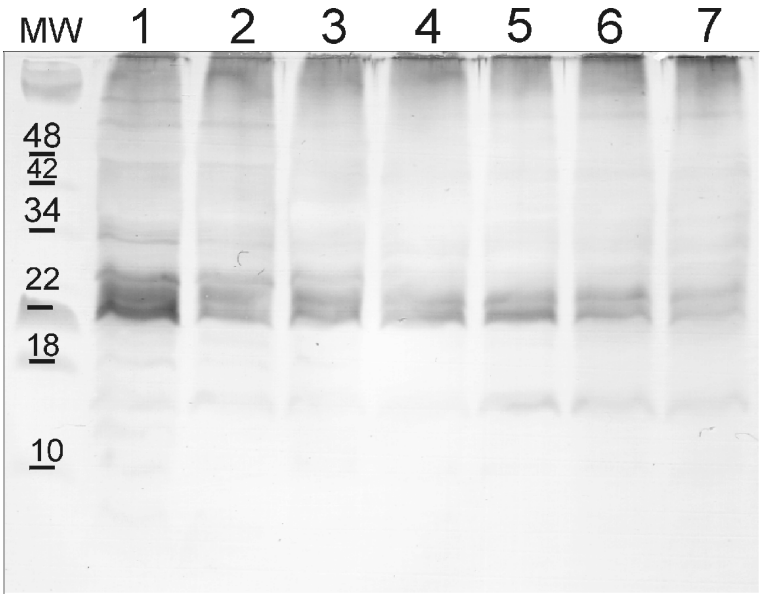

Abbildung 52: Stabilität der mit dem AfpA-Antiserum reagierenden Proteine beim Maischen eines mit F. graminearum TMW 4.0506 infizierten Weizenmalzes (Western Blot).
MW: Molekulargewichtsmarker [kDa], Fermentas, Bahn 1: Kaltwasserauszug, Bahn 2: nach Einmaischen, Bahn 3: Beginn 65 °C-Rast Bahn 4: nach 65 °C-Rast, Bahn 5: Beginn 70 °C-Rast, Bahn 6: Ende 70 °C-Rast, Bahn 7: Abmaischen bei 80 °C

3.8 Messungen der Grenzflächenaktivität der Proteine aus *F. culmorum* und *F. graminearum*

3.8.1 Messung der Oberflächenspannung unterschiedlicher Proteinlösungen durch Bestimmen des Tropfenvolumens

Die dynamische Oberflächenspannung unterschiedlicher Proteinlösungen wurde im Vergleich zu Wasser und SDS-Lösung (66,4 g/L = 100 KMK) durch die in 2.2.17.1 beschriebene einfache Tropfenmethode untersucht. Dabei wurde für Wasser ein zu niedriger Wert bestimmt (44,5 mN/m statt 72 mN/m). Für die SDS-Lösung wurde ebenfalls ein zu niedriger Wert bestimmt (21,2 mN/m statt ca. 38 mN/m). Beide Werte lagen um nahezu den gleichen Faktor zu niedrig, so dass von einem systematischen Fehler ausgegangen werden konnte, der die Vergleichbarkeit der Ergebnisse untereinander kaum einschränkte. Die Proteinlösungen verhielten sich im Rahmen dieser Methode nahezu wie Wasser (Tabelle 17). Dies ist durch die fehlende Zeit zur Orientierung der Proteinmoleküle in der Grenzfläche zu erwarten.

Tabelle 17: Oberflächenspannung unterschiedlicher Lösungen durch Tropfenmethode bestimmt

Organismus oder Substanz	pI-Bereich der Proteine	Konzentration [mg/mL]	Oberflächen-spannung [mN/m]
SDS		66,4	21,2
Wasser (LiChrosolv)			44,5
F. culmorum TMW 4.0111	sauer	47	41,6
F. culmorum TMW 4.0111	basisch	20	41,6
F. graminearum TMW 4.0175	basisch	114	46,8
F. graminearum TMW 4.0175	basisch	11,4	44,2

3.8.2 Bestimmung der Oberflächenspannung durch eine indirekte, optische Methode

3.8.2.1 Validierung der indirekten Meßmethode

Marktübliche Tensiometer (Ring/Platte) sehen ein Probenvolumen von rund 50 mL vor. Aufgrund der Schwierigkeit, reine Proteine in Mengen von mehreren Gramm für Konzentrationsreihen zu gewinnen, schieden diese Geräte aufgrund des Mengenlimitierung aus, Mikrotensiometer standen nicht zur Verfügung. Daneben sind sie ebenfalls nur bedingt für die Bestimmung der Gleichgewichtsoberflächenspannung geeignet. Aus diesen Gründen wurde eine von Cottingham *et al.* (2004) beschriebene vergleichende Methode eingesetzt, die die Deformation der Fluidoberfläche in Mikrotiterplatten durch Oberflächenspannungseffekte in eine Änderung der scheinbaren optischen Dichte umsetzt und damit den Vergleich zu Konzentrationsreihen von Detergentien bzw. deren Auswirkung erlaubt (vgl. 2.2.17.2). Eine höhere optische Dichte entspricht einer niedrigeren Oberflächenspannung, da in diesem Fall der Meniskus stärker gekrümmt ist. Weiterhin wurde die Richtung der Achse der optischen Dichte (Ordinate) invertiert. Damit bezeichnet eine geometrisch höhere Lage eines Meßpunktes eine höhere Oberflächenspannung. Es wurde je Kavität ein Probenvolumen von nur 200 µL benötigt, so dass die Ergebnisse i.d.R. durch Dreifachbestimmung abgesichert werden konnten.

Um die Methode zu validieren, wurden Verdünnungsreihen unterschiedlicher Detergentien angesetzt. Dabei wurde mit der 100-fachen (CHAPS 10-fachen) kritischen Mizellkonzentration (KMK, bezogen auf 50 mM NaCl) begonnen und in 10-fach-Verdünnungsschritten verdünnt. Die Verdünnungen erfolgten in 0,5 % NaCl (=86 mM), wodurch eine geringe Abweichung von der kritischen Mizellkonzentration bei 50 mM (vgl. Tabelle 18) entsteht. Je Konzentration wurden drei Proben pipettiert und die Platten für rund 15 h abgedeckt verwahrt. Danach wurde die optische Dichte bei 340 nm und 2,00 mm Plattenversatz gemessen und nachfolgend der Mittelwert berechnet.

Für alle Detergentien wurde deutlich, dass sie bei extremer Verdünnung die Oberflächenspannung von Wasser nicht beeinflussten, die scheinbaren optischen Dichten lagen um 0,09. Ab ca. 1/100 KMK begannen die scheinbaren optischen Dichten stark anzusteigen, also sank die Oberflächenspannung in den Lösungen. Diese Erhöhung der scheinbaren OD erreichte im Bereich von ca. 1 KMK ein Plateau, eine weitere Erhöhung der Konzentration des Detergens bewirkte keine weitere Änderung der OD (Abbildung 53). Dieser Effekt wird auch für Konzentrationsreihen von Detergentien erwartet, die die maximale Absenkung der Oberflächenspannung bei 1 KMK erreichen, wobei eine zusätzliche Erhöhung der Konzentration zu keiner zusätzlichen Absenkung der Oberflächenspannung führt. Für CHAPS konnte die Kurve aufgrund der geringen Löslichkeit von nur ca. 3 g/L nicht bis 100 KMK fortgesetzt werden. Der Verlauf der OD-Kurven über der Konzentration der Detergentien (in Vielfachen der KMK) zeigte, dass diese Methode zur Messung von Oberflächenspannungen in Volumen von 200 µL einsetzbar war.

Tabelle 18: Kritische Mizellkonzentrationen verschiedener Detergentien in 50 mM NaCl, 25 °C (Daten: AppliChem, Darmstadt, D).

Detergens	**CHAPS**	**SDS**	**DDM**	**Brij 35**	**Tween 20**
Kritische Mizell-konzentration	8 mM	2,3 mM	0,15 mM	0,09 mM	0,059 mM

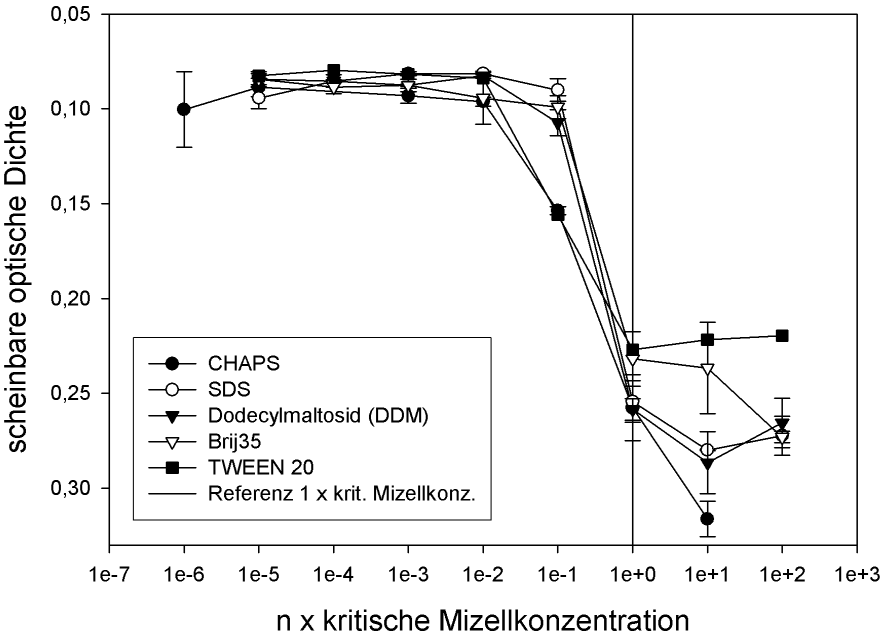

Abbildung 53: Verlauf der scheinbaren optischen Dichte über Vielfachen der kritischen Mizellkonzentration.

3.8.2.2 Zeitabhängigkeit der Einstellung der Oberflächenspannung

Die Ausbildung der Menisken in den Kavitäten war nicht instantan, sondern erfolgte zumindest für die untersuchten Proteinlösungen mit Verzögerung. Diese Zeitabhängigkeit der Oberflächenspannung (erfasst als zeitliche Veränderung der scheinbaren optische Dichte) wurde daher für wässrige Lösungen von SDS, Tween 20 und des Gesamtproteins von *F. culmorum* TMW 4.0111 in zwei Konzentrationen erfaßt (Abbildung 54). Dabei zeigte sich eine deutliche Verzögerung der Wirkung des Proteins gegenüber der Wirkung der Detergentien. Gleichwohl kann aber bei entsprechender Wartezeit eine geringe Proteinkonzentration (0,8 mg/mL) zu einer niedrigeren Oberflächenspannung führen, als SDS oder Tween 20 mit 100 KMK.

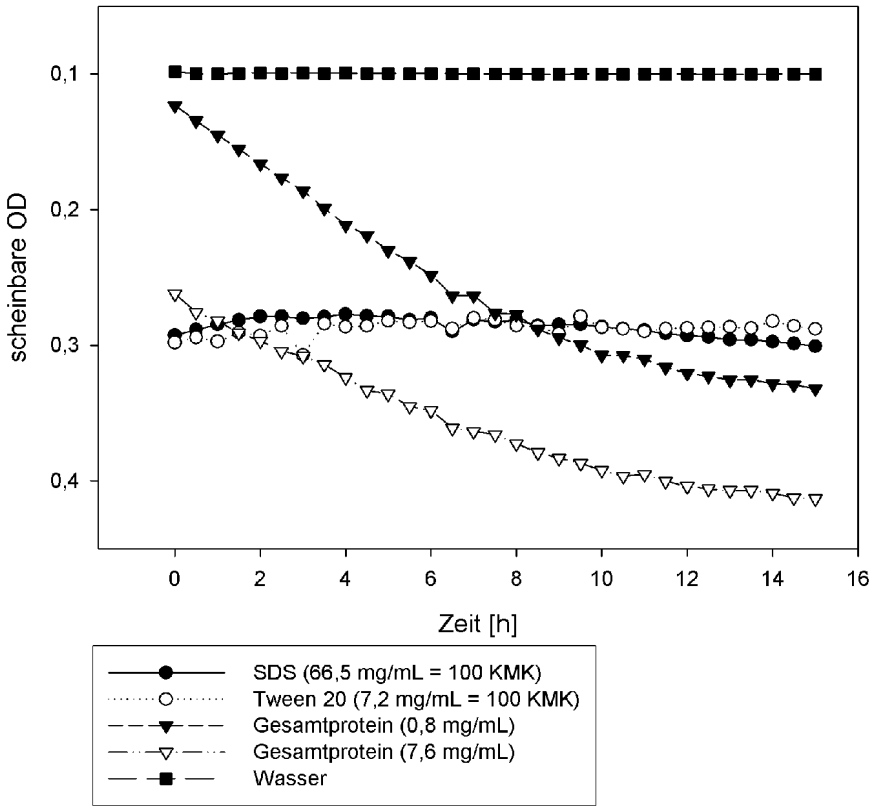

Abbildung 54: Verlauf der scheinbaren OD als Maß für die Oberflächenspannung über die Zeit

3.8.2.3 Wirkung der pilzlichen Proteine auf die Oberflächenspannung

Um die Auswirkung der Proteine aus *F. culmorum* TMW 4.0111 quantitativ erfassen zu können, wurden Verdünnungsreihen der Proteine mit der optischen Messmethode untersucht. Mittels präparativer isoelektrischer Fokussierung wurde ausgehend von Kulturen von *F. culmorum* TMW 4.0111 eine hinreichende Menge des 14 kDa-Proteins bzw. der basischen Proteine mit 17 und 20 kDa (AfpA) gereinigt und die Konzentration über UV-Absorption bei 210 nm gegen Rinderserum-Albumin bestimmt. In Abbildung 55 und 56 kann die Wirkung dieser Proteine mit der von SDS verglichen werden. Die Wirkung der Proteine setzte bei weitaus niedrigerer Konzentration ein und führte bei hoher Konzentration im Vergleich zu SDS zu einer gleichwertigen bzw. stärkeren Absenkung der Oberflächenspannung. Weiterhin lief die Kurve des 14 kDa-Proteins bei OD≈0,35 horizontal aus, was auf das mögliche Erreichen der KMK hinwies. Die Lage der

Kurve des 14 kDa-Proteins blieb weitgehend unbeeinflußt, wenn statt Wasser 50 mM Phosphatpuffer pH 6,0 (auch mit oder ohne Zusatz von 12 % Maltose) eingesetzt wurde (Daten hier nicht gezeigt). Die in Abbildung 56 dargestellten Ergebnisse für die basischen Proteine von *F. culmorum* TMW 4.0111 wiesen zudem ein lokales Minimum der Oberflächenspannung bei 10^{-5} mol/L auf. Dieses lokale Minimum deutete auf das mögliche Erreichen der Kritischen Aggregationskonzentration (im weiteren: KAK) hin, ab der Proteinaggregate gebildet werden können, wobei Konkurrenzeffekte zwischen den enthaltenen Proteinen den Kurvenverlauf zusätzlich beeinflussen können. Bei weiterer Erhöhung der Proteinkonzentration sank die Oberflächenspannung auf niedrigere Werte als bei SDS ab.

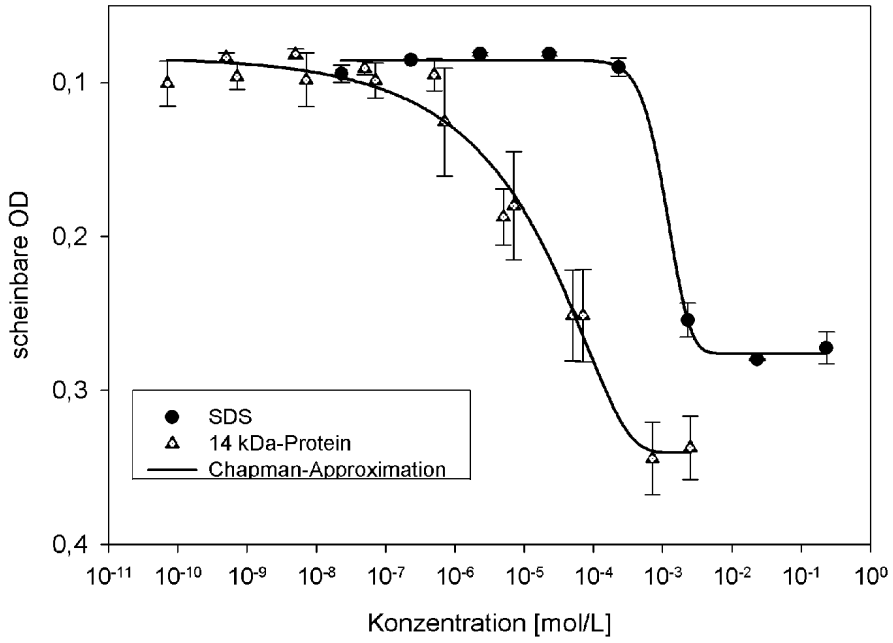

Abbildung 55: Scheinbare OD als Maß für die Oberflächenspannung von Verdünnungsreihen von SDS bzw. 14 kDa-Protein aus F. culmorum TMW 4.0111. Approximation der Meßpunkte durch Ausgleichskurven (Inkubationszeit vor der Messung ca. 15 h).

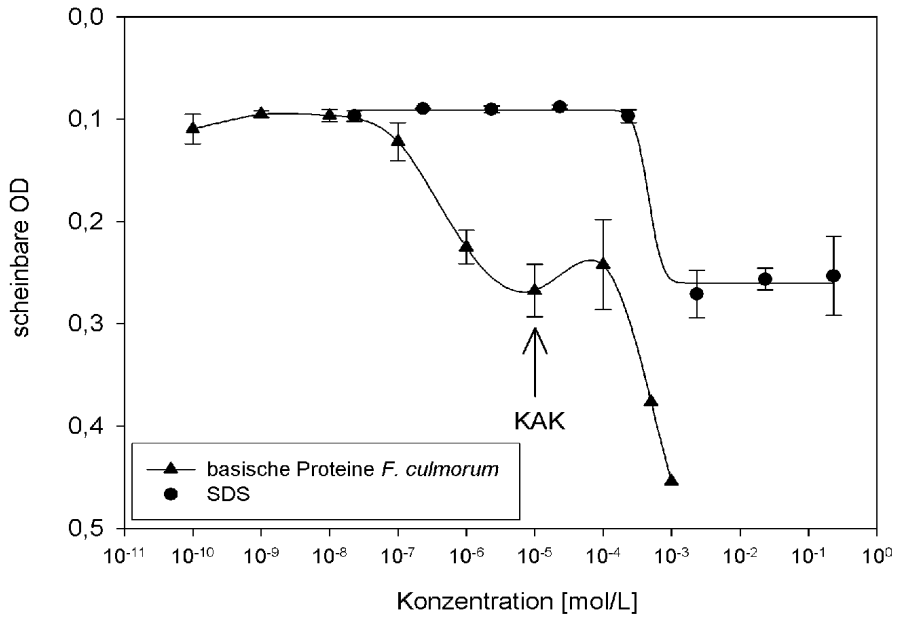

Abbildung 56: Scheinbare OD als Maß für die Oberflächenspannung von Verdünnungsreihen von SDS bzw. der basischen Proteine (17 kDa und AfpA) aus F. culmorum TMW 4.0111. KAK: Kritische Aggregationskonzentration. (Inkubationszeit vor der Messung ca. 18 h).

Weiterhin wurden die basischen Proteine von *F. graminearum* TMW 4.0175 durch präparative isoelektrische Fokussierung angereichert und wie oben beschrieben untersucht. Die Probe enthielt zwei basische Proteine mit isoelektrischen Punkten um pH 9 mit ca. 14 und 21 kDa, wie in Abbildung 57 dargestellt, sowie eine unscharfe Bande unterhalb von 10 kDa. Auch bei den basischen Proteinen setzte die Reduktion der Oberflächenspannung um mehrere Dekaden der Konzentration früher als bei SDS ein und zeigte ebenfalls ein lokales Minimum der Oberflächenspannung bei 10^{-5} mol/L. Dieses lokale Minimum deutete wie bereits bei *F. culmorum* auf das mögliche Erreichen der Kritischen Aggregationskonzentration (KAK) hin, ab der Proteinaggregate gebildet werden. Bei weiterer Erhöhung der Proteinkonzentration sank die Oberflächenspannung auf niedrigere Werte als bei SDS ab. (Abbildung 58).

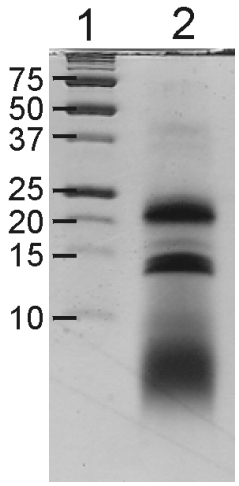

Abbildung 57: Basische Proteine von F. graminearum TMW 4.0175, pI ca. 9

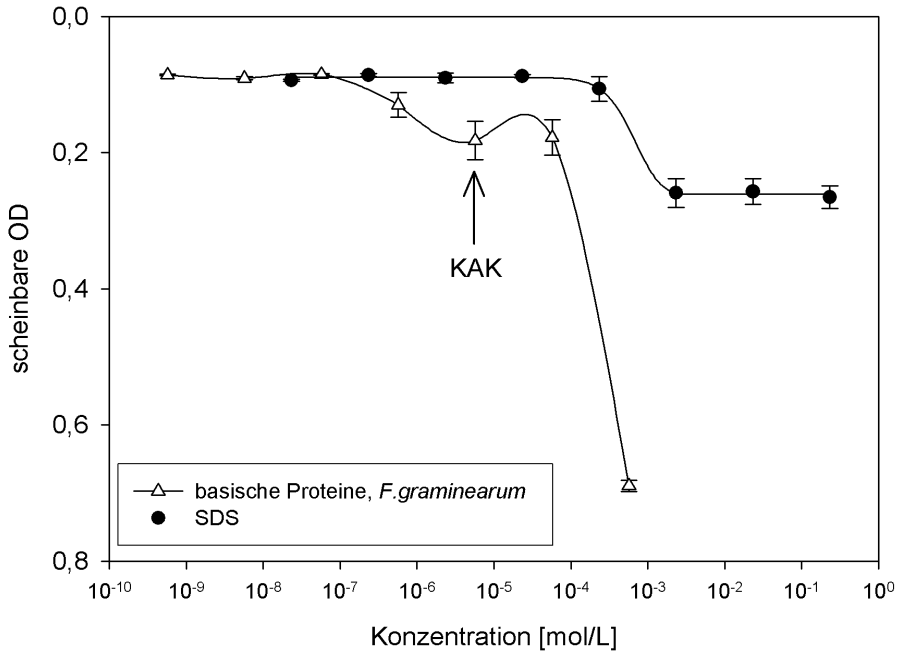

Abbildung 58: Scheinbare OD als Maß für die Oberflächenspannung von Verdünnungsreihen von SDS bzw. der basischen Proteine aus F. graminearum TMW 4.0175, KAK: Kritische Aggregationskonzentration (Inkubationszeit vor der Messung ca. 18 h).

3.9 Oberflächenhydrophobizität von Proteinen aus *Fusarium* spp. und Malzen

Die Oberflächenhydrophobizität S_0 zählt zu den physikalischen Eigenschaften von Proteinen. Sie ist ein Maß für das Vorhandensein hydrophober Domänen an der Oberfläche des Proteins. Hohe Oberflächenhydrophobizität ist eine Voraussetzung für eine stabile Fixierung eines Proteins in einer Phasengrenzfläche, z.B. in Blasenhäuten. Da Proteine durch technologische Einflüsse, z.B. Erhitzung, ihre Konformation ändern können, bewirken diese Strukturänderungen ggf. auch eine Modifikation der Oberflächenhydrophobizität. Weitere Einflüsse können über die Bildung von Maillardprodukten entstehen, die die einerseits Konformationsänderungen stabilisieren, andererseits aber auch Polarität des Moleküls erhöhen können. Die Oberflächenhydrophobizität S_0 wird durch Fluoreszenzspektroskopie unter Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen, wie PRODAN, oder in dieser Arbeit 1-anilino-8-naphtalin-sulfonsäure (ANS), bestimmt. Dabei wird die Verschiebung der Fluoreszenz durch die Interaktion zwischen Farbstoff und hydrophoben Domänen ausgenutzt, um die Oberflächenhydrophobizität zu bestimmen. Dabei reagiert ANS bevorzugt mit aromatischen (Phe, Tyr, Trp), schwächer mit hydrophoben aliphatischen Aminosäuren. Eine der Möglichkeiten zur Messung von S_0 sieht vor, eine Verdünnungsreihe des zu untersuchenden Proteins in Puffer herzustellen und nach Messung des Blindwertes zu jeder Verdünnung die gleiche Menge ANS zuzugeben. Nach definierter Reaktionszeit wird wiederum die Fluoreszenz gemessen. Aus der Auftragung der Fluoreszenz (dimensionslos) über der Proteinkonzentration (in Massenprozent) wird aus dem linearen Anfangsbereich der Kurve die Steigung bestimmt. Diese Steigung entspricht der Oberflächenhydrophobizität:

$$S_0 = \frac{\Delta\ RFU}{\Delta C}$$ berechnet in [1/%].

Mit dieser Methode wurden die aus *Fusarium ssp*. präparierten Proteine in unbehandeltem Zustand, sowie nach thermischer Behandlung mit und ohne Maltose untersucht, um den Einfluss der Würzekochung zu simulieren. Des weiteren wurden Malze hergestellt, die während des Weichens gezielt mit *Fusarium ssp.* infiziert wurden. Für diese hell abgedarrten Malze wurde das Überschäumvolumen im Gushingtest bestimmt. Aus Feinschrot dieser Malze wurde lösliches Protein extrahiert und ebenfalls die Oberflächenhydrophobizität bestimmt.

3.9.1 Oberflächenhydrophobizität von *Fusarium*-Proteinen in Abhängigkeit von der thermischen Vorbehandlung

Proteine aus Reinkulturen von *F. culmorum* TMW 4.0111 wurden mittels präparativer isoelektrischer Fokussierung getrennt und über Ultrafiltration (Amicon Ultra, MWCO 5000 Da) konzentriert. Die Proteingehalte der Retentate wurden gegen Referenzlösungen von Rinderserumalbumin photometrisch bei 210 nm bestimmt. Die Proteinlösungen wurden auf eine Konzentration von 10 mg/mL eingestellt. Auf diese Weise wurden Proben des sauren 14 kDa-Proteins und Proben, die beide basischen Proteine (17 kDa und AfpA) enthielten, hergestellt. Die Bestimmung der Oberflächenhydrophobizität wurde zum einen für die nativen Proteine durchgeführt. Zum anderen wurden Aliquote der Proben mit und ohne 12 %iger Maltoselösung für 1,0 h in hermetisch verschlossenen Glasröhren im kochenden Wasserbad thermisch behandelt. Diese Behandlung diente zur Erzeugung thermischer Modifikationen bzw. der Bildung von Maillardprodukten, ähnlich den Vorgängen bei der Würzekochung. Die Bestimmung der Oberflächenhydrophobizität erfolgte auch hier mittels des Fluoreszenzfarbstoffes ANS. Die Messungen erfolgten teilweise in Phosphatpuffer pH 7,4, bei pH 3,4 (pI des 14 kDa-Proteins, Citratpuffer) bzw. pH 4,5 (bierähnlicher pH-Wert, Citratpuffer).

Die Messungen zeigten für das 14 kDa-Protein bei pH 7,4 nur minimale Auswirkungen einer Wärmebehandlung unter Abwesenheit von reduzierenden Zuckern (Abbildung 59). Eine Wärmebehandlung in Gegenwart von Maltose führte dagegen zu einer Steigerung der an sich geringen Oberflächenhydrophobizität um rund 38 %. Gleichzeitig war eine massive Abhängigkeit der Oberflächenhydrophobizität vom pH-Wert erkennbar, da das native Protein bei einer Messung am pI (pH 3,4) in Abwesenheit von Maltose eine dreimal höhere Oberflächenhydrophobizität aufwies, als bei pH 7,4. Die Messungen wurden durch die relativ hohe Schwankung der Anzeige am Gerät bei den geringen Fluoreszenzen erschwert.

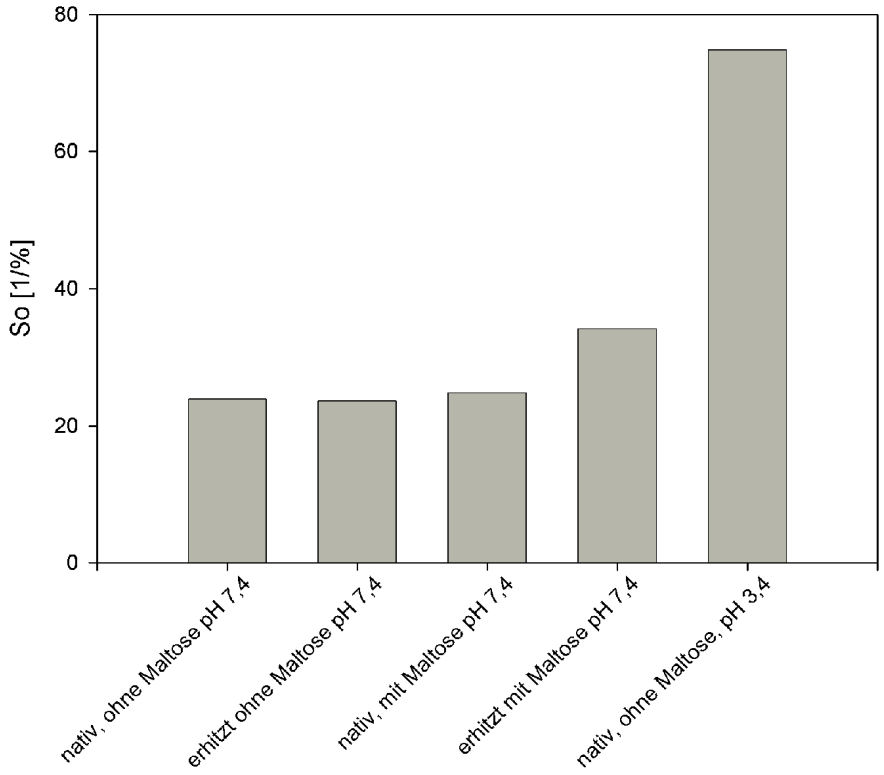

Abbildung 59: Oberflächenhydrophobizität des 14 kDa-Proteins aus F. culmorum TMW 4.0111 in Abhängigkeit von der Vorbehandlung bzw. dem pH-Wert bei der Messung

Für die basischen Proteine (17 kDa mit AfpA) aus *F. culmorum* TMW 4.0111 wurden die gleichen Untersuchungen (nativ und wärmebehandelt, mit und ohne Maltose) durchgeführt, wobei die Messungen in 50 mM Citratpuffer pH 4,5 stattfanden. Für diese Proteine zeigte sich eine deutlich höhere initiale Oberflächenhydrophobizität, als für das 14 kDa-Protein. Die ursprüngliche Oberflächenhydrophobizität konnte durch die Wärmebehandlung extrem gesteigert werden (Abbildung 60). Der Einfluss von Maltose war zwar noch feststellbar, aber aufgrund der extremen Erhöhungen der Oberflächenhydrophobizität durch die Wärmebehandlung war der absolute Unterschied von eher geringer Bedeutung. Unter Berücksichtigung der thermischen Stabilität dieser Proteine kann davon ausgegangen werden, dass diese einerseits den Prozeß der Würzekochung überstehen, andererseits durch die mit der thermischen Behandlung verbundene Erhöhung der Oberflächenhydrophobizität geradezu zur Einlagerung in Blasenhäute aktiviert werden.

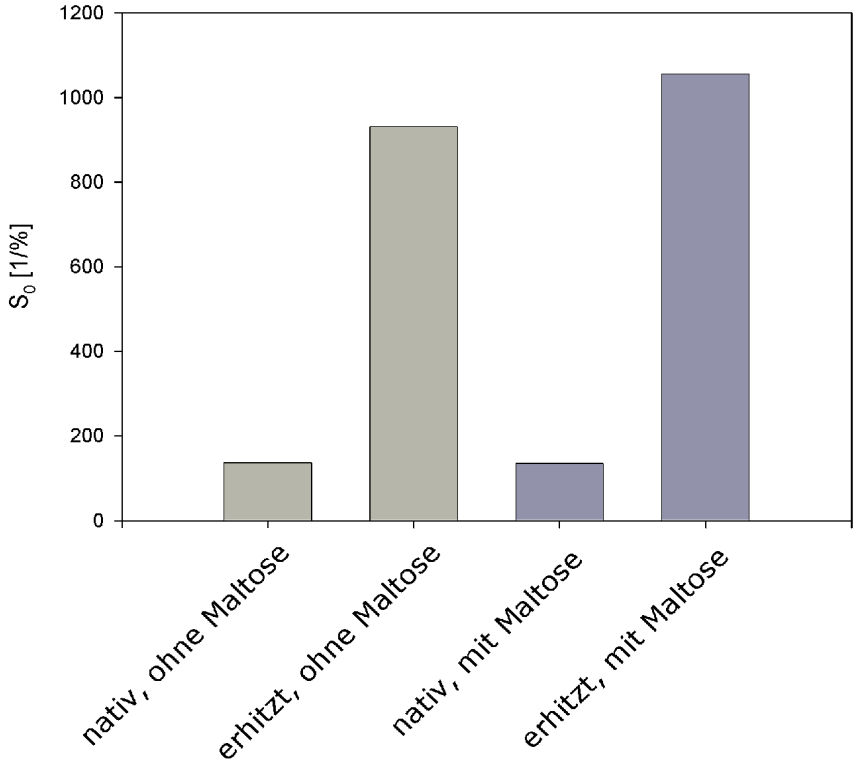

Abbildung 60: Oberflächenhydrophobizität der basischen Proteine von F. culmorum TMW 4.0111 in Abhängigkeit von der Vorbehandlung (Messung bei pH 4,5)

Auch für die basischen Proteine von *F. graminearum* TMW 4.0175 wurde die Oberflächenhydrophobizität in Abhängigkeit von der Vorbehandlung bestimmt. Hierbei wurden durchweg niedrigere Werte, als bei den vergleichbaren Proteinen von *F. culmorum* TMW 4.0111 festgestellt (Abbildung 61). Jedoch erbrachte auch hier die thermische Behandlung eine Steigerung der Oberflächenhydrophobizität. Trotz einer nicht extremen Oberflächenhydrophobizität haben diese Proteine eine massive Wirkung auf die Oberflächenspannung (vgl. 3.8.2.3).

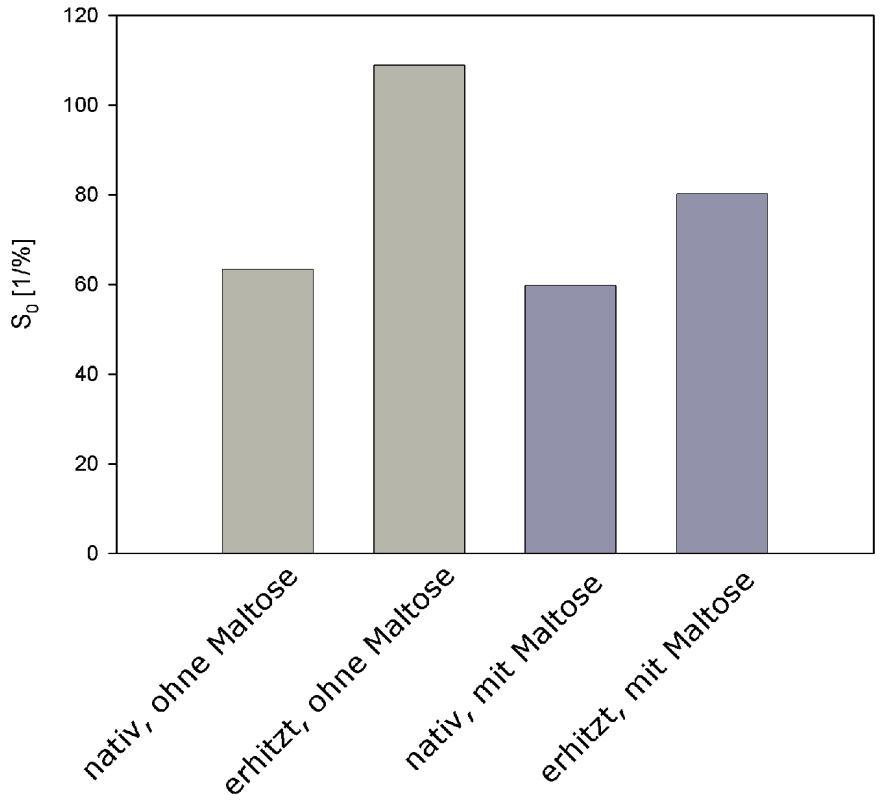

Abbildung 61: Oberflächenhydrophobizität der basischen Proteine von F. graminearum TMW 4.0175 in Abhängigkeit von der Vorbehandlung (Messung bei pH 4,5)

3.9.2 Korrelation der Oberflächenhydrophobizität mit dem Überschäumvolumen von infizierten und nicht infizierten Malzen

Befallsfreier Weizen wurde im Kleinmaßstab gemälzt. Ein Teil der Proben wurde im Weichwasser infiziert. Die Infektionen mit *Fusarium*-Arten wurden durch Zugabe von Konidiensuspensionen zum Weichwasser hervorgerufen. Die Konidiendichten im Weichwasser lagen bei *F. culmorum* und *F. graminearum* in der Größenordnung 10^6 Makrokonidien/Liter. Zusätzlich wurde Weizen mit *F. avenaceum, F. equiseti, F. poae* und *F. tricinctum* durch extremes Inokulum (10^7 Makrokonidien/Liter Weichwasser) infiziert. Die Grünmalze wurden nach einen Darrschema für helles Malz abgedarrt und das Gushingverhalten der Malze durch den Gushingtest nach Donhauser *et al*. (1990) bestimmt. Für die Bewertung der Oberflächenhydrophobizität der Malze wurde eine kleine Menge des Malzes fein

geschrotet (Bühler-Mühle, 0,2 mm Mahlspalt), dann 5,0 g der Probe mit 15 mL wässriger Kochsalzlösung (0,5 % w:v) eine Stunde im Überkopfschüttler bei Raumtemperatur extrahiert. Unlösliche, sedimentierbare Anteile wurden durch Zentrifugation für 15 min bei 27000 x g abgetrennt und der Überstand zur Analyse verwendet. Die Proteingehaltsbestimmung erfolgte photometrisch mittels des "Protein Quantitation Assay" (Bio-Rad). Die Proben wurden nachfolgend auf gleiche Proteingehalte eingestellt (meist um 3 mg/mL) und zur Analyse verwendet. Zwischen den Untersuchungen wurden die Proben auf Eis gelagert (kurzzeitig) oder bei -20 °C verwahrt.

Der Gesamtproteingehalt lag nach der photometrischen Bestimmung bei Malzen mit vorheriger Infektion durch *F. culmorum* oder *F. graminearum* um ca. 30 % niedriger, als bei den nicht infizierten Malzen. Die infizierten Malze wiesen überwiegend eine deutlich dunklere Farbe auf. Die Bestimmung der Oberflächenhydrophobizität erfolgte mittels des Fluoreszenzfarbstoffes ANS in 50 mM Citratpuffer pH 4,5, um die Messung bei bierähnlichem pH-Wert durchzuführen. Für Malz mit 2 mL Überschäumvolumen wurde eine Oberflächenhydrophobizität S_0 von ca. 7300 $\%^{-1}$ gemessen. Bei den Malzen mit starkem Gushing war S_0 auf Werte unter 1000 $\%^{-1}$ erniedrigt (Abbildung 62). Dies stand in Einklang mit der Beobachtung, dass Gushingbiere in der Regel weniger stabilen Schaum aufwiesen, wobei ein stabiler Schaum eine genügende Konzentration von Proteinen mit hoher Oberflächenhydrophobizität voraussetzt. Durch lineare Regression wurde $r^2=0,70$ bestimmt. Auch bei den Malzen mit extremer Infektion durch *F. avenaceum, F. equiseti, F. poae* und *F. tricinctum* konnte Gushing, ebenfalls verbunden mit erniedrigtem S_0 festgestellt werden, wobei hier S_0 minimal bei 4724 $\%^{-1}$ lag (*F. avenaceum*, 113 mL). Die Infektionen wurden hier mit zehnfach höherer Konidiendichte, als bei *F. culmorum* bzw. *F. graminearum* bewerkstelligt.

Die Korrelation von Oberflächenhydrophobizität und Überschäumvolumen im Gushingtest gibt Anlaß zu weiteren Untersuchungen, da für Praxismalze, die zu Gushing führten, ebenfalls niedrige Werte von S_0 gefunden wurden. Neben der Verbesserung der statistischen Qualität kann in weiteren Versuchen auch ein Datenpool für Gerstenmalze erstellt werden.

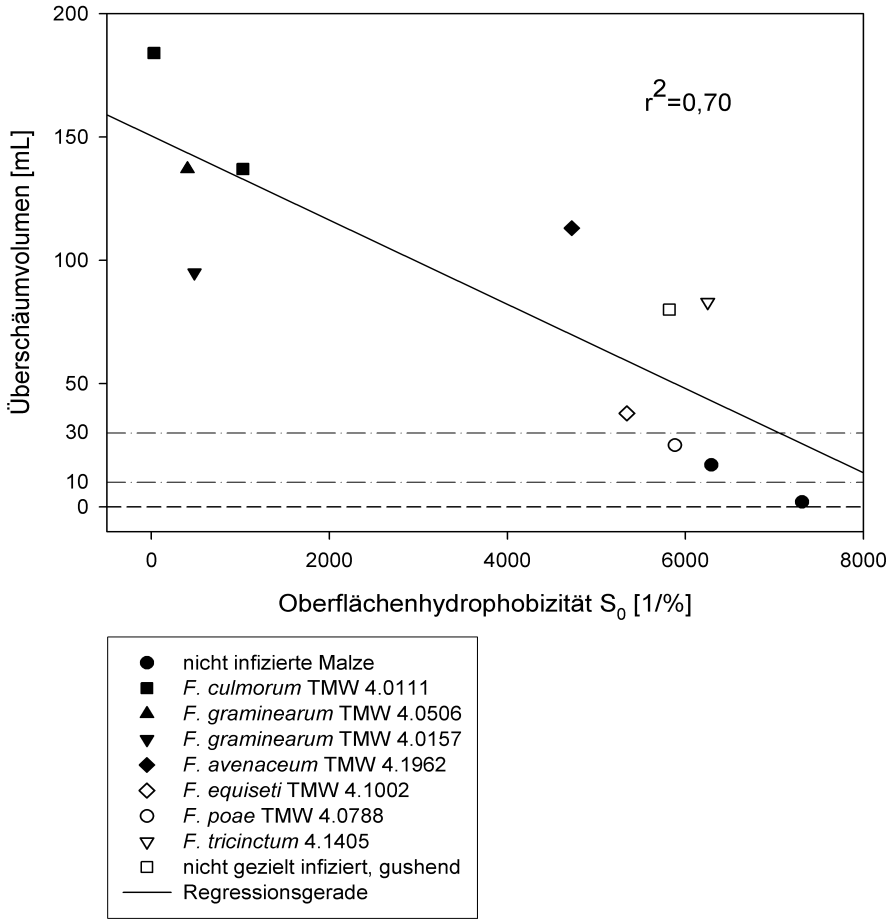

Abbildung 62: Überschäumvolumen von gezielt infizierten Weizenmalzen im Gushingtest in Abhängigkeit von der Oberflächenhydrophobizität S_0.

3.10 Erzeugung von Gushing durch Vergärung von Würze mit transgenen Hefen

Biere, die mit den Hefen *S. cerevisiae* sp. *uvarum* var. *carlsbergensis* Stamm W66/70, *S. cerevisiae* DSM3820 [pYX242-FcHyd3] #1064 und *S. cerevisiae* DSM3820 [pYX242-LTP1500] #961 hergestellt wurden, zeigten keinerlei Anzeichen von Gushing. Mit *S. cerevisiae* DSM3820 [pYX242] #970 hergestelltes Bier zeigte lediglich bei einer Flasche geringes Käppeln (3,5 mL). Konsistentes Gushing zwischen 10 und 26 mL wurde dagegen bei den mit *S. cerevisiae* DSM3820 [pYX242-FcHyd5] #858 festgestellt (Abbildung 63). Die Überschäumvolumen der verschiedenen Biere sind in Tabelle 19 wiedergegeben. Aliquote serieller Verdünnungen der Biere wurden anschließend auf nicht-selektivem ME-Agar und selektivem SC-DO-Agar ausplattiert, um zu untersuchen, welcher Anteil der

Hefezellen das Plasmid während der nicht-selektiven Bedingungen der Gärung verloren hatte. Bei allen Klonen war eine hoher Anteil (>>50 %) auf beiden Medien zum Wachstum befähigt. Damit war die Bildung der Proteine während der gesamten Gärung gesichert (Ergebnisse hier nicht gezeigt).

Tabelle 19: Überschäumvolumen der mit transgenen Hefen und einem kommerziellen Stamm hergestellten Biere. Überschäumvolumen aus 0,5 L NRW-Flaschen bei 5 g/L CO_2.

Hefe(-klon)	**Überschäumvolumen [mL]**				**Mittel**	**Standard-abweichung**
	Fl. 1	**Fl. 2**	**Fl. 3**	**Fl. 4**	**[mL]**	**[mL]**
S. cerevisiae sp. *uvarum* var. *carlsbergensis* Stamm W66/70	0	0	0	0	**0**	0
S. cerevisiae DSM3820 [pYX242] #970	0	0,3	3,5	0,5	**1,1**	1,6
S. cerevisiae DSM3820 [pYX242-**LTP1500**] #961	0	0	0	0,5	**0,125**	0,25
S. cerevisiae DSM3820 [pYX242-**FcHyd3**] #1064	0	0	0	0	**0**	0
S. cerevisiae DSM3820 [pYX242-**FcHyd5**] #858	14,2	25,0	10,1	26,2	**18,8**	7,9

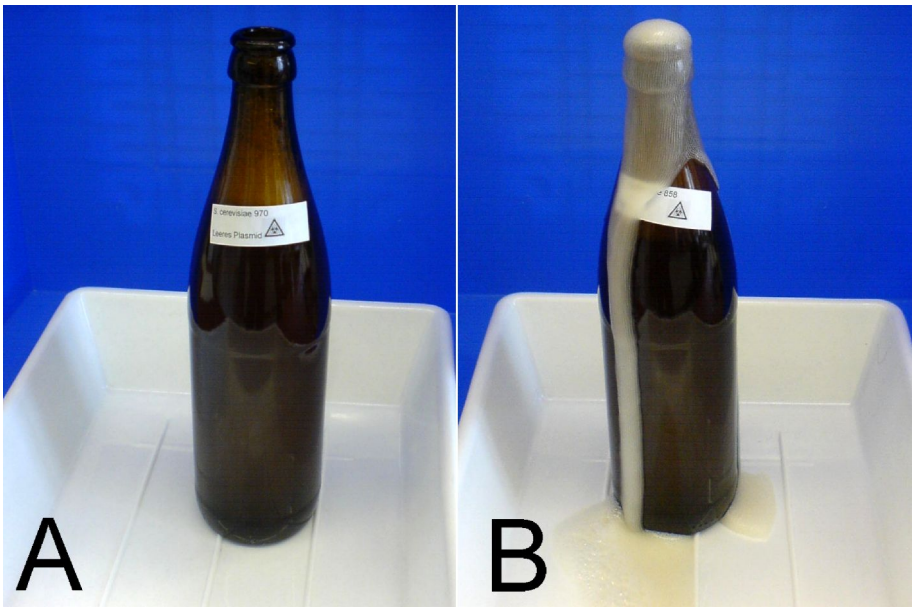

Abbildung 63: Gushingverhalten von Bieren nach Gärung mit transgenen Hefen.
A: S. cerevisiae DSM3820 [pYX242] #970 mit leerem Plasmid
B: S. cerevisiae DSM3820 [pYX242-FcHyd5] #858 mit Plasmid kodierend für das Klasse II-Hydrophobin FcHyd5

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden oberflächenaktive Proteine wie AfpA aus *F. culmorum* charakterisiert und hinsichtlich ihrer möglichen Rolle bei der Entstehung von Gushing untersucht. Aufgrund der Homologie des im Zuge dieser Arbeit neu beschriebenen Proteins AfpA zu PhiA-Protein von *E. nidulans* ist eine Beteiligung von AfpA an der Morphogenese des Pilzes zu erwarten. Die Oberflächenaktivität des Proteins, das Vorhandensein einer Signalsequenz zur Ausschleusung aus der Zelle und Ähnlichkeiten zum Verhalten von Hydrophobinen deuten auf eine Lokalisation in der Zellwand hin. AfpA wurde darüber hinaus in Malzen mit Gushingpotential gefunden. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass eine starke Veränderung der Eigenschaften solcher Proteine durch Modifikationen im Brauprozess zu erwarten ist. Ferner bewirkt die Infektion von Weizen mit *Fusarium* spp. während der Mälzung eine starke Verringerung der Oberflächenhydrophobizität von löslichen Proteinen im Malz. Diese Ergebnisse legen nahe, dass eine komplexe Wechselwirkung zwischen Pilz und Pflanze nötig ist, um die Voraussetzungen für das Entstehen von primärem Gushing zu schaffen. Weiterhin wurde gezeigt, dass es mit hydrophobin-produzierender Hefe möglich ist, gushendes Bier aus Würze herzustellen, die mit anderer Hefe auch zu stabilem Bier verarbeitet werden konnte.

4.1 Rolle der Oberflächenspannung des Bieres beim Entstehen von Gushing

Eine negative Korrelation der Oberflächenspannung mit dem Überschäumvolumen von Gushingbieren wurde von Weideneder (1992) festgestellt, wobei die Oberflächenspannung stabiler Biere um 48 mN/m lag, die von Gushingbieren mit Werten bis 41 mN/m gefunden wurde. Die Messungen wurden mit Platten- oder Ringgeometrie durchgeführt und konnten meßsystembedingt die Gleichgewichtsoberflächenspannung nicht bestimmen. Um den Einfluss einer gezielt erniedrigten Oberflächenspannung auf das Wildwerden von Bier zu untersuchen, wurden Detergentien unterschiedlicher Typen zu stabilem Bier (helles Lagerbier), sowie zur Kontrolle auch zu Mineralwasser, zugesetzt, die Ergebnisse sind unter 3.1 dargestellt. Sowohl das untersuchte Bier als auch das Mineralwasser

konnten durch diese Behandlung nicht zum Überschäumen gebracht werden. Versuche von Zepf (1998) mit einem karboniserten Heißwasser-Extrakt aus Trebern ergaben ein Überschäumvolumen um 10 mL für Tween 20 und kein Überschäumen bei SDS, beide mit 15 mg/mL zugesetzt. Die Wirkung von CTAB wurde im Rahmen der damaligen Versuche nicht bestimmt. Die Ergebnisse von Zepf (1998) stehen nicht in Widerspruch zu den hier erzielten. In Bier sind eine Vielzahl an Proteinen, deren unspezifische Abbauprodukte und Maillardprodukte, sowie weitere grenzflächenaktive Stoffe, aber auch Ethanol zu finden, so dass dort die Stabilisierung von Grenzflächen von unterschiedlichsten Substanzen bestimmt wird. Der CO_2-Gehalt liegt in Bier normalerweise um 5 g/L. Iim Heißwasserextrakt aus Trebern (Zepf, 1998) sind dagegen weder die Vielzahl an Proteinen und Abbauprodukten zu finden, wie in Bier, noch war Ethanol enthalten. Zudem wurde eine extreme Karbonisierung auf 9 g/L durchgeführt. In Mineralwasser war ein Auslösen von Gushing ebenfalls nicht zu erwarten, da einerseits in Mineralwasser keine hydrophoben Partikeln mit anhaftenden Gasresten vorliegen, an denen ein Anwachsen von Blasen stattfinden könnte. Andererseits sind kleine Detergensmoleküle nicht in der Lage, eventuell erzeugte Mikroblasen "gasdicht" zu stabilisieren, da ihre Mobilität in der Grenzfläche zu hoch ist: durch die laterale Bewegung entstehen vielmehr Lücken in der Grenzfläche, durch die Gasmoleküle entweichen können (Murray & Ettelaie, 2004). Damit schieden Effekte, die rein durch eine Verringerung der Oberflächenspannung bedingt sind als alleiniger Auslöser von Gushing aus.

4.2 Untersuchungen zur Bildung oberflächenaktiver Proteine von *Fusarium* spp.

Fusarium-Arten, besonders *F. culmorum* und *F. graminearum* sind als Auslöser von primärem Gushing bekannt (Niessen *et al.,* 1992). Dabei ist trotz einer Vielzahl von Untersuchungen nicht bekannt, auf welche Weise das primäre Gushing durch die Infektion von Weizen oder Gerste mit *Fusarium* sp. auf dem Feld oder durch Übertragung von infizierten auf gesunde Körner bei der Mälzung ausgelöst wird. Drei Wege sind nach Gjertsen *et al.* (1965) zur Auslösung von Gushing vorstellbar:

- Stoffe, die von *Fusarium* sp. ausgeschieden werden und Gushing auslösen, ohne mit dem Korn in Wechselwirkung zu treten

- Veränderungen am keimenden Getreide durch von *Fusarium* sp. ausgeschiedene Stoffe
- Interaktion von *Fusarium* sp. mit keimendem Getreide (Wachstum auf oder in das Korn hinein).

Diese Ansätze stellen die grundlegenden Möglichkeiten dar, lassen aber, ähnlich anderen Untersuchungen der damaligen Zeit, folgende Überlegungen außer acht:

- Das Entstehen von Gushing kann multifaktoriell bedingt sein, ein einzelner "Gushingfaktor" existiert möglicherweise gar nicht
- Gushing könnte statt durch Anwesenheit eines "Gushingfaktors" auch durch das Fehlen von einem oder mehreren Stoffen, die nicht gushendes Bier stabilisieren, ausgelöst werden.
- Möglicherweise existiert eine synergistische Wirkung zwischen fehlenden Substanzen im Malz und solchen, die vom Pilz ausgeschieden wurden.

Gjertsen *et al.* (1965) setzten 0,5 L eines zellfreien Kulturüberstandes (Gerstenextrakt-Medium) von *F. graminearum* zu einer Maische aus 10 kg Malz zu und erhielten kein Gushing im so hergestellten Bier. Ebenfalls erzielten die Autoren kein Gushing durch Zusatz von Kulturüberstand bzw. desintegriertem Myzel zum Weichwasser der Mälzung. Nur durch Wachstum des Myzels auf dem Getreide konnte Gushing provoziert werden. Daraus schlossen die Autoren, dass *in vitro*-Kulturen von *F. graminearum* keine gushing-verursachenden Substanzen enthalten. Dieser Versuch läßt zum einen außer acht, dass die Bildung solcher Stoffe abhängig von Isolat und Substrat sein kann, zum anderen kann die Konzentration solcher Stoffe in *in vitro*-Kulturen zu niedrig sein, um direkt den gewünschten Effekt zu bewirken.

4.2.1 Stammspezifische Unterschiede bei der Bildung oberflächenaktiver Proteine durch Isolate gushing-relevanter Pilze

Zu Beginn der Arbeiten mit *F. culmorum* und *F. graminearum* wurde die Isolatabhängigkeit der Bildung oberflächenaktiver Stoffe untersucht, da theoretische Überlegungen die Beteiligung von oberflächenaktiven Proteinen aus Pilzen am Gushing möglich erscheinen ließen (Hippeli & Elstner, 2002). Dabei

wurde eine Vielzahl von Isolaten der beiden Arten in YCB- bzw. Malzextraktmedium angezogen und der in 2.2.2 beschriebene Schnelltest auf die Bildung grenzflächenaktiver Proteine durchgeführt. Sofern oberflächenaktive, amphiphile Proteine ausgeschieden werden, ändert sich die Benetzbarkeit von Parafilm: der an sich extrem hydrophobe und damit wasserabstoßende Parafilm wird teilweise oder ganz von einem Flüssigkeitsfilm überzogen. Ein identischer Effekt konnte auch auf PTFE erzielt werden. Die Adsorption von Hydrophobinen aus Lösungen und Kulturüberständen an Parafilm, verbunden mit der Modifikation der Benetzbarkeit von Parafilm, wurde bereits von Martin *et al. (*1999) ausgenutzt, um Eigenschaften von Hydrophobinen zu untersuchen.

Der so durchgeführte Schnelltest zeigte ein breites Ergebnisfeld innerhalb der Isolate einer Art (vgl. 3.2.1). Innerhalb einer Art existierten Isolate, die keinerlei grenzflächenaktive Stoffe ausschieden, der Medienfilm lief in diesem Fall spurlos vom Parafilm ab. Daneben ließen sich jedoch in der gleichen Art auch Isolate finden, die zu extremer Veränderung der Grenzflächenaktivität fähig waren. Ähnliche Isolatspezifität konnte z.B. für die Bildung von Ochratoxin A durch *Aspergillus*-Arten beobachtet werden (Muehlencoert *et al.,* 2004). Der Medienfilm konnte den Parafilmstreifen vollständig benetzen, die Benetzung war vollständig und stabil. Die Fähigkeit zur Bildung grenzflächenaktiver Stoffe war neben der Abhängigkeit vom Isolat auch stark vom verwendeten Medium beeinflusst. Bei *F. graminearum* wurden Untersuchungen mit YCB- und Malzextraktmedium durchgeführt. In YCB-Medium entwickelte dagegen nur noch ein geringer Anteil der Isolate diese Wirkung. In Malzextraktmedium zeigten fast alle Isolate mindestens gut benetzende Wirkung auf Parafilm. Nahezu alle Isolate, die auf YCB-Medium positiv reagierten, waren auch auf Malzextraktmedium positiv. Bei *F. culmorum* konnte auf YCB-Medium für mehr als die Hälfte der Isolate eine starke benetzende Wirkung gefunden werden. Weiterhin unterlag bei beiden Arten und bei beiden Medien der benetzende Effekt gegenüber Parafilm einer zeitlichen Dynamik. Ein Teil der Isolate, die grenzflächenaktive Stoffe ausschieden, baute diese innerhalb der Versuchszeit wieder ab, bei anderen entwickelte sich der Effekt erst sehr spät. Dies bedeutete eine Abhängigkeit von Art, Isolat, Wachstumsbedingungen und Zeitpunkt der Beprobung. Ähnliche Effekte könnten sich daher bei der Infektion auf dem Feld bzw. während der Mälzung ergeben, bei der unterschiedliche Isolate wirken. Weiterhin ergeben sich noch Einflüsse aus dem Wachstum im Korn oder an der Spelze. Es gibt zusätzlich einen Einfluss von CO_2 auf das Wachstum von Fusarien, die bei Anreicherung der Atmosphäre bis über 10 %vol CO_2 eine extreme

Verstärkung des Wachstums erfahren (persönliche Mitteilung, Dr. E. Hoekstra, CBS). Die Summe dieser Einflüsse könnte erklären, weshalb nicht jede *Fusarium*-Infektion in gleichem Maße zu Gushing führt.

4.2.2 Auslösung von malzverursachtem Gushing durch das Arbeitsisolat

Mit dem als hauptsächlichem Arbeitsisolat selektierten *F. culmorum* TMW 4.0111 und weiteren Isolaten von *Fusarium* sp. wurden Versuchsmälzungen in Kleinmaßstab mit Infektion im Weichwasser durchgeführt, um die Fähigkeit dieser Isolate, malzverursachtes Gushing auszulösen, zu untersuchen. Für *F. culmorum* TMW 4.0111 wurde die Fähigkeit, Gushing auszulösen in zwei unabhängigen Mälzungen von Weizen belegt (vgl. 3.2.2). Das Isolat war damit für Untersuchungen zum Gushing geeignet.

4.3 Isolation oberflächenaktiver Proteine gushing-relevanter Pilze und Untersuchung ihrer Ähnlichkeit mit Hydrophobinen

Um das Spektrum der von *F. culmorum* gebildeten grenzflächenaktiven Proteine zu untersuchen, wurde ein unter 2.2.15 beschriebenes Präparationsverfahren genutzt, das bereits zur Anreicherung von Hydrophobinen etabliert ist: es werden Gasblasen ins zellfreie Medium eingeschlagen, z.B. mittels Waring-Blender (Spanu, 1997; Wösten *et al.,* 1993) oder über Pasteurpipetten ins Medium eingeblasen (Nakari-Setälä *et al.,* 1997). Dabei können sich grenzflächenaktive Proteine an den Blasen anreichern und mit dem entstehenden Schaum ausgetragen werden. Gegebenenfalls aggregieren die Proteine, wie für Hydrophobine üblich, irreversibel in der Grenzfläche und können aus Schaum und Drainage als Pellet durch Zentrifugation gewonnen werden. Das Einblasen von Gas mittels einer Pasteurpipette führte zu extrem großen, schnell aufsteigenden Blasen (Durchmesser > 5 mm), die auf das Gasvolumen bezogen wenig Oberfläche und durch schnellen Aufstieg wenig Kontaktzeit hatten. Deshalb wurden Methoden aus der Zerschäumungsanalyse angewandt (Gschwendtner, 2000; Backleh, 2001). Die in 2.2.15.1 beschriebene Zerschäumungssäule wurde angefertigt, mit der Blasen

mit einem Durchmesser << 1 mm im Medium erzeugt werden konnten.

Mit der unter 2.2.15.1 beschriebenen Apparatur wurden vorwiegend zellfreie Kulturüberstände von *F. culmorum* zerschäumt. Die Pilzkulturen wurden dabei in einem proteinfreien synthetischen Vollmedium durchgeführt, so dass jedes präparierte Protein auch pilzlichen Ursprungs sein mußte. Das in 2.2.1.3 beschriebene Medium ist ähnlich zu dem von Dons *et al.* (1979) unter Bezug auf Whitaker (1951) beschriebenen Medium, das zur Isolation von SC3-Hydrophobin aus *Schizophyllum commune* verwendet wurde. Durch die Zerschäumung der Medien aus *Fusarium*-Kulturen konnte mechanisch stabiler Schaum erhalten werden (vgl. 3.3.1.1). Die Proteinkonzentration im Medium war so niedrig, dass mittels des Bio-Rad Protein Quantitation Assay bzw. Silberfärbung nach SDS-PAGE kein positiver Nachweis möglich war (Nachweisgrenzen ca. 0,2 mg/mL bzw. ca. 10 µg/mL, Daten hier nicht gezeigt). Der Nachweis von Proteinen aus dem Spumat war problemlos möglich. Durch die Möglichkeit, stabile Schäume zu erzeugen, konnte belegt werden, dass Fusarien oberflächenaktive Proteine bilden und ausscheiden. Die Zerschäumung mit der beschriebenen Apparatur führte gleichzeitig durch Adsorption der Proteine an den Grenzflächen im Schaum zu einer massiven Konzentrationserhöhung im Spumat.

Aus dem Schaum konnten durch Zentrifugation, wie auch für Hydrophobine beschrieben (Wösten *et al.* 1993), aggregierte Proteine sedimentiert werden. Die Sedimente konnten ohne nennenswerte Auflösung mit Wasser gewaschen und resedimentiert werden. Die wasserunlöslichen Aggregate konnten durch Behandlung mit Trifluoressigsäure partiell wieder monomerisiert und löslich gemacht werden. Diese Behandlung ist ebenfalls Teil der Standardprozeduren für die Präparation von Hydrophobinen (Wösten *et al.,* 1993; Mankel *et al.,* 2001). Die so löslich gemachten Proteine wurden mittels Gelelektrophorese untersucht.

Die Untersuchung mittels Gelelektrophorese zeigte mehrere Proteine in Größenbereichen, die für die elektrophoretische Mobilität von Hydrophobinen typisch sind. Für Hydrophobine werden apparente Molekulargewichte berichtet, die extrem von der tatsächlichen Masse abweichen, wie in Tabelle 20 dargelegt.

Tabelle 20: Vergleich scheinbarer und tatsächlicher Molekülmassen von Hydrophobinen

Organismus	Protein	apparente Masse [kDa]	tatsächliche Masse [kDa]	Quelle
Magnaporthe grisea	MPG1	15	9,3	Talbot *et al.* 1996
Ophiostoma ulmi	CU	14,4	7,5	Temple *et al.* 1997
Cladosporium fulvum	HCF-1	10	8	Spanu 1997
Schizophyllum commune	SC3p	24	14,2	Wösten *et al*. 1993, de Vocht et al. 2000

Bei *F. culmorum* TMW 4.0102 wurde das hauptsächlich im Schaum vertretene, aggregierende Protein mit einer scheinbaren Masse von 14 kDa durch N-terminale Edman-Sequenzierung untersucht. BLAST-Recherchen unter verschiedenen Randbedingungen blieben ergebnislos, ebenso *tblastn*-Recherche ("*protein query vs. translated database*"), bei der das Protein auf DNS-Codon übersetzt wurde, um mit der Übersetzung in hinterlegten DNS-Sequenzen zu suchen. Der Versuch aus der Aminosäuresequenz Oligonucleotid-Primer abzuleiten und auf dem Wege der Sequenzierung von PCR-Produkten die Gensequenz des Proteins zu erhalten blieb ebenfalls erfolglos (Ergebnisse nicht gezeigt). Es handelte sich daher um ein bislang unbekanntes Protein, dem weder eine vollständige Sequenz, noch biologische Funktion zugeordnet werden konnten. Bestimmung der Sequenz und der biologischen Funktion dieses Proteins geben Anlaß zu weiteren Untersuchungen.

An Kulturen von *F. culmorum* TMW 4.0111 wurde ein Abfall der pH-Werte der Medien von pH 5,5 auf pH 1,6-1,7 innerhalb der siebentägigen Kulturdauer beobachtet. Da die Zerschäumung bei pH 1,6-1,7 extreme Bedingungen darstellte, wurde zunächst die Abhängigkeit des bei der Zerschäumung aggregierenden Proteinspektrums vom pH-Wert untersucht, wie in 3.3.1.3 beschrieben. Dabei konnte bei pH 1,7 ebenfalls ein ca. 14 kDa großes Protein detektiert werden, bei pH 6,0 stellte ein Protein mit ca. 16-17 kDa den Hauptanteil der aggregierten Proteine. Die pH-Wert-Abhängigkeit der Präparationsleistung wurde in der Folge zur selektiven Anreicherung dieser Proteine für die Edman-Sequenzierung ausgenutzt (vgl. 3.3.1.4). Die Sequenzierung der N-Termini ergab 23-24 Aminosäuren lange Bereiche. In späteren Versuchen wurden diese Proteine auch

chromatographisch gereinigt und konnten zur Bestimmung der Sequenzen interner Peptide verwendet werden (vgl. 3.3.1.6). Auf der Basis der Sequenzen der N-Termini und der internen Peptide konnte für das 17 kDa große Protein AfpB (GenBank Accession DQ336149) eine Homologie zu einem hypothetischen Protein, Protein-ID XP_384911.1, aus *G. zeae* PH-1 (Anamorph: *F. graminearum;* die einzige momentan verfügbare *Fusarium*-Gesamtsequenz) gefunden werden, wobei für dieses Protein ebenfalls keine biologische Funktion bekannt ist. Auf der Basis des für das 14 kDa-Protein von *F. culmorum* TMW 4.0111 bekannten N-Terminus konnte eine Homologie zu einem hypothetischen, basischen Protein in *F. graminearum* gefunden werden. Homologien zu den für dieses Protein erhaltenen Peptidsequenzen konnten in der Sequenz dieses hypothetischen Proteins jedoch nicht gefunden werden. Daher besteht die Möglichkeit, dass ein partiell hydrophobin-homologes Stück von einem ko-migrierenden Hydrophobin stammt.

Ein ebenfalls im Schaum von Kulturen von *F. culmorum* TMW 4.0111 zu findendes, 20 kDa großes Protein, bezeichnet als AfpA (GenBank Accession DQ336148) wurde N-terminal und intern sequenziert. Dieses Protein ist homolog zu dem hypothetischen Protein XP_388298.1 aus *G. zeae* PH-1, wobei für dieses Protein ebenfalls keine biologischen Funktionen bekannt sind. AfpA zeigte Homologie zu weiteren hypothetischen Proteinen aus Pilzen. In den Sequenzen dieser Proteine existieren konservierte Bereiche neben variablen Regionen. Ähnlichkeiten von AfpA und PhiA aus *E. nidulans* als Vertreter dieser Proteinklasse waren auch im Hydrophobizitätsplot und der theoretisch ermittelten Verteilung von ß-Faltblattbereichen feststellbar. Insbesondere der hohe Anteil von ß-Faltblatt an der Gesamtstruktur erklärte die Bereitschaft von AfpA zu aggregieren bzw. zur Einlagerung in Grenzflächen. Der Wechsel zwischen ß-Faltblatt und ungeordneten Bereichen wurde auch bei Hydrophobinen, stellvertretend SC3-Hydrophobin aus *Sc. commune*, festgestellt. Daher kann davon ausgegangen werden, dass AfpA das erste präparierte Protein einer bislang nicht beschriebenen Proteinklasse ist, die ohne Homologie in den Aminosäuresequenzen dennoch strukturelle bzw. funktionelle Ähnlichkeiten zu Hydrophobinen aufweist. Die Beschreibung der biologischen Funktion und Lokalisation der Proteine dieser Klasse gibt Anlass zu weiteren Untersuchungen.

In allen Fällen wurden die gereiften, sekretierten Proteine, d.h. ohne das Signalpeptid, gefunden. Bei einer Peptidsequenz der untersuchten Proteine wurde

ein für die Klasse der Hydrophobine typisches Muster gefunden (*F. culmorum* TMW4.0111, 14 kDa, Fraktion 15). Gleichwohl hatten auch die anderen in dieser Arbeit gefundenen Proteine hinsichtlich Grenzflächenaktivität, Aggregation, Löslichkeit durch TFA und Größe Eigenschaften, die für Hydrophobine erwartet wurden. Aus einer entsalzten Lösung der Proteine von *F. culmorum* TMW 4.0111 konnte durch Durchströmung einer Membran mit einer Ausschlußgrenze von 3 kDa ein makroskopisch sichtbarer Proteinfilm erhalten werden. Dieser Film war über Tage stabil in wässriger Lösung und gegenüber heißer SDS-Lösung (4 % w:v, 85 ° C, 17 min) und zeigte damit wiederum Eigenschaften, die von Hydrophobin-Aggregaten erwartet werden. Erst durch Behandlung mit 8 M Harnstoff konnte der Film aufgelöst werden und zeigte nach Gelelektrophorese Anteile des 14 bzw. 17 kDa-Proteins. Die isoelektrische Punkte der Proteine aus *F. culmorum* TMW 4.0111 wurden durch 2D-Gelelektrophorese mit pH 3,4 für das 14 kDa-, ca. pH 9 für das 20 kDa und ca. pH 8,5 für 17 kDa-Protein bestimmt (vgl. 3.5). Ein in zahlreichen 2D-Gelen von parafilm-benetzenden *F. graminearum*-Isolaten zu findendes Protein konnte ebenfalls nur mit einem hypothetischen Protein in Verbindung gebracht werden (vgl. 3.3.2). Die Aufklärung der biologischen Funktionen der in dieser Arbeit untersuchten Proteine gibt daher noch Anlaß zu weiteren Untersuchungen.

4.4 Beeinflussung des Gushings durch Proteine aus *F. culmorum* in Abhängigkeit von der Modifikation

Um den Einfluss dieser grenzflächenaktiven Proteine aus *F. culmorum* TMW 4.0111 auf Gushing zu untersuchen, war die Reinigung größerer Mengen nötig, als die Zerschäumung aus den Medien liefern konnte. Die im Schaum zu findenden Proteine konnten aus dem Medium gleichfalls durch Ammoniumsulfatfällung präzipitiert werden. Die präzipitierten Proteine zeigten kein von TFA-behandelten Proben verschiedenes Laufverhalten in der SDS-PAGE. Ein Teil des Präzipitats rahmte auf und konnte von der Flüssigkeitsoberfläche abgehoben werden, wobei dieser Anteil die gleiche Zusammensetzung aufwies, wie das sedimentierende Präzipitat. Das Präzipitat hatte eine filzige, fädige Struktur und ließ sich nur teilweise wieder in Puffern für die Chromatographie auflösen. Der unlösliche Anteil konnte teilweise durch 8 M Harnstoff gelöst werden (Daten nicht gezeigt).

Zur Trennung der drei grenzflächenaktiven Proteine wurde die in 2.2.11.1 und 2.2.11.2 beschriebene Methode entwickelt, mit der es möglich war, alle drei Proteine in einem Lauf auf einem stark basischen Anionentauscher zu trennen (vgl. 3.3.3.3). Dabei kam als flüchtiges Puffersystem Triethylamin/CO_2 zum Einsatz, so dass das Puffersystem bis auf die Elutionssubstanz NaCl durch Lyophilisation völlig entfernt werden konnte. Probleme traten durch Verluste auf der Ionenaustauschersäule auf. Die aufgebrachten Proteine neigten zur teilweise irreversiblen Aggregation auf dem Säulenmaterial, unabhängig davon, ob polymere Kunststoffträger oder derivatisierte Sepharose eingesetzt wurde. Die Aggregation der Proteine auf unterschiedlichen Säulenmatrices war offensichtlich mit der Grenzflächenaktivität und Aggregierbarkeit der Proteine in Grenzflächen verknüpft. Die Verluste im Zuge der gesamten Reinigung lagen bei über 90 % bezogen auf die eingesetzte Proteinmenge. Mit dieser Methode war es gleichwohl möglich, eine hinreichende Menge dieser Proteine zu fraktionieren, um ihren Einfluss auf Gushing zu untersuchen. Aufgrund der hohen Verluste bei der chromatographischen Trennung wurde in einem späteren Teil der Arbeit die Fraktionierung dieser Proteine durch trägerfreie isoelektrische Fokussierung mittels eines Rotofor-Geräts (Bio-Rad) etabliert (vgl. 2.2.12 und 3.6). Dabei konnten je Lauf ca. 100 mg je Protein gewonnen werden. Das saure Protein ließ sich gut abtrennen, wohingegen die beiden basischen Proteine von *F. culmorum* TMW 4.0111 aufgrund ihres ähnlichen pIs in den gleichen Fraktionen vorlagen. Eine verwandte Methode wurde bereits von Weideneder (1992) zur Trennung von Proteinen aus Fusarien-infiziertem Weizen eingesetzt. Weideneder konnte Gushing nur mit Proteinfraktionen mit pH/pI<4 erzeugen.

Die chromatographisch gereinigten Proteine wurden in nativer und durch Maillardreaktion mit Maltose modifizierter Form zu stabilem und zu leicht gushendem Bier (helles Lagerbier) in Mengen von ca. 1 mg/L für 14 kDa bzw. 20 kDa und 0,12 mg/L für 17 kDa zugesetzt. Diese Bierproben und Kontrollen wurden dann für 48 h geschüttelt und nach einer einstündigen Ruhepause geöffnet. Eine mechanische Behandlung durch Schütteln wurde als unumgänglich betrachtet, da die Entstehung von Gushing ohne Schütteln offenbar kaum möglich ist (Fischer, 2001; Thorne & Helm, 1957). Der Zusatz der nativen Proteine mit 14 kDa und 20 kDa führte zu einer leichten Erhöhung des Überschäumvolumens beim Gushingbier. Die Proteine, die in Anwesenheit von Maltose einer Hitzebehandlung unterzogen wurden, erhöhten das Überschaumvolumen des Gushingbieres massiv (vgl. 3.4). In gushing-stabilem Bier konnte durch diese

Zusätze kein Gushing induziert werden. Dies deutet darauf hin, dass es sich bei Gushing um ein multifaktorielles Problem handelt, bei dem von Pilzen ausgeschiedene Stoffe nur einen Beitrag darstellen, nicht jedoch die alleinige Ursache. Die zusätzliche Erhöhung der Überschäumvolumina durch Erhitzen mit Maltose zeigte einen Einfluss der Modifikation auf die funktionellen Eigenschaften der Proteine. Zu den Eigenschaften, die durch die Maillardreaktion verändert werden, zählen der isoelektrische Punkt durch die Reaktion zwischen dem Zucker und basischen Aminosäuren, die durch Kopplung eines hydrophilen Zuckers veränderte Hydrophobizität, aber auch die teilweise Fixierung thermisch induzierter Umfaltungen durch die Zuckeraddukte, bis hin zu den Gelbildungseigenschaften von Proteinen (Baier & McClements, 2005). Im Extremfall können unterschiedliche Proteine durch Maillardreaktion über Zucker mit mehreren reaktiven Enden verknüpft werden. Zwar wurden schon Untersuchungen über den positiven Einfluss der Maillardreaktion auf die Aufschäumbarkeit von Getreideproteinen, insbesondere LTP1, durchgeführt (Marion *et al*., 2001). Es sind jedoch keine Erkenntnisse über den Einfluss der Maillardreaktion auf Gushing bekannt. Eine erste Überlegung, ob Melanoidine am Gushing beteiligt sind, die nicht durch weitere Untersuchungen gestützt wurde, stammt von Beattie (1951). In der genannten Quelle wird die Modifikation von Proteinen durch Maillardreaktion jedoch nicht speziell angesprochen. Curtis *et al.* (1961) stellten ebenfalls fest, dass Gushing vermehrt bei Ales aus dunklen Malzen auftrat, der Effekt jedoch nicht vom verwendeten Karamellzucker herrührte. Eine derartige Wirkung von Karamellzucker ist auch unwahrscheinlich, da Karamell nicht über Reaktion von Zuckern mit Proteinen, sondern über direkte Erhitzung von Zuckersirup, ggf. mit Ammoniumsalzen, hergestellt wird. Amaha *et al.* (1973) stellten eine Verstärkung der Gushingwirkung des von ihnen isolierten, 15 kDa großen "Gushingfaktors" aus *Rhizopus* sp. Strain 207 (ohne nähere Bestimmung der Art) fest, nachdem dieser bei pH 4 und pH 6 für 1 h bei 100 °C behandelt wurde. Bei pH-Werten ≤ 4 ist jedoch der Einfluss der Maillardreaktion deutlich reduziert. Die Autoren geben nicht an, ob die Erhitzung in einer Lösung mit Zuckeranteil durchgeführt wurde. Kitabatake & Amaha (1977) berichteten von Untersuchungen zur Zerstörbarkeit eines Gushingfaktors (*Nigrospora* strain No. 207, 16,5 kDa, 16 Cysteinreste in 8 Brücken, 166 Aminosäuren, pI 4,0) aus *Nigrospora* sp. durch chemische Modifikationen. Dabei wurde ein verschwindender Einfluss auf die Gushingauslösung durch Blockierung der freien Aminogruppen mit Maleinsäureanhydrid bzw. Trinitrobenzolsulfonat erzielt. Genau diese reaktiven Gruppen wären auch Ziel der Maillardreaktion. Durch reduktive oder oxidative

Zerstörung der Disulfidbrücken verschwand die Aktivität völlig, ebenso durch Veresterung freier Carboxylgruppen. Dadurch wird nahegelegt, dass die Aktivität zumindest dieser Substanz von ihren Säurefunktionen oder deren Ladung abhängig ist. Untersuchungen zum Einfluss der Maillardreaktion wurden in der zitierten Arbeit nicht durchgeführt. Hippeli & Elstner (2002) postulierten aufgrund der berichteten Eigenschaften, dass der *Nigrospora*-Gushingfaktor ein Hydrophobin-Dimer sei. Dem widerspricht partiell, dass die Aggregation von Hydrophobin-Monomeren durch Fehlen der Disulfidbrücken nicht gestört wird. Die Lokalisation in der Zellwand hingegen wird durch fehlende Disulfidbrücken bei MPG1 aus *M. grisea* verhindert (Kershaw *et al.,* 2005). Die Modifikationen, die u.a. durch die Maillardreaktion im Brauprozeß eintreten können, spielen möglicherweise eine entscheidende, wenngleich wenig in Erwägung gezogene Rolle in der Aktivität gushing-auslösender Stoffe. Versuche, die sich auf das alleinige Zusetzen nativer, nicht prozessierter oder nicht prozessrelevant vorbehandelter Stoffe zu Bier gründen, um deren Einfluss auf Gushing zu bewerten, sind wenig aussagekräftig, insbesondere wenn die zu untersuchenden Stoffe gereinigt und *in vitro* behandelt werden können.

4.5 Modifikation der Proteine aus *F. culmorum* TMW 4.0111 durch Maillardreaktion

Die Ergebnisse der 2D-Gelelektrophorese deuten darauf hin, daß eine Modifikation von AfpA durch die thermische Behandlung mit Maltose in ungepufferter wässriger Lösung erfolgt. Durch diese Behandlung entstand aus einem Spot ein perlenkettenartige Reihe von Spots, die im pI verschieden waren. Neben der Maillardreaktion kann auch Desaminierung eine derartige pI-Verschiebung bewirken. Eine Hitzebehandlung des Proteins in reinem Wasser erzeugt keine pI-Verschiebung, so dass hier Maillard-Reaktion naheliegend ist. AfpB zeigte bereits in nativem Zustand Isoformen, die das Vorhandensein von Glykosylierungen nahelegen. Diese eventuell bereits vorhandene Glykosylierung bedingte möglicherweise, neben der geringeren Konzentration im Supplementierungsversuch, den kaum vorhandenen Unterschied zwischen nativer und behandelter Probe. Das 14 kDa große Protein zeigte die Verstärkung eines zweiten Spots durch diese Behandlung, sofern die Auflösung des Gels diese Interpretation zulässt. Eine ähnliche Bildung von Maillardprodukten konnte auch

nach thermischer Behandlung dieser Proteine (14 und 20 kDa) in einer synthetischen Bierwürze gezeigt werden. Die Zusammensetzung der synthetischen Würze imitierte die Zusammensetzung echter Würze in den organischen Säuren und Zuckern. Der pH-Wert betrug 5,5.

Eine besonders deutliche Bildung Modifikation der drei von *F. culmorum* TMW 4.0111 ausgeschiedenen Proteine konnte durch thermische Behandlung der Proteine in Phosphatpuffer pH 6,0 mit 12 % Maltose für 1 h bei 95 °C hervorgerufen werden. Dabei war vom basischen nativen AfpA ausgehend eine Kette von Spots bis in den Neutralbereich festzustellen, die zudem mit sinkendem pH-Wert an Größe zunahmen. Zunehmende Größe in Verbindung mit sinkendem pI legt die Bildung von Maillardprodukte äußerst nahe. Ein ähnlicher Verlauf, jedoch in der Intensität der Spots stark abgeschwächt, war bei AfpB feststellbar. Hier reichte die Verlagerung der Spots bis in den leicht sauren Bereich. Eine analoge Modifikation basischer Proteine in Brauprozeß wurde auch für LTP1 vorhergesagt (Hippeli & Elstner, 2002; Marion *et al.,* 2001). Beim 14 kDa-Protein ergab sich lediglich eine Drift um ca. 1,4 pH-Einheiten von pH 3,4 auf ca. pH 4,8 auf einen isolierten zweiten Spot. Diese Drift auf weniger sauren pI kann nicht durch die Wirkung der Maillardreaktion erklärt werden. Dieses Protein liegt allerdings im Größen- und pI-Bereich der von Weideneder (1992) aus *Fusarium*-infiziertem Weizen isolierten, gushing-induzierenden Proteine. Die unter prozeßähnlichen Bedingungen möglichen Veränderungen der aus *F. culmorum* TMW 4.0111 isolierten Proteine konnten so gezeigt werden. Die 2D-Gelelektrophorese wurde als wirksames Werkzeug zum Sichtbarmachen technologisch erzeugter Modifikationen an Proteinen eingesetzt. Ein ähnlicher Ansatz wurde von Fayle *et al.* (2000) in Untersuchungen mit - allerdings praxisfernen - Substraten RNAse A und Dehydroascorbinsäure bzw. Cycloten verfolgt, um die Eignung der 2D-GE zur Beurteilung der Maillardreaktion darzulegen. Perrocheau *et al.* (2005) wendeten 2D-GE zur Untersuchung von Getreide-, Malz- und Bierproteinen in ähnlihce Weise an, wie Zapf *et al.* (2005).

4.6 Nachweis der Proteine aus *F. culmorum* TMW 4.0111 mit polyklonalen Antikörpern

Für die Untersuchung, ob diese Proteine, mit denen bestehendes Gushing verstärkt

werden konnte, auch in zu Gushing führenden Malzen vorhanden sind, wurden in Zusammenarbeit mit der Bundesanstalt für Züchtungsforschung, Aschersleben (Dr. F. Rabenstein, Dr. S. Rohde), polyklonale Antikörper gegen die Proteine mit 14 kDa und AfpA aus *F. culmorum* TMW 4.0111 hergestellt (vgl. 3.7). Die Ergebnisse zu Untersuchungen der Reaktivität der Antiseren mit Proteinen aus unterschiedlichen Isolaten von *F. culmorum* und *F. graminearum* sind in 3.7.2 dargestellt. Das Antiserum gegen 14 kDa zeigte eine Kreuzreaktion mit AfpA, obgleich die zur Immunisierung eingesetzten Proteine hochgradig gereinigt waren. Eine Detektion von Proteinen aus *F. graminearum* und *F. culmorum* war mit beiden Antiseren möglich; eine bessere Leistung war mit dem AfpA-Antiserum aufgrund der gleichmäßigeren Reaktion zu erwarten.

Die Antiseren besaßen keine Kreuzreaktionen zu Proteinen aus den Kulturüberständen von *F. avencaeum, F. equiseti* und *F. tricinctum*. Lediglich mit einem ca. 35 kDa großen Protein aus *F. poae* wurde eine deutliche Kreuzreaktion des 14 kDa-Antiserums festgestellt (vgl. 3.7.3). Der Wert der Antiseren für Analysen mittels Western Blots wird dadurch nicht vermindert, da in diesem Fall die Position der Bande eine Aussage über die Richtigkeit der Reaktion erlaubt.

4.6.1 Detektion von Maillardprodukten der antigenen Proteine

In 3.7.4 beschriebene Versuche beschäftigten sich mit der Detektierbarkeit von thermisch behandelten Proteinen und Maillardprodukten der Proteine durch die Antiseren, da beide Einflüsse im Brauprozeß zu erwarten sind. Zwischen nativem Protein und in Abwesenheit von Zuckern erhitztem Protein konnten keine Unterschiede in Laufverhalten und Reaktivität festgestellt werden, die Proteine waren hitzestabil. Die Antiseren waren in der Lage, sowohl die hitzebehandelten Proteine als auch deren Maillardprodukte zu detektieren. Dabei ergaben die Maillardprodukte der Proteine nicht mehr eine diskrete Bande, wie bei nativem oder erhitztem Protein. Sie zeigten vielmehr ein bis ca. 5 kDa über die Position der Originalbande reichendes quasikontinuierliches Spektrum, das durch die kovalente Bindung von Maltoseresten in unterschiedlicher Anzahl an das Protein bedingt sein mußte. Gleichzeitig war die Stärke der Silberfärbung für diese Banden überproportional reduziert. Auch dieser Effekt sprach für das Vorliegen von Maillardprodukten, da die Silberfärbung, insbesondere die Aktivierung mit

Formaldehyd, genau wie die Maillardreaktion, an freien Aminogruppen angreift. Ein weiteres Ergebnis der Detektion mit den Antiseren war die Anfärbung von zahlreichen SDS-stabilen Oligomeren der untersuchten Proteine, die die Neigung dieser Proteine zur Aggregation belegen. Die Oligomere konnten weder durch Silberfärbung noch durch die Blotfärbung mit CBB sichtbar gemacht werden. Oligomere dieser Art konnten auch in LTP-Proben aus Weizen mit Western Blots gezeigt werden (persönliche Mitteilung, Dr. D. Hecht). Eine Kreuzreaktion eines polyklonalen Antikörpers gegen LTP1500 aus Weizen (*Triticum aestivum*) mit 14 kDa-Protein und AfpA aus *F. culmorum* TMW 4.0111 wurde ebenfalls festgestellt (Daten hier nicht gezeigt). In wie weit daraus strukturelle oder funktionelle Ähnlichkeiten zwischen LTP1500 und den *Fusarium*-Proteinen hergeleitet werden können, muß in weiteren Versuchen geklärt werden.

4.6.2 Nachweis von gushing-beeinflussenden Proteinen aus *Fusarium* spp. in Rohstoffen

Ziel dieses Versuches war es, festzustellen ob die grenzflächenaktiven, aggregierbaren und gushing-beeinflussenden Proteine, gegen die die Antiseren gerichtet sind, auch in Malzen enthalten waren, die zu Gushing führten. Dazu wurden zunächst Proben aus Infektionsversuchen mit Weizen verwendet. Feinschrot dieser Malze wurde extrahiert und die extrahierten Proteine mittels Western Blot untersucht. Die Ergebnisse des Versuchs sind in 3.7.5 wiedergegeben. Dabei konnten mit dem 14 kDa-Antiserum keine Banden deutlich angefärbt werden. Aufgrund des Vorhandenseins von Banden des 20 kDa-Proteins in infiziertem gushendem Malz und dem Fehlen in befallsfreiem Malz kann davon ausgegangen werden, dass dieses Protein auch durch Fusarien beim Wachstum auf dem Korn gebildet wird. Ein positiver Nachweise konnte auch bei mehreren gushing-verursachenden Praxismalzen geführt werden. Darüber hinaus konnte dieses Protein über den gesamten Maischprozeß hinweg nachgewiesen werden, ein Abbau fand nur in unerheblichem Maße statt. Gleichwohl besteht noch Bedarf, in fortführenden Versuchen weitere Proben, auch und vor allem aus der Praxis, auf ihre Reaktion zu untersuchen.

Die Fokussierung auf dieses Protein wegen seiner Grenzflächenaktivität und Aggregationsneigung bei der Zerschäumungsanalyse kann damit als gerechtfertigt

angesehen werden. Folglich kann auch die Zerschäumungsanalyse als wirksames Werkzeug bei der Suche nach am Gushing beteiligten Stoffen eingesetzt werden. Bislang sind nur wenige weitere Antikörper-basierte Untersuchungen zum Gushing bekannt. Ein ELISA basierend auf einem Antikörper gegen eine Hydrophobin aus *Trichoderma reesei* VTT-D-74075 wurde zwar zum Patent angemeldet, aber bislang offenbar nicht bis zur Marktreife entwickelt (Haikara *et al.,* 1999). In Untersuchungen der gleichen Arbeitsgruppe von Kleemola *et al.* (2001) wurde Gushing durch Zusatz von Hydrophobinen aus *T. reesei* VTT-D-74075 bzw. *Nigrospora* sp. VTT-D-79122 zu Bier ausgelöst. Die Hydrophobine wurden jedoch vorher keinerlei Behandlung unterzogen, die den Brauprozeß simuliert und waren durch RP-HPLC gereinigt worden, die meist Proteine denaturiert. Ein in der zitierten Arbeit beschriebener weiterer ELISA zur Früherkennung von Gushing-verdächtigen Gersten basiert auf einem Antikörper gegen ein Hydrophobin aus *F. poae.* Das Gushing-Potential der Gersten wurde mittels des mittlerweile in Frage gestellten Carlsberg-Tests bestimmt. *F. poae* wird zudem nicht als Gushing-Verursacher angesehen. Nach dem von Kleemola *et al.* (2001) publizierten Abstand zwischen den ersten beiden Cysteinresten handelt es sich um ein Klasse II-Hydrophobin aus *F. poae.* Die fehlende Beteiligung von *F. poae* am Gushing und die extrem geringen Homologien von Klasse II-Hydrophobinen machen die starke Fluktuation der ELISA-Resultate von Kleemola *et al.* (2001) erklärbar.

4.7 Oberflächenaktivität von Proteinen aus *F. culmorum* und *F. graminearum*

Da, wie in 4.1 bereits erwähnt, niedrige Oberflächenspannung nicht auslösendes Moment für Gushing ist, sondern eine möglicherweise damit verknüpfte Erscheinung, wurde die Wirkung der aus *F. culmorum* TMW 4.0111 und *F. graminearum* TMW 4.0175 isolierbaren Proteine auf die Oberflächenspannung untersucht. Die Proteine wurden dazu durch präparative isoelektrische Fokussierung fraktioniert. Die Abschätzung der Auswirkung der Proteine auf die Oberflächenspannung wurde mittels der in 2.2.17.2 beschriebenen, indirekten optischen Methode nach Cottingham *et al.* (2004) durchgeführt, die es ermöglichte, mit Probenvolumina von 200 µL zu arbeiten.

Zunächst wurde das Meßverfahren anhand von Verdünnungsreihen unterschiedlicher Detergentien getestet, wobei die konzentrationsabhängige Wirkung der Detergentien durch Bezug auf die kritische Mizellkonzentration normiert wurde (vgl. 3.8.2.1). Die aus den Verdünnungen erhaltenen Kurven zeigten den erwarteten sigmoidalen Verlauf mit einem Umbruch beim Erreichen der kritischen Mizellkonzentration. SDS wurde als Standard für die weiteren Messungen ausgewählt.

In weiteren Versuchen wurde die Zeitabhängigkeit der Einstellung der Oberflächenspannung bestimmt (vgl. 3.8.2.2). Erwartungsgemäß stellte sich der Endwert der Oberflächenspannung in den Detergenslösungen sofort ein, wohingegen die Oberflächenspannung der Proteinlösungen eine starke zeitliche Dynamik aufwies. Im Falle der Proteinlösungen wies die höher konzentrierte Lösung bereits zu Meßbeginn eine geringere Oberflächenspannung auf, als die niedrig konzentrierte Vergleichslösung und erreichte auch einen niedrigeren Endwert. Die Einstellung des Endwerts dauerte bei beiden Lösungen gleich lange, der absolute Betrag der zeitlichen Änderung war bei niedriger Konzentration größer. Dies bedeutet, dass Proteinlösungen im Gegensatz zu kleinen, schnell diffundierenden Detergensmolekülen eine große zeitliche Komponente in der Einstellung der Oberflächenspannung haben. Deshalb können die Werte aus Meßverfahren, die kurzzeitig wirken oder eine Bildung neuer Oberfläche im Laufe der Messung bewirken, nur bedingt für die Vorgänge etwa in der Wand einer stabilisierten Blase herangezogen werden. Mit der in dieser Arbeit eingesetzten Methode war es dagegen möglich, die Oberflächenspannung im Gleichgewichtszustand zu bestimmen: die Mikrotiterplatte, in der die Messung durchgeführt wurde, wurde mindestens 15 h Stunden hinweg in abgedecktem Zustand inkubiert und anschließend gemessen.

In 3.8.2.3 sind die Ergebnisse zum Einfluss der pilzlichen Proteine auf die Oberflächenspannung dargestellt. Das 14 kDa-Protein aus *F. culmorum* TMW 4.0111 senkte die Oberflächenspannung im Gleichgewicht stärker ab, als SDS. Seine Wirkung erreichte die konzentrationsabhängige Sättigung ab ca. 1 mmol/L , die vergleichbare Oberflächenspannung lag dabei unter 38 mN/m. Ein komplexerer Verlauf der Konzentrations-Oberflächenspannungskurve ergab sich für die basischen Proteine aus *F. culmorum* TMW 4.0111 bzw. *F. graminearum* TMW 4.0175. Die Berechnung der Konzentrationen beruht auf einem angenommenen Molekulargewicht von 20 kDa. In beiden Kurven wurde ein lokales

Minimum bei 10^{-5} mol/L festgestellt. Dieses lokale Minimum lag bei *F. culmorum* TMW 4.0111 bereits auf dem 38 mN/m entsprechenden Minimalwert der Oberflächenspannung der SDS-Lösung. Bei weiterer Konzentrationserhöhung fiel die scheinbare optische Dichte und damit die Oberflächenspannung weiter ab. Einen vergleichbaren Verlauf zeigte die Kurve für die basischen Proteine aus *F. graminearum* TMW 4.0175, wobei das lokale Minimum bei etwa 10^{-5} mol/L nicht so niedrig lag, wie bei *F. culmorum* TMW 4.0111. Trotzdem wurde bei höherer Konzentration ein Endwert deutlich unter dem von SDS erreicht. Die Konzentrationen, bei denen die lokalen Minima dieser Kurven erreicht wurden, können als die kritischen Aggregationskonzentrationen gedeutet werden, bei denen die enthaltenen Proteine zu aggregieren beginnen. Ein ähnliches lokales Minimum wurde von Kogan *et al.* (2002) für eine chemisch synthetisierte Domäne $(VHLPPP)_8$ von γ-Zein, einem zu β-stacks aggregierenden Protein aus Mais (*Zea mays*), bei rund 10^{-7} mol/L gezeigt. Eine andere Erklärung für den Verlauf der Kurve wären transiente Konkurrenzeffekte zwischen den enthaltenen Proteinen. Allerdings konnte bei höheren Proteinkonzentrationen als in den Messungen verwendet, mit bloßem Auge eine kolloidale Trübung der Proteinlösungen beobachtet, die ebenfalls auf mögliche Aggregation hindeutet. Zudem wurde, zumindest für die Proteine aus *F. culmorum* TMW 4.0111 ohnehin schon die Neigung zur Aggregation unter anderen Bedingungen in den vorangegangenen Versuchen bestätigt bzw. genutzt, so dass für die Konzentration, an der das lokale Minimum der Oberflächenspannung lag, durchaus von einer kritischen Aggregationskonzentration ausgegangen werden kann.

Die Molmasse von SDS beträgt 288,4 g/mol, wohingegen die über SDS-PAGE bestimmten apparenten Molekülmassen der untersuchten Proteine zwischen 14 und 20 kDa, also 14000-20000 g/mol liegen. Diese Proteine sind um etwa 2 Zehnerpotenzen größer als SDS. Würde man die Wirkung auf die Oberflächenspannung rein auf Basis der Molekulargewichte betrachten, ohne Berücksichtigung von Aktivitäten und weiteren nichtlinearen Abhängigkeiten, so sollte unter der sehr vereinfachenden Annahme eines direkten Zusammenhangs zwischen Molekulargewicht und Wirkung, der Effekt der Proteine ca. 2 Konzentrations-Größenordnungen früher einsetzen, als bei SDS. Tatsächlich ließ sich aber bei den untersuchten Proteinen die erste Wirkung auf die Oberflächenspannung bei etwa 4 Zehnerpotenzen niedrigerer Konzentration als bei SDS feststellen.

4.8 Untersuchungen zur Oberflächenhydrophobizität von Proteinen

Die Oberflächenhydrophobizität stellt eine durch die Aminosäuresequenz und Konformation bestimmte Eigenschaft von Proteinen dar, die mit der Oberflächenaktivität in Verbindung steht. Jedes Protein, das sich stabil in eine Grenzfläche vom Typ hydrophob-hydrophil, also z.B. Gas-Wasser, einlagern soll, muß eine hinreichend hohe Hydrophobizität an seiner Molekülоberfläche aufweisen. Dadurch ist die Oberflächenhydrophobizität auch mit der Oberflächenaktivität korreliert (Kato & Nakai, 1980). Darüber hinaus ist die Oberflächenhydrophobizität S_0 eine Eigenschaft von Proteinen, die durch Interaktion mit anderen Stoffen Veränderungen unterworfen ist, aber auch durch technologische Einflüsse, wie etwa Erhitzung, modifiziert werden kann (Voutsinas *et al.,* 1983). Eine der ersten Untersuchungen zur Wirkung von Interaktionen zwischen verschiedenen Proteinen und κ-Carrageenan auf die Oberflächenhydrophobizität wurde von Alizadeh-Pasdar & Li-Chan (2001) durchgeführt. Die Autoren stellten ein differenziertes Verhalten unterschiedlicher Proteine in der Interaktion mit κ-Carrageenan fest. Steigerungen von S_0 durch κ-Carrageenan konnten ebenso beobachtet werden, wie Verminderungen. Zudem bestand eine Abhängigkeit vom pH-Wert, was nicht überraschend ist, kann doch durch eine pH-Wert-Änderung eine Ladungsänderung von κ-Carrageenan bewirkt werden. Für die Interaktion von Rapsproteinisolat und den Hydrokolloiden κ-Carrageenan und Guaran wurde eine Steigerung der Oberflächenhydrophobizität durch Erhöhung der Hydrokolloid-Konzentration beobachtet (Uruakpa & Arntfield, 2006). Dabei wurde die Oberflächenhydrophobizität des Rapsproteinisolats durch Zusatz von Guaran bis auf den sechsfachen Wert gegenüber der Hydrokolloid-freien Probe gesteigert. Mit κ-Carrageenan konnte lediglich eine Steigerung um rund 50 % erreicht werden, was den Schluß zulässt, dass eine Interaktion zwischen Hydrokolloiden und Proteinen zu einer Konformationsänderung der Proteine, verbunden mit der Freilegung hydrophober Domänen führen kann. Bislang wurden offenbar noch keine Messungen zur Bestimmung der Oberflächenhydrophobizität von Rohstoffen, Zwischenprodukten oder Endprodukten des Brauprozesses mittels der Fluoreszenzmethode publiziert. Die Messung der Oberflächenhydrophobizität ist unerläßlich zur Beurteilung der funktionellen Eigenschaften von Proteinen im Hinblick auf die Stabilisierung von Grenzflächen, z.B. in Emulsionen. Obwohl auch Schäume eine Form von Emulsionen darstellen, wurde diese Analytik im Bereich

der Bierherstellung nur in unzureichendem Maße eingesetzt. Die von Bamforth et al. (2001) und Kapp & Bamforth (2002) durchgeführten Messungen der Oberflächenhydrophobizitäten von Gesamtproteinen aus Bieren enthalten systematische Fehler durch ungeeignete Verdünnungslösungen, die Salzgehalt und pH nicht stabil ließen. Damit stellen die hier dargestellten Versuche die erste Anwendung der fluoreszenzspektroskopischen Untersuchung der Oberflächenhydrophobizität für Rohstoffe des Brauprozesses dar.

4.8.1 Oberflächenhydrophobizität pilzlicher Proteine

Die bereits zur Bestimmung der Oberflächenspannung verwendeten Proteine wurden bezüglich ihrer Oberflächenhydrophobizität untersucht. Die Ergebnisse hierzu sind in 3.9.1 dargestellt. Die für das 14 kDa-Protein aus *F. culmorum* TMW 4.0111 festgestellte Oberflächenhydrophobizität von 24 $\%^{-1}$ bei pH 7,4 liegt im Bereich der für β-Lactoglobulin belegten Werte (Nakai & Li-Chan, 1988). Eine starke Veränderung von S_0 durch Erhitzung oder Interaktion mit Maltose ohne Erhitzung wurde nicht beobachtet. Erst eine Erhitzung in Gegenwart von Maltose erhöhte S_0 um ca. 38 %. Deutlich größeren Einfluss als die Erhitzung hatte jedoch die Änderung des pH-Wertes. Bei pH 3,4, also am pI des Proteins, wurde mit S_0=73 $\%^{-1}$ ein Mehrfaches des Wertes bei pH 7,4 beobachtet. Höhere Basiswerte (S_0=ca. 135 $\%^{-1}$) wurden für die basischen Proteine (17 kDa mit AfpA) von *F. culmorum* TMW 4.0111 gefunden, wiederum ohne nennenswerten Einfluss von Maltose auf die Oberflächenhydrophobizität des nativen Proteins. Nach einer Erhitzung lag S_0 bei der erhitzen reinen Proteinlösung bei 930 $\%^{-1}$, bei der mit Maltose erhitzen Proteinlösung, die also Maillardprodukte erhalten sollte, bei 1055 $\%^{-1}$. Hier war also eine massive Freilegung hydrophober Domänen durch die Erhitzung geschehen. Die Reaktion mit Maltose führte zwar noch zu einem meßbaren, aber angesichts der enormen Erhöhung von S_0 unbedeutenden Unterschied. Die Oberflächenhydrophobizität der hitzebehandelten Proteine lag damit in der Größenordnung des Wertes von Rinderserumalbumin (S_0=1500 $\%^{-1}$, Nakai & Li-Chan, 1988). Es handelt sich um Proteine mit außergewöhnlich hoher Oberflächenhydrophobizität, die angesichts ihrer thermischen Stabilität den Prozeß der Würzekochung überstehen sollten. Die Erhöhung der Oberflächenhydrophobizität im Zuge der thermischen Behandlung prädestiniert diese Proteine geradezu zur Einlagerung in Blasenhäute. Dadurch wären diese

Proteine geeignet, beim Zusammenbruch einer Blase hydrophobe Partikel zu bilden, an denen Gasreste anhaften können. Die Stabilisierung von Gasblasen durch geeignete Partikeln ist zudem ein anerkannter, aber komplexer Einfluss bei der Stabilisierung von Schäumen in Lebensmitteln (Murray & Ettelaie, 2004).

Auch für die basischen Proteine von *F. graminearum* TMW 4.0175 wurden eine qualitativ ähnliche Veränderung der Oberflächenhydrophobizität durch Hitzebehandlung festgestellt. Die native Proteinfraktion wies mit und ohne Maltose ein S_0 um 60 $\%^{-1}$ auf. Die hitzebehandelten Proben ergaben S_0-Werte um 110 $\%^{-1}$ ohne Maltose und 80 $\%^{-1}$ mit Maltose und liegen damit im Bereich der für α-Casein oder α-Lactalbumin festgestellten Werte (Nakai & Li-Chan, 1988). Auch hier ist eine deutliche Aktivierung durch die Hitzebehandlung feststellbar. Deshalb bestehen möglicherweise große Unterschiede zwischen den von *F. culmorum* und *F. graminearum* ausgeschiedenen Proteine gegenüber thermischer Behandlung, obwohl diese Proteinfraktionen teilweise durch die gleichen Antikörper erkannt werden und daher strukturelle Ähnlichkeiten besitzen sollten. Gleichzeitig belegen auch diese Ergebnisse, dass die prozeßnahe Behandlung von Substanzen, die auf ihre Gushing-beeinflussende Wirkung untersucht werden sollen, zwingend notwendig ist.

4.8.2 Oberflächenhydrophobizität von Proteinen aus Malzen

Ein weiterer Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der Oberflächenhydrophobizitäten von Weizenmalzen mit unterschiedlichem Gushingverhalten aus gezielten Infektionen mit *F. culmorum* bzw. *F. graminearum*. Die Infektion mit den genannten Pilzen führte zu einer deutlichen Verminderung der Oberflächenhydrophobizität der Malze (vgl. 3.9.2). Stabile Malze wiesen Oberflächenhydrophobizitäten im Bereich von 5000-7000 $\%^{-1}$, Malze mit hohem Überschäumvolumen im Gushingtest wiesen dagegen Werte deutlich unter 1000 $\%^{-1}$ auf. Darüber hinaus konnte an Praxismalz, das zu Gushing führte, eine ebenfalls erniedrigte Oberflächenhydrophobizität festgestellt werden. Die Korrelation zwischen Überschäumvolumen im Gushingtest nach Donhauser *et al.* (1990) und der Oberflächenhydrophobizität hatte mit $r^2=0,70$ einen für unabhängige Analysenverfahren hohen Wert. Auch Malze, deren Gushing durch extreme Infektion mit den eigentlich nicht als Gushingverursacher betrachteten

F. avenaceum, F. equiseti, F. poae und *F. tricinctum* beeinflusst wurde, wurden analysiert. Diese ebenfalls zu Gushing neigenden Malze wiesen auch eine reduzierte Oberflächenhydrophobizität auf, jedoch nicht in dem Maße, wie dies bei *F. culmorum* bzw. *F. graminearum* der Fall war. Damit ergibt sich, dass die Infektion von Weizen mit *F. culmorum* bzw. *F. graminearum* zu einem Abbau von hydrophoben Proteine führt. Dieser Abbau hydrophober und damit grenzflächenstabilisierender Proteine kann geeignet sein, Gushing hervorzurufen, wie auch Untersuchungen zur verringerten Konzentration von LTP in gushendem Weißbier gegenüber normalem Weißbier nahelegen (Zapf et al., 2005). Durch die Verringerung des Gehalts an hydrophoben Proteinen als eine Gruppe von Bestandteilen der Blasenhaut könnte die mechanische Stabilisierung von Mikroblasen so verändert werden, dass Mikroblasen kritischen Durchmessers tatsächlich anwachsen und Gushing verursachen können. Alternativ könnte die verringerte Menge hydrophober Proteine gerade noch zur Bildung hydrophober Proteinaggregat-Domänen ausreichen, an denen nach Zusammenbruch der Blase Gasreste anhaften, die zu Gushing führen. Ein weiterer kritischer Einfluss ergibt sich aus der hydrolytischen Spaltung von Proteinen. Die ab einem gewissen Hydrolysegrad entstehenden extrem kleinen, hydrophoben Peptide beeinträchtigen die Grenzflächenstabilitiserung und erzeugen rasche Koaleszenz. Diese Wikrung beruht auf dem Fehlen der nötigen Ladung oder Polarität in kleinen Molekülen, die zur Grenzflächenstabilisierung nötig sind (Caessens et al., 1999).

4.9 Erzeugung von Gushing durch ein Klasse II-Hydrophobin

Brauversuche wurden mit mehreren transgenen Hefen wurden durchgeführt, um die Wirkung von speziellen Proteinen auf Gushing zu untersuchen (vgl. 2.2.22 und 3.10). Durch die Verwendung dieser transgenen Hefen war es möglich, die plasmid-kodierten Proteine während der Vergärung von Würze durch *in situ* zu produzieren. Lipidtransfer-Protein LTP1500 (AF551849) aus Weizen (*Triticum aestivum*) und zwei Hydrophobine (FcHyd3p, GenBank Accession DQ449531 und FcHyd5p, GenBank Accession DQ449530) aus *F. culmorum* TMW 4.0111 wurden in einen Laborstamm von *S. cerevisiae* kloniert. FcHyd3p ist ein Klasse I-Hydrophobin, wobei Klasse I-Hydrophobine zur Ausbildung extrem stabiler Aggregate neigen. FcHyd5p ist ein Klasse II-Hydrophobin. In dieser Klasse können sich entstandene Aggregate wieder auflösen, womit die Hydrophobin-Moleküle

wieder für die Reaggregation in neuen Grenzflächen zur Verfügung stehen.

Die in das *multi-copy*-Plasmid pYX242 klonierten Gene unterlagen der Kontrolle durch den konstitutiven Triosephosphat-Isomerase-Promotor (TPI). Solange Glykolyse in der Zelle stattfindet, ist Triosephosphat-Isomerase aktiv, die Expression der Proteine ist daher quasi konstitutiv. Die Proteine tragen eukaryote Signalpeptide und werden daher aus der produzierenden Zelle geschleust, wobei beim Membrandurchtritt das Signalpeptid abschnitten wird und das reife Protein extrazellulär vorliegt. Die mit diesen Hefen und *S. cerevisiae* ssp. *uvarum* var. *carlsbergensis* Stamm W66/70 hergestellte Biere wurden auf Gushing untersucht.

Die Biere aus den Kontrollgärungen mit *S. cerevisiae* ssp. *uvarum* var. *carlsbergensis* Stamm W66/70 bzw. *S. cerevisiae* DMS3820 [pYX242] #970 zeigten keine signifikanten Anzeichen von Gushing. Daher konnte davon ausgegangen werden, dass die im Rahmen dieses Brauversuchs verwendete Würze gushing-stabil war, unabhängig von der Verwendung eines kommerziellen Hefestamms bzw. einer Laborhefe. Damit mußte jedes Überschäumen, das in den mit den weiteren transgenen Hefen hergestellten Bieren auftrat, unmittelbare Folge der durch diese Hefen sekretierten Proteine sein.

Das mit *S. cerevisiae* DMS3820 [pYX242-LTP1500] #961 hergestellte Bier zeigte ebenfalls keine Anzeichen von Gushing. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit der Tatsache, dass Proteine der LTP-Klasse wichtige Schaumstabilisatoren im Bier sind. Ihre stabilisierenden Eigenschaften steigen mit fortschreitender Maillardreaktion und thermisch induzierter Auffaltung während der Würzekochung (Jégou et al., 2000; Marion et al., 2001). Es wurde bislang nie nachgewiesen, dass LTP in zu hoher Konzentration Gushing auslöst. Dagegen deuten einige Ergebnisse darauf hin, dass ein zu geringer Gehalt an Weizen-LTP mit Gushing von Weizenbieren assoziiert sein kann (Zapf et al., 2005).

Gushing trat bei dem mit Bier auf, das mit dem Hefeklon *S. cerevisiae* DMS3820 [pYX242-FcHyd5] #858 hergestellt wurde, der FcHyd5p-Hydrophobin prodzuiert. Der durch dieses Klasse II-Hydrophobin ausgelöste Effekt ist kongruent mit Ergebnissen von Kleemola *et al.* (2001) und Sarlin *et al.* (2005), die zeigten, dass durch den Zusatz gereinigter Hydrophobine Gushing ausgelöst werden konnte. Die in den zitierten Arbeiten verwendeten Hydrophobine stammten jedoch von Pilzen – *Trichoderma reesei*, *F. poae* und *Nigrospora* sp. – die keine generelle Bedeutung

als Gushingauslöser haben. Eine weitere Parallele zwischen der hier beobacteten Wikrung von FcHyd5p und den Ergebnissen von Kleemola *et al.* (2001) und Sarlin *et al.* (2005) kann jedoch gezogen werden. Wie FcHyd5p sind auch die von den zitierten Autoren untersuchten Hydrophobine aus *Nigrospora* sp., *F. poae* und *Trichoderma reesei* Klasse II-Hydrophobine (Askolin et al., 2005). Das durch FcHyd5p ausgelöste Gushing ist damit der erste Beleg für die Beteiligung von Hydrophobinen aus *F. culmorum* am Gushing. *F. culmorum* hat dabei, im Gegensatz zu *F. poa*e, mit *F. graminearum* die höchste Bedeutung als Gushingerreger hat. Im Gegensatz dazu hatte das Klasse I-Hydrophobin FcHyd3p unter den gegebenen Versuchsbedingungen keine gushing-auslösende Wirkung. Die Möglichkeit, aus identischer Würze stabiles Bier und Gushing-Bier durch in situ-Produktion von *Fusarium*-Hydrophobin herzustellen, gibt Anlaß zu weiteren Untersuchungen in denen Blasenmechanik und Blasenstabilisierung in stabilem und 'wildem' Bier erforscht werden können.

4.10 Interaktionen zwischen oberflächenaktiven Proteinen und anderen Stoffen in Grenzflächen

Über lange Zeit hinweg sind Untersuchungen zum malzverursachten Gushing unternommen worden. Dabei wurden Gushing-Faktoren aus einer großen Anzahl von Mikroorganismen isoliert, und ihre Wirkung auf Bier untersucht. Häufig jedoch geschah dies, ohne eine prozeßähnliche Vorbehandlung der isolierten Substanzen. In anderen Arbeiten wurden anorganische Substanzen als Gushingverursacher bzw. Stabilisatoren von Mikroblasen benannt (Guggenberger & Kleber, 1963), ohne zu beantworten, auf welchem Wege in einer an vielerlei grenzflächenaktiven Stoffen reichen Lösung beispielsweise reine $Fe(OH)_3$-Blasenhäute entstehen könnten.

Wenn in Bier stabile Blasen vorliegen, wird in deren Grenzfläche eine Mischung unterschiedlicher grenzflächenaktiver Stoffe zu finden sein, unberührt davon, ob es sich um reine Blasen oder Gasreste zwischen oder an hydrophoben Partikeln handelt. Zu diesen Stoffen zählen Peptide und Proteine, Lipide, Hopfen-Bestandteile, sowie möglicherweise Dextrine. Auch die Ladung der Proteine und die Beeinflussung dieser Ladung durch mehrwertige Metallionen verändern solche Grenzflächenfilme (Marinova *et al.,* 1997). Ein weiterer Einfluss wird durch die

über den pH-Wert beeinflusste Ladung der Moleküle ausgeübt. Auf diesem Wege kann z.B. eine Maische- oder Würzesäuerung wirksam werden. Unter diesem Blickwinkel sind nun verschiedene Effekte zu beachten, die an nicht homogenen Grenzflächenfilmen wirken können.

Wichtiger Bestandteil dieses Grenzflächenfilms sind Proteine. Aufgrund der unspezifischen proteolytischen Abbauvorgänge beim Mälzen und Maischen entsteht eine hohe Anzahl von Abbauprodukten, die zusätzlich zu den Proteinen auf die Grenzfläche wirken, wobei hier in der Literatur zwei Meinungen bestehen. Eine Ansicht ist, dass nur wenige Proteine an Aufbau und Stabilisierung von Schaum in Bier beteiligt sind (*discrete protein hypothesis*), besonders LTP und Protein Z. Die andere verbreitete Meinung hingegen erwartet eine breite Interaktion von Proteinen und deren Proteolyseprodukten (*generalised amphipatic polypeptide hypothesis*) (Bamforth & Kanauchi, 2003). Letztere Meinung ist aufgrund der Vielzahl an Proteinen und Peptiden, die in der Untersuchung von Bierschäumen mittels 2D-GE durch Hecht (Zapf *et al*., 2005) und Bieren durch Perrocheau *et al.* (2005) gefunden wurden, eindeutig zu unterstützen. Weiterhin erfahren diese Proteine und Proteinfragmente Modifikationen durch thermische Denaturierung und Bildung von Maillardprodukten. Beide Effekte sind dazu geeignet, z.B. die Oberflächenaktivität und Oberflächenhydrophobizität der Edukte zu verändern. Das Verhalten von derartigen gemischten Grenzflächen ist noch weitgehend unerforscht, so dass nur jeweils einzelne Aspekte erklärt werden können.

Es ist vorstellbar, dass kleine oberflächenaktive Proteine, Hydrophobine oder andere Proteine pilzlicher oder pflanzlicher Herkunft, aufgrund ihrer geringen Größe und der damit verbundenen Mobilität schwächend auf eine an sich zäh-elastische Proteinhaut um Mikroblasen wirken. Die so geschwächte Mikroblase bleibt dann beim Druckabfall durch das Öffnen der Flasche nicht größenbeschränkt, sondern kann sich im Rahmen der von Fischer (2001) beschriebenen physikalischen Zwänge vergrößern und wirksam werden. Eine ähnliche destabilisierende Wirkung wurde auch für enzymatische Abbauprodukte anderer Proteine beobachtet. Es exisitieren Berichte über die Auslösung von Gushing durch andauernde proteolytische Restaktivität von Papain im bereits abgefüllten Bier (Helm & Richardt, 1938, Amaha & Horiuchi 1979, Horiuchi *et al*., 1978). Andererseits wurde auch emulsions-destabilisierende Wirkung extrem hydrophober Peptide, erzeugt durch partielle peptische Hydrolyse von Molkenproteinen breichtet (Konrad et al., 2005). Auch Untersuchungen von

Bamforth & Kanauchi (2003) an modellhaften Lösungen nativer und lysierter Gerstenproteine zeigten komplexe, teils gegenläufige Effekte der Proteolysezeit auf die Schaumstabilität von Hordeinen bzw. Albuminen. Hordeinschäume ergaben, abhängig vom Bitterstoffgehalt, maximale Schaumstabilität bei partieller Hydrolyse. Bei Albuminen wurden höchste Schaumstabilitäten bei 0, 2 und bei 40 BU, niedrigste Schaumstabilität um 5 BU gefunden. Zunehmende Proteolyse gleich die extremen Unterschiede etwas aus. Eine weitere Einflussgröße war der Zinkgehalt. Von 0 nach 2 mg/L Zink stieg die die Schaumstabilität bei Albumin, Albuminlysat und bei nativem Hordein massiv an. Hier wirkte möglicherweise ein ähnlicher Effekt, wie bei der Stabilisierung von Casein-Mizellen durch Ca^{2+}-Ionen, wobei in der Praxis derartige Zink-Gehalte im Bier unmöglich sind, da Zink während der Gärung von der Hefe nahezu vollständig aufgenommen wird. Die in der genannten Publikation durchgeführten Untersuchungen illustrieren die Vielfalt der Einflüsse auf die Grenzflächenstabilisierung in Bier, ließen jedoch noch die Wirkung z.B thermischer Einflüsse oder der Maillardreaktion außer acht. Die Bereitschaft von Pilzproteinen zu Aggregatbildung hing offenbar dramatisch vom pH-Wert ab (vgl. 3.3.1.3). Ein analoger Einfluss der Maische- bzw. Würzesäuerung, bei der die pH-Werte des Bieres ebenfalls von ca. pH 4,8 auf etwa pH 4,4 verschoben werden, auf die Proteinaggregation bzw. Blasenstabilisierung ist daher denkbar. Mit der pH-Wert-Verschiebung geht eine Änderung von Molekülladungen einher. Sofern durch biologische Säuerung eine Stabilisierung gegen Gushing erreicht werden kann, ist eine vom pH-Wert abhängige Blasenstabilisierung als Mechanismus denkbar.

Grenzflächenfilme aus Proteinen zeichnen sich zunächst durch die relativ hohe Dicke im Vergleich zu Detergentien aus, die durch Kompression der Oberfläche noch extrem gesteigert und verdichtet werden kann (Dickinson, 1999). Zudem können globuläre Proteine gleichsam ein viskoelastisches Netzwerk in der Interphase ausbilden, im Gegensatz dazu neigen mizelläre Protein zur Bildung von festen Filmen ohne nennenswerte elastische Eigenschaften (Rouimi *et al.,* 2005). Das Netzwerk globulärer Proteine kann durch die Auffaltung und Freilegung hydrophober Domänen in der Interaktion mit Nachbarmolekülen so stabilisiert werden, dass die Adsorption eines Proteinmoleküls in die Grenzfläche irreversibel sein kann (Dickinson, 1999). Die Dichte der zeitlich unveränderten Oberfläche gegen die nachträgliche Einlagerung von weiteren Proteinen konnte über mehrere Stunden hinweg für einen Grenzflächenfilm aus IgG (Wasser-Luft-Grenze) durch Fluoreszenzmarkierung gezeigt werden (Tronin *et al*., 1996). Eine Desorption von

Proteinmolekülen ist dann nur noch durch Konkurrenz mit Detergentien wahrscheinlich. In Grenzflächenfilmen, die aus unterschiedlichen Proteinen bestehen, können vielfältige Effekte aus der Interaktion der Proteine entstehen. Pungnaloni *et al.* (2003) konnten durch Simulationen das Verhalten einer Mischung zweier Proteine (A und B) mit unterschiedlichen Eigenschaften in einer Grenzfläche beschreiben: Ist Protein A zur irreversiblen Aggregation mit A durch kovalente Brücken befähigt, bildete sich ein feinmaschiges, gelartiges Netzwerk aus A-Aggregaten aus, in dessen Poren nicht-aggregierenden Proteine B eingelagert waren. Dagegen konnte die Bildung reversibler A-A-Wechselwirkungen zur einer Art Phasenseparation innerhalb der Grenzfläche führen, indem sich große A-Aggregate bildeten, die durch die beweglichen B-Bereiche abgegrenzt waren. Die extremste Situation konnte durch Annahme elektrostatischer Abstoßung erreicht werden, die eine extrem schnelle Separation der beiden Proteintypen A und B in jeweils homogene Bereiche bewirkte. Diese durch Simulation erhaltenen Aussagen über Separation von Proteinen in einer Grenzfläche konnten durch Damodaran (2004) experimentell bestätigt werden. Dabei wurde die Separation bei der Koadsorption fluoreszenzmarkierter Proteinmischungen (β-Casein/11S-Globulin aus Soja; β-Casein/α_s-Casein und β-Casein/BSA) in die Wasser-Luft-Grenzfläche bestätigt. Somit gewinnt die Zusammensetzung der Proteinfraktion der Blasen in Bier eine große Bedeutung für die Stabilität sowohl des Schaumes als auch von Mikroblasen oder adsorbierten Gasresten. Gleichzeitig können die vorgestellten Mechanismen die Entstehung von Proteinaggregaten, ggf. mit Anhaftung von Gasresten beim Zusammenbruch einer Blase, erklären. Für die Beteiligung der in der vorliegenden Arbeit isolierten basischen Pilzproteine am Gushing wäre eine elektrostatische Abstoßung mit z.B. basischem LTP1500 denkbar, die zu einer Aggregation jeweils homogener Domänen beider Proteine in den Blasenhäuten führen könnte.

Ein zusätzlicher Einfluss auf Grenzflächen wird durch Zucker bzw. Dextrine ausgeübt. Zunächst können durch die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den OH-Gruppen von Dextrinen und Zuckern mit hydrophilen Gruppen an Proteinen schwache Wechselwirkungen ausgebildet werden. Der Effekt steigt mit der Länge des Dextrinmoleküls und bewirkt eine Steigerung der Hydrophilie. Damit verbunden sind eine Verringerung der Oberflächenaktivität, Änderung des HLB-Wertes (*hydrophil-lipophil-balance*) und der Hydrophobizität. Zur Interaktion mit Zuckern zählt auch die Stabilisierung der partiellen Auffaltung durch kovalente Bindung eines Zuckers über

Maillardreaktion (Semenova *et al.,* 1999; Antipova & Semenova, 1997). Eine extreme Reduktion der Grenzflächenaktivität von 11S-Globulin aus Saubohnen (*Vicia faba*) fand bereits durch 0,05 mol% Saccharose bzw. Glukose statt. Zudem bewirken 0,05 mol% Maltodextrin eine völlige Änderung der Adsorptionskinetik der Einlagerung des Proteins in die Grenzfläche (Antipova & Semenova, 1997). Eine Erklärung für die Schwächung von Protein-Grenzflächenfilmen durch Zucker sieht die Stabilisierung der Proteine durch Zucker vor, die zu einer geringeren Grenzflächendenaturierung führt. Damit wird der native Zustand stabilisiert gegenüber dem partiell entfalteten, der hydrophobe Domänen freilegt. Hierdurch treten auch weniger Protein-Protein-Interaktionen auf, die zur Verfestigung des Films führen würden. Der Film reißt damit leichter (McClements, 2002). Der positive Einfluss von natürlichen Glykosylierungen auf die Benetzbarkeit der hydrophilen Seite eines Films aus SC3-Hydrophobin, d.h. die Erhöhung der Grenzflächenaktivität durch die Zucker, ist ebenfalls belegt (Wösten & de Vocht, 2000). Auch die Wirkung von klassischen Detergentien wird durch Maltodextrine extrem abgeschwächt, wobei größere Maltodextrine einen stärkeren Einfluss ausüben als kleine (Dextroseäquivalent DE=10 vs. DE=2) (Semenova *et al.,* 2003).

Die Anwesenheit von Protein und Detergens in der gleichen Grenzfläche führt zu einer Konkurrenz um die Grenzflächenbelegung, wobei die Verdrängung des Proteins ab einer Grenzkonzentration des Detergens sprunghaft zunimmt. Im Endzustand ist die Grenzfläche vollständig mit Detergensmolekülen bedeckt. Der reine Proteinfilm stellt eine in idealem Zustand nahezu immobile Fläche dar, die durch das Eindringen des Detergens in eine mobile, schnell diffundierende Fläche aus Protein und Detergens umgewandelt wird (Dickinson, 1999). Bei steigender Detergenskonzentration führt die Konkurrenz zwischen Protein und Detergens zu einer Verminderung der Proteinadsorption (Miller *et al*., 2004). Nichtionische Detergentien vertreiben Proteine dabei durch Nukleation und Wachstum von Detergensdomänen bis zum Zusammenbruch des Proteinnetzwerks, gefolgt vom Verlust der Proteine in die kontinuierliche Phase. Ionische Detergentien beginnen ebenfalls zu nukleieren, aber bereits bei geringem Anwachsen der Domäne bricht das Proteinnetzwerk durch Einfluss elektrostatischer Abstoßung zusammen (Gunning *et al*., 2004). Dabei sind wasserlösliche Emulgatoren, wie z.B. Saccharoseester, effektiver in der Verdrängung von Proteinen aus Interphasen, als fettlösliche Emulgatoren (Rouimi *et al.,* 2005). In dieser Weise können auch die von Laible & Geiger (2003) beschriebenen von Pilzen ausgeschiedenen gushing-

vermindernden, polaren Lipide wirken. Zudem kann das Protein, neben der Konkurrenz um die Grenzfläche auch, ähnlich der oben beschriebenen Wirkung von Zuckern, als Adsorbens für kleine Mengen des Detergens dienen. Damit verändern sich dann auch die kritischen Mizell- und Aggregatkonzentrationen der Systeme (Tofani *et al*., 2004; Wei *et al*., 2003). Auch Phospholipide rufen ähnliche Effekte wie synthetische Detergentien hervor (Mackie, 2004). Sofern zusätzlich noch Ethanol oder Zucker anwesend sind, sind die Vorhersagen über das Verhalten des Grenzflächenfilms auf dem momentanen Stand des Wissens schwierig, wenn nicht unmöglich.

Ein letzter hier zu erläuternder, stabilisierender Einfluss auf Grenzflächen kann durch Adsorption von geeigneten amphiphilen Partikeln erfolgen. Die Stabilisierung durch Partikel kann besonders effektiv sein, da in manchen Fällen die zu Partikeln aggregierten Proteine durch sterische Trennung benachbarter Blasen bessere Grenzflächenstabilisierung erlauben (Murray & Ettelaie, 2004). Die Anordnung der Partikeln in der Grenzfläche wird wiederum durch deren elektrostatische Wechselwirkungen bestimmt (Binks, 2002), wie bereits bei der Separation von gleich geladenen Proteinen geschildert. Ein ähnlicher Stabilisierungseffekt kann an Gasresten zwischen hydrophoben Partikeln auftreten.

4.11 Abschließende Betrachtung

Unter Beachtung der aus der Literatur zu entnehmenden Erkenntnisse über den Einfluss verschiedener Parameter auf die Stabilisierung von Grenzflächen und der weithin akzeptierten Annahme, nach der zur Auslösung von Gushing stabilisierte Mikroblasen über einem kritischen Durchmesser vorliegen müssen , ergibt sich folgende Hypothese:

Die Entstehung von Gushing erfordert eine Wechselwirkung zwischen Pilz und Pflanze während der Infektion. Für das von *F. culmorum* ausgeschiedene Protein AfpA ist eine Funktion in der Morphogenese des Pilzes zu erwarten. Damit könnte eine funktionelle Beziehung von AfpA zu den ebenfalls für die Morphogenese wichtigen Hydrophobinen bestehen, die wiederum eine Beteiligung von AfpA an Pilz-Pflanze-Wechselwirkungen nahelegt. Aufgrund der Wechselwirkungen zwischen Pilz und Pflanze kann zusätzlich ein selektiver Abbau hydrophober

Proteine bei der Infektion des Korns erfolgen.

Entsprechende Veränderungen sind im fertigen Malz bzw. dem daraus hergestellten Bier nachweisbar. Durch die Infektion von Weizen mit *Fusarium* spp. wird die in der Summe meßbare Hydrophobizität der im Malz enthaltenen Proteine extrem vermindert. Die entstehenden Peptide können die Verminderung der Oberflächenspannung bewirken, über die schon in früheren Arbeiten berichtet wurde. Eine weitere Veränderung der funktionellen Eigenschaften dieser Stoffe kann durch Reaktionen im Brauprozeß, z.B. durch Maillardreaktion, erfolgen. In gushenden Weizenbieren ist kein oder kaum noch basisches LTP1500 aus Weizen nachweisbar, das an der Stabilisierung von Grenzflächen beteiligt ist und zu Oligomeren aggregieren kann. In Weizenmalzen mit Gushingpotential konnten dagegen pilzliche Proteine mit einem Antikörper gegen AfpA-Protein aus *F. culmorum* nachgewiesen werden. AfpA ist grenzflächenaktiv und hat einen ähnlichen pI wie LTP1500.

Aufgrund dieser Veränderungen können im Bier die folgenden Vorgänge wirksam werden: in den zu stabilisierenden Phasengrenzflächen der Mikroblasen reichern sich neben Restmengen von LTP1500 andere amphiphile Proteine an, wie etwa basische oberflächenaktive Proteine von *F. culmorum* oder auch Hydrophobine. Diese Proteine neigen unter bestimmten Bedingungen ebenfalls, ähnlich Hydrophobinen, zur nahezu irreversiblen Aggregation. Durch die zu LTP1500 gleichartige Ladung dieser Proteine werden diese von einander abgestoßen. Sie aggregieren in inselartigen, homogenen Bereichen der Blasenhaut, die mangels fester Vernetzung eine Schwächung der Blasenhaut bewirken. Nach Literaturangaben kann die Blasenhaut zusätzlich durch die Einlagerung kleiner hydrophober Peptide geschwächt werden. Solche Peptide entstehen z.B. durch proteolytische Aktivität der Pilze bei der Infektion des Korns. Diese so veränderte Blasenhaut ist noch hinreichend stabil, um das Überleben der Blase unter Druck zu ermöglichen. Beim Druckabfall durch das Öffnen der Flasche gibt diese labile Blasenhaut jedoch nach und die Blase kann durch CO_2-Aufnahme aus der Umgebung weitgehend ungehindert anwachsen. Beim Anwachsen der Blase nach der Druckentlastung setzt die so veränderte Blasenhaut dem Wachstum der Blase keinen nennenswerten Widerstand entgegen. Fragmente der geplatzten Blasenhaut exponieren die hydrophobe, gasbelegte Innenseite zusätzlich zur wässrigen Umgebung. Hierdurch entstehen in großer Zahl hydrophobe Kondensationspunkte für die weitere Entbindung von CO_2 mit der Bildung von

Blasen, die durch keine vernetzte, geschlossene Proteinhaut stabilisiert sind und daher ebenfalls ungehindert wachsen und aufsteigen können. Das ungehinderte Anwachsen wird durch den Mangel an amphiphilen Proteinen unterstüzt. Das Bier schäumt über.

5 Literatur

Alizadeh-Pasdar, N., Li-Chan, E. (2001). Application of PRODAN fluorescent probe to measure surface hydrophobicity of proteins interacting with κ-carrageenan. *Food Hydrocolloids,* 15, 285-294.

Amaha, M., Horiuchi, T. (1979). Das Biergushing und seine Ursache (japanisch). *Nihon Jozo Kyokai-shi,* 74, 805-812.

Amaha, M., Kitabatake, K. (1981). in: Brewing Science, Vol.2, Pollock, J. (ed.). Academic Press, London, 1981, 457-489.

Amaha, M., Kitabatake, K., Nagakawa, A., Yoshida, J., Harada, T. (1973). Gushing inducers produced by some mould strains. *Proceedings of the EBC Congress,* Salzburg, 1973, 381-398.

Anonymus (1941). Laboratory case reports, Gushing beer in action. *Wallerstein Laboratories Communications,* 4/13, 189-191.

Antipova, A., Semenova, M. (1997). Effect of neutral carbohydrate structure in the set glucose/sucrose/maltodextrin/dextran on protein surface activity at air/water interface. *Food Hydrocolloids,* 11, 71-77.

Askolin, S., Penttilä, M., Wösten, H.A.B., Nakari-Setälä, T. (2005). The Trichoderma reesei hydrophobin genes hfb1 and hfb2 have diverse functions in fungal development. *FEMS Microbiology Letters,* 253 (2), 281-288.

Backleh, M. (2001). Zur Effizienz der Zerschäumungsanalyse bei der Anreicherung von Inhaltsstoffen aus pflanzlichen Lebensmitteln. Dissertation, Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan, TU München, München, D.

Baier, S., McClements, D. (2005). Influence of Cosolvent Systems on the Gelation Mechanism of Globular Protein: Thermodynamic, Kinetic, and Structural Aspects of Globular Protein Gelation. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety,* 4, 43-54.

Bamforth, C.W., Kapp, G.R., Smythe, J.E. (2001). The measurement of hydrophobic polypeptides in beer using the fluorochrome 1-anilino-8-naphtalenesulfonate. *Food Chemistry,* 75, 377-383.

Bamforth, C., Kanauchi, M. (2003). Interactions between polypeptides derived from barley and other beer components in model foam systems. *Journal of the Science of Food and Agriculture,* 83, 1045-1050.

Beattie, G. (1951). British Views on the Fobbing and Gushing Beer Problem. *Wallerstein Laboratories Communications,* 14, 81-99.

Binks, B. (2002). Particles as surfactants - similarities and differences. *Current Opinion in Colloid & Interface Science,* 7, 21-41.

Blum, H., Beier, H., Gross, H. (1987). Improved silver straining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis,* 8, 93-99.

Brenner, M. (1957). Gushing beer - II. Causes and some means of prevention. *Proceedings of the EBC Congress*, Kopenhagen 1957, 349-359.

Caessen, P.W., Gruppen, H., Slangen, C.J., Visser, S., Voragen, A.G. (1999). Functionality of ß-Casein peptides: Importance of amphipathicity for emulsion-stabilizing properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* 47, 1856-1862.

Claessen, D., Stokroos, I., Deelstra, H., Penninga, N., Bormann, C., Salas, J., Dijkhuizen, L., Woesten, H. (2004). The formation of the rodlet layer of streptomycetes is the result of the interplay between rodlins and chaplins.

Molecular Microbiology, 53, 433-443.

Cottingham, M., Bain, C., Vaux, D. (2004). Rapid method for measurement of surface tension in multiwell plates. *Laboratory Investigation* 84, 523-529.

Curtis, N., Martindale, L. (1967). Studies on Gushing (I). *Journal of the Institute of Brewing*, 67, 417-421.

Curtis, N., Ogie, P., Carpenter, P. (1961). Studies on Gushing - II. Examination of some brewing factors. *Journal of the Institute of Brewing,* 67, 422-427.

Damodaran, S. (2004). Adsorbed layers formed from mixtures of proteins. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 9, 328–339.

Davy, A., Svendsen, I., Bech, L., Simpson, D., Cameron-Mills, V. (1999). LTP is not a cysteine endoprotease inhibitor in barley grains. *Journal of Cereal Science*, 30, 237-244.

de Vocht, M., Reviakine, I., Wösten, H., Brisson, A., Wessels, J., Robillard, G. (2000). Structural and functional Role of the disulfide bridges in the hydrophobin SC3. *The Journal of Biological Chemistry*, 275, 28428-28432.

Dickinson, E. (1999). Adsorbed protein layers at fluid interfaces: interactions, structure and surface rheology. *Colloids and Surfaces B - Biointerfaces,* 15, 161-176.

Donhauser, S., Weideneder, A., Winnewisser, W. und Geiger, E. (1990). Test zur Ermittlung der Gushingneigung von Rohfrucht, Malz, Würze und Bier. *Brauwelt,* 130, 1317-1320.

Dons, J., de Vries, O., Wessels, J., (1979). Characterization of the genome of the basidiomycete *Schizophyllum commune. Biochimica et Biopysica Acta,* 563, 100-112.

Draeger, M. (1996). Physikalische Überlegungen zum Thema Gushing. *Brauwelt,* 6, 259-264.

Elliot, M., Talbot, N. (2004). Building filaments in the air: aerial morphogenesis in bacteria and fungi. *Current opinion in microbiology,* 7, 594-601.

Fayle, S., Healy, J., Brown, P., Reid, E., Gerrard, J., Ames, J. (2001). Novel approach to the analysis of the Maillard reaction of proteins. *Electrophoresis,* 22, 1518-1525.

Fischer, S. (2001). Blasenbildung von in Flüssigkeiten gelösten Gasen. Dissertation an der TU München, München, D.

Garcia-Olmedo, F., Molina, A., Segura, A., Moreno, M. (1995). The defensive role of nonspecific lipid-transfer proteins in plants. *Trends in Microbiology,* 3, 72-74.

Gardner, J. (1973). The Mechanism of Gushing - a Review, *Journal of the Institute of Brewing.* 79, 275-283.

Gjerstsen, P., Trolle, B., Andersen, K. (1965). Studies on Gushing - II. Gushing caused by microorganisms, especially *Fusarium* species. *Proceedings of the EBC Congress,* Stockholm 1965, 428-438.

Gjertsen, P., Trolle, B., Andersen, K. (1963). Wheatered barley as a contributory cause of gushing in beer. *Proceedings of the EBC Congress,* Brüssel, 320-333.

Görg A., Boguth, G., Drews, O., Köpf, A., Lück, C., Reil, G., Weiss, W. (2002). Two-Dimensional Electrophoresis with Immobilized pH Gradients for Proteome Analysis : A Laboratory Manual; zum Download als pdf-Dokument auf der homepage der Arbeitsgruppe von Prof. A. Görg, http://www.wzw.tum.de/blm/deg/2D-Manual.pdf

Görg, A. , Obermaier, C. , Boguth, G. , Harder, A. , Scheibe, B. , Wildgruber, R. , Weiss, W. (2000). The current state of two-dimensional gel electrophoresis with

immobilized pH gradients. *Electrophoresis,* 21, 1037-1053.

Gschwendtner, O. *(*2000). Anreicherung von Pflanzenproteinen mit Hilfe der adsorptiven Zerschäumung. Dissertation, Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan, TU München, München, D.

Guggenberger, J. (1962 a). Ein Beitrag zur Klärung von Fragen der "Bindung und Entbindung von Kohlensäure" in Bier und anderen kohlensäurehaltigen Getränken. *Brauwissenschaft,* 15 (12), 396-399.

Guggenberger, J. (1962 b). Neue Erkenntnisse über die "Bindung und Entbindung von Kohlensäure" in Bier und und ihre Bedeutung für die Praxis der Heißabfüllung. *Brauwissenschaft,* 15 (6), 163-172.

Guggenberger, J., Kleber, W. (1963). Über den Mechanismus des Wildwerdens von Bier. *Proceedings of the EBC Congress,* Brüssel 1963, 299-317.

Gunning, P., Mackie, A., Wilde, P., Woodward, N., Morris, V. (2004). The effect of surfactant type on protein displacement from the air-water interface. *Food Hydrocolloids,* 18, 509-515.

Haikara, A., Sarlin, T., Nakari-Setälä, T., Penttilä, M. (1999). Method for determining a gushing factor for a beverage. International Publication Number WO99/54725.

Helm, E., Richardt, O. (1938). Das Überschäumen (Wildwerden) des Bieres. *Wochenschrift für Brauerei,* 12, 89-94.

Hippeli, S., Elstner, E.F. (2002). Are hydrophobins and/or non-specific lipid transfer proteins responsible for gushing in beer? New hypotheses on the chemical nature of gushing inducing factors. *Zeitschrift für Naturforschung,* 57c, 1-8.

Horiuchi, G., Yabuuchi, S., Suzuki, S., Amaha, M., (1978). Method of preventing gushing of packaged beer. United States Patent, Appl. No. 915922.

Jégou, S., Douliez, J., Molle, D., Boivin, P., Marion, D. (2000). Purification and structural characterisation of LTP1 polypeptides from beer. *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* 48, 5023-5029.

Jones, B., Marinac, L. (1995). Barley LTP1 (PAPI)and LTP2: inhibitors of green malt endoproteases. Journal of the ASBC, 53, 194-195.

Jones, B., Marinac, L. (2000). Purification and partial characterization of a second cysteine proteinase inhibitor from ungerminated barley (*Hordeum vulgare* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* 48, 257-264.

Jones, S., Evans, G., Galvin, K. (1999). Bubble nucleation from gas cavities – a review. *Advances in Colloid and Interface Science,* 80, 27-50.

Kapp, G.R., Bamforth, C.W. (2002). The foaming properties of proteins isolated from barley. *Journal of the Science of Food and Agriculture,* 82, 1276-1281.

Kato, A., Nakai, S. (1980). Hydrophobicity determined by a fluorescence probe method and its correlation with surface properties of proteins. *Biochimica et Biophysica Acta,* 624, 13-20.

Kershaw, M., Talbot, N. (1998). Hydrophobins and repellents: proteins with fundamental roles in fungal morphogenesis. Fungal Genetics and Biology, 23, 18-33.

Kershaw, M., Thornton, C., Wakley, G., Talbot, N. (2005). Four conserved intramolecular disulphide linkages are required for secretion and cell wall localization of a hydrophonin during fungal morphogenesis. *Molecular Microbiology,* 56, 117-125.

Kitabatake, K. (1978). A wort component responsible for gushing in beer. *Bulletin of Brewing Science,* 24, 21-32.

Kitabatake, K. (1981). Das Biergushing und seine Ursache (japanisch). Nihon Jozo Kyokai-shi, 76, 716-718.

Kitabatake, K., Amaha, M. (1977). Effect of chemical modifcations on the gushing inducing activity of a hydrophobic protein produced by a *Nigropspora* sp.. *Agricultural and Biological Chemistry,* 41, 1011-1019.

Kleemola, T., Nakari-Setälä, T., Linder, M., Penttilä, M., Kotaviita, E., Olkku, J., Haikara, A. (2001). Characterisation of the gushing factors produced by fungi. *Proceedings of the EBC Congress,* Budapest, Fachverlag Hans Carl, Nürnberg, Germany, contribution 12.

Koehler, S., Ho, T. (1988). Purification and characterization of gibberellic acid-induced cysteine endoproteases in barley aleurone layers. Plant Physiology, 87, 95-103

Kogan, M., Dalcol, I., Gorostiza, P., Lopez-Iglesias, C., Pons, R., Pons, M., Sanz, F., Giralt, E. (2002). Supramolecular Properties of the Proline-Rich γ-Zein N-Terminal Domain. *Biophysical Journal,* 83, 1194-1204.

Konrad, G., Kleinschmidt, T., Rohenkohl, H., Reimerdes, E.H. (2005). Peptic partial hydrolysis of whey protein concentrate for modifying the surface properties of whey protein. II. Effects on the emusifying and foaming properties. *Milchwissenschaft,* 60 (2). 195-198.

Kunert, M., Sacher, B., Back, W. (2001). Ergebnisse einer Umfrage in deutschen Brauereien zum Thema "Gushing". *Brauwelt,* 9/10, 350-362.

Laible, B., Geiger, E. (2003). Primary gushing and polar lipids - an important addition to gushing research. *Proceedings of the EBC Congress,* Dublin, Fachverlag Hans Carl, Nürnberg, Germany, 915-922.

Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 227, 680-685.

Laufer, S. (1948). Technical Memorandum No. 38, Schwarz Laboratories, Inc.

Leisegang, R., Stahl, U. (2005). Degradation of a Foam-Promoting Barley Protein by a Proteinase from Brewing Yeast. *Journal of the Institute of Brewing,* 111, 112–117.

Liger-Belair, G. (2005). The Physics and Chemistry behind the Bubbling Properties of Champagne and Sparkling Wines: A State-of-the-Art Review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* 53, 2788-2802.

Liger-Belair, G., Vignes-Adler, M., Voisin, C., Robillard, B., Jeandet, P. (2002). Kinetics of Gas Discharging in a Glass of Champagne: The Role of Nucleation Sites. *Langmuir,* 18, 1294-1301.

Mackie, A. (2004). Structure of adsorbed layers of mixtures of proteins and surfactants. *Current Opinion in Colloid & Interface Science,* 9, 357-361.

Mankel, A., Krause, K., Kothe, E. (2002). Identification of a hydrophobin gene that is developmentally regulated in the ectomycorrhizal fungus *Tricholoma terreum*. *Applied and Environmental Microbiology,* 68, 1408-1413.

Marinova, K., Gurkov, T., Velev, O., Ivanov, I., Campbell, B., Borwankar, R. (1997). The role of additives for the behaviour of thin emulsion films stabilized by proteins. *Colloids and Surfaces, A: Physicochemical and Engineering Aspects,* 123-124, 155-167.

Marion, D., Jégou, S., Douliez, J., Gaborit, T., Boivin, P. (2001). Generation of foaming proteins along the malting and brewing processes. *Proceedings of the EBC Congress,* Budapest 2001, contribution 67.

Martin, G., Gordon, C., McCormick, C. (1999). Adsorption of a fungal hydrophobin onto surfaces as mediated by the associated polysaccharide Schizophyllan. *Biopolymers,* 49, 621-633.

Matsudaira, P. (1987). Sequence from picomole quantities of proteins blotted onto PVDF membranes. *Journal of Biological Chemistry,* 262, 10035-10038.

McClements, M. (2002). Modulation of Globular Protein Functionality by Weakly Interacting Cosolvents. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition,* 42, 417–471.

MEBAK (1996). Pfenniger, H. (Hrsg.), Brautechnische Analysenmethoden, Band III, Selbstverlag der MEBAK, Freising.

Miller, R., Fainerman, V., Leser, M., Michel, M., (2004). Kinetics of adsorption of proteins and surfactants. *Current Opinion in Colloid & Interface Science,* 9, 350–356.

Muehlencoert, E., Mayer, I., Zapf. M., Vogel, R., Niessen, L. (2004). Production of Ochratoxin A by *Aspergillus ochraceus*. *European Journal of Plant Pathology,* 110, 651–659.

Murray, B., Ettelaie, R. (2004). Foam stability: proteins and nanoparticles. *Current Opinion in Colloid & Interface Science,* 9, 314–320.

Nakai, S., Li-Chan, E. (1988). Hydrophobic interactions in food systems, CRC Press, Boca Raton.

Nakari-Setälä, T., Aro, N., Ilmén M., Munoz, G., Kalkinnen, N., Penttilä, M. (1997). Differential expression of vegetative and spore-bound hydrophobins of *Trichoderma reesei*. *European Journal of Biochemistry,* 248, 415-423.

Narziß, L. (1995). Abriß der Bierbrauerei, 6. Aufl., Verlag Enke, Stuttgart, S. 325 ff.

Narziß, L., Back, W., Reicheneder, E., Simon, A., Grandl, R. (1990). Untersuchungen zum Gushing-Problem. *Monatssschrift für Brauwissenschaft,* 43, 296-305.

Niessen, L., Donhauser, S., Weideneder, A., Geiger, E., Vogel, H. (1992). Mykologische Untersuchungen an Cerealien und Malzen im Zusammenhang mit dem Wildwerden (Gushing) des Bieres. *Brauwelt,* 132, 702-714.

Nirenberg, H.I. (1976). Untersuchungen über die morphologische und biologische Differenzierung in der *Fusarium*-Sektion *Liseola*. *Mitteilungen der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft Berlin-Dahlem*, 169, 1-117.

Perrocheau, L., Rogniaux, H., Boivin, P., Marion, D. (2005). Probing heat-stable water-soluble proteins from barley to malt and beer. *Proteomics,* 5, 2849-2858.

Prentice, N., Sloey, W. (1960). Studies on barley microflora of possible importance to malting and brewing quality. I. The treatment of barley during malting with selected microorganisms. *Proc. Am. Soc. Brew. Chem.*, 28-32.

Pugnaloni, L., Ettelaie, R., Dickinson, E. (2003). Do mixtures of proteins phase separate at interfaces?. *Langmuir,* 19, 1923-1926.

Ribéreau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A., Dubourdieu, D. (1998). Traité d'Oenologie, tome II, Dunod, Paris, Kap. 1.5.1.

Rost, B. (2001). Protein secondary structure prediction continues to rise. *Journal of Structural Biology,* 134, 204-218.

Rost, B., Yachdav, G., Liu, J. (2004). The PredictProtein server. *Nucleic Acids research,*

32, *web server issue*, W321-326.

Rouimi, S., Schorsch, C., Valentini, C., Vaslin, S. (2005). Foam stability and interfacial properties of milk protein-surfactant systems. *Food Hydrocolloids,* 19, 467-478.

Sarlin, T., Nakari-Setälä, T., Linder, M., Penttilä, M., Haikara, A. (2005). Fungal hydrophobins as predictors of the gushing activity of malt. *Journal of the Institute of Brewing,* 111 (2), 105-111.

Schägger, H., von Jagow, G. (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range of 1 to 100 kDa. *Analytical Biochemistry,* 166, 368-379.

Semenova, M., Belyakova, L., Antipova, A., Jubanova, M. (1999). Influence of maltodextrins with different dextrose equivalent on the thermodynamic properties of legumin in a bulk and at the air-water interface. *Colloids and Surfaces B - Biointerfaces,* 12, 287-297.

Semenova, M., Belyakova, L., Antipova, A., Polikarpov, Y., Klouda, L., Markovic, A., Ilyn, M. (2003). Effect of maltodextrins on the surface activity of small-molecule surfactants. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces,* 31, 47-54.

Sloey, W., Prentice, N. (1962). Effects of *Fusarium* isolates applied during malting on properties of malt. *Proc. Am. Soc. Brew. Chem.*, 24-29.

Spanu, P. (1997). HCF-1, a hydrophobin from the tomato pathogen *Cladosporium fulvum*. *Gene,* 193, 89-96.

Subirade, M., Salesse, C., Marion, D. und Pezolet, M. (1995). Interaction of non specific wheat lipid transfer protein with phospholipid monolayers imaged by fluorescence microscopy and studies by infrared spectroscopy. *Biophysical Journal,* 69, 974-988.

Talbot, N., Kershaw, M., Wakley, G., de Vries, O., Wessels, J., Hamer, J. (1996). MPG1 encodes a fungal hydrophobin involved in surface interactions during infection-related Development of *Magnaporthe grisea. The Plant Cell,* 8, 985-999.

Temple, B., Horgen, P., Bernier, L., Hintz, W. (1997). Cerato-ulmin, a hydrophobin secreted by the causal Agents of dutch elm desease is a parasitic fitness factor. *Fungal Genetics and Biology,* 22, 39-53

Thorne, R., Helm, E. (1957). Contribution to the study of overfoaming beer. *Journal of the Institute of Brewing,* 63, 415-435.

Tofani, L., Feis, A., Snoke, R., Berti, D., Baglioni, P., Smulevich, G. (2004). Spectroscopic and interfacial properties of myoglobin/surfactant complexes. *Biophysical Journal,* 87, 1186-1195.

Tomlinson, C. (1867). On the so-called 'inactive' condition of solids. The London, Edinburgh and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science, 34, 229-230.

Tronin, A., Dubrovsky, T., Dubrovskaya, S., Radicchi, G., Nicolini, C. (1996). Role of protein unfolding in a monolayer formation on air-water interface. *Langmuir,* 12, 3272-3275.

Troost, G., Bach, H., Rhein, O. (1995). Sekt, Schaumwein, Perlwein, 2. Aufl., Ulmer, Stuttgart, Kap. 6.3.

Uruakpa, F., Arntfield, S. (2006). Surface hydrophobicity of commercial canola grain proteins mixed with k-carrageenan or guar gum. *Food Chemistry,* 95, 255-263.

Voutsinas, L., Cheung, E., Nakai, S. (1983). Relationships of hydrophobicity to emulsifying properties of heat denatured Proteins. *Journal of Food Science,* 48, 26-32.

Wei, X., Chang, Z., Liu, H. (2003). Influence of sodium dodecyl sulphate on the characterisitcs of bovine serum albumin solutions and foams. *Journal of Surfactants and Detergents,* 6, 107-112.

Weideneder, A. (1992). Untersuchungen zum malzverursachten Wildwerden (Gushing) des Bieres, Dissertation, Fakultät für Brauwesen, Lebensmitteltechnologie und Milchwissenschaft, TU München, München ,D

Wessels, J. (1996). Fungal hydrophobins: proteins that function at an interface. *Trends in Plant Science,* 1, 9-15.

Whitaker, D. (1951). Studies in the biochemistry of cellulolytic microorganisms, Carbon balances of wood-rotting fungi in surface culture. *Canadian Journal of Botany,* 29, 159-175.

Wilt, P. (1986). Nucleation rates and bubble stability in water-carbon dioxide solutions. *Journal of Colloid and Interface Science,* 112, 530-538.

Windisch, W. (1923). Wildes Bier. *Wochenschrift für Brauerei,* 40, 121 ff.

Windisch, W. (1923). Wildes Bier. *Wochenschrift für Brauerei,* 40, 70.

Wösten, H., de Vocht, M. (2000). Hydrophobins, the fungal coat unravelled. *Biochimica et Biophysica Acta,* 1469, 79-86.

Wösten, H., de Vries, O., Wessels, J. (1993). Interfacial self-assembly of a fungal hydrophobin into a hydrophobic rodlet layer. *The Plant Cell,* 5, 1567-1574.

Wösten, H., Schuren, F., Wessels, J. (1994). Interfacial self-assembly of a hydrophobin into an amphipathic membrane mediates fungal attachment to hydrophobic surfaces. *EMBO Journal,* 13, 5848-5854.

Ying, S., Feng, M. (2004). Relationship between thermotolerance and hydrophobin-like proteins in aerial conidia of *Beauveria bassiana* and *Paecilomyces fumoroseus* as biocontrol agents. *Journal of Applied Microbiology,* 97, 323-331

Yoshida, J., Nakagawa, A., Eto, M., Kitabatake, K., Amaha, M. (1975). Fungal flora of barley grains and the beer-gushing inducing potential of the mold isolated. *Journal of Fermentation Technology*, 53, 184-188.

Yount, D. (1982). On the evolution, generation, and regeneration of gas cavitation nuclei. *Journal of the Acoustical Society of America*, 71, 1473-1481.

Zapf, M., Theisen, S., Vogel, R.F., Hecht, D., Elstner, E.F., Niessen, L. (2005), Characterization of surface active proteins from *Fusarium* spezies and grain affecting foam stability. *Proceedings of the 30th EBC Congress*, Prague 2005, Fachverlag Hans Carl, Nürnberg, contrib. 143.

6 Zusammenfassung - Summary

Zusammenfassung

Als "Gushing" oder "Wildwerden von Bieren" bezeichnet man das mehr oder weniger heftige Überschäumen von Flaschenbieren nach sachgemäßer Öffnung. Zwei grundsätzlich verschiedene Gruppen von Faktoren werden als Auslöser diskutiert. Partikel, wie Calciumoxalat oder Feingur, zu hoher CO_2-Gehalt oder Nachgärung in der Flasche werden als ursächlich für das sog. technologisch bedingte oder sekundäre Gushing angesehen. Das primäre oder malzverursachte Gushing wird dagegen mit einem durch Schimmelpilzbefall qualitativ veränderten Malz in Verbindung gebracht. Trotz intensiver Forschung war über den Zusammenhang zwischen dem Befall des Braugetreides mit Schimmelpilzen und dem Auftreten von primärem Gushing immer noch sehr wenig bekannt. In jüngster Zeit wurden neue Hypothesen zur chemischen Natur und zum Ursprung der Auslöser des primären Gushings formuliert, bei denen zwei erst kürzlich beschriebene Klassen von Proteinen, die pilzspezifischen Hydrophobine und die pflanzentypischen non-specific lipid transfer proteins (ns-LTPs) im Vordergrund stehen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Untersuchungen zur Bildung von oberflächenaktiven Proteinen durch *F. culmorum* und *F. graminearum* durchgeführt. Beide Arten waren fähig, oberflächenaktive Proteine zu bilden und gaben diese ins Medium ab. Durch Kontakt mit dem Medium konnten PTFE oder Parafilm stabil benetzbar gemacht werden. Stärke und Zeitpunkt der Ausscheidung oberflächenaktiver Proteine waren abhängig von Art, Isolat und Medium. Im Extremfall wurde der Benetzungseffekt wieder vollständig abgebaut. Diese Variabilität kann erklären, warum nicht jeder Befall von Braugetreide mit Fusarien in gleichem Maße zu Gushing führt. Durch Zusatz von Detergentien unterschiedlicher Typen zum Bier wurde gezeigt, dass Gushing nicht durch erniedrigte Oberflächenspannung ausgelöst wird, sondern niedrige Oberflächenspannung gegebenenfalls eine Begleiterscheinung ist.

Die aus *F. culmorum* isolierten oberflächenaktiven Proteine zeigten Eigenschaften, die auch von Hydrophobinen erwartet werden, ohne jedoch zu bekannten Hydrophobin-Klassen homolog zu sein. Die Ähnlichkeiten lagen in der Bereitschaft zur Bildung stabiler Aggregate, dem Löslichkeitsverhalten der Aggregate, der

elektrophoretischen Mobilität und teilweise dem sauren isoelektrischen Punkt. Datenbankvergleiche von Teilen der Aminosäuresequenzen ergaben Homologien zu Proteinen, die im Genom von *F. graminearum* als hypothetische Proteine annotiert sind. Die Homologie zwischen Afpa und PhiA aus *E. nidulans* legt eine Rolle von AfpA in der Morphogenese nahe. Die oberflächenaktiven Proteine aus *F. culmorum* wiesen isoelektrische Punkte um pH 3,4 und nahe pH 9 auf, die von *F. graminearum* ebenfalls vorwiegend nahe pH 9. Zwei der aus *F. culmorum* isolierten Proteine (14 kDa und AfpA) verstärkten in Konzentrationen um 1 ppm bestehendes Gushing. Die Verstärkung des Gushings war höher nach einer der Würzekochung ähnlichen Vorbehandlung der Proteine. Gegen die nativen Proteine wurden polyklonale Antiseren in Kaninchen hergestellt. Die vom AfpA-Antiserum erkannten Epitope wiesen hohe thermische Stabilität auf. Die Antiseren reagierten auch mit den Maillardprodukten der Proteine. AfpA-Protein konnte über Western Blots bei beiden untersuchten *Fusarium*-Arten festgestellt werden. Es wurde darüber hinaus in infiziertem Malz mit hohem Gushing-Potential gefunden. Die Proteine aus *F. culmorum* und *F. graminearum* zeigten eine hohe Aktivität in Messungen der Oberflächenspannung. Die Oberflächenhydrophobizität der Proteine wurde durch Erhitzung teilweise positiv beeinflußt und zeigte darüber hinaus eine Abhängigkeit vom pH-Wert.

Die Wirkung des Wachstums von *F. culmorum* und *F. graminearum* bei der Mälzung von Weizen wurde ebenfalls durch die Messung der Oberflächenhydrophobizität der in den Malzen enthaltenen Proteine untersucht. Durch die Infektion mit gushing-relevanten Fusarien wurde die Oberflächenhydrophobizität massiv verringert. Die Verringerung war mit dem Überschäumvolumen im Gushingtest korreliert.

Es wurden Brauversuche mit transgenen Klonen von *S. cerevisiae* durchgeführt, die während der Gärung die Produktion eines oberflächenaktiven Proteins aus Weizen (LTP1500) und zweier Hydrophobine aus *F. culmorum* ermöglichten. LTP1500 erzeugte wie erwartet kein Gushing. Durch das so produzierte Klasse II-Hydrophobin FcHyd5p aus *F. culmorum* konnte Gushing ausgelöst werden, nicht jedoch durch das Klasse I-Hydrophobin FcHyd3p. Dieses Ergebnis belegt einen Einfluss oberflächenaktiver pilzlicher Proteine auf Gushing, wobei offensichtlich nicht die extremen Eigenschaften von Klasse I-Hydrophobinen ausschlaggebend sind. Weiterhin eröffnen diese transgenen Hefen neue Möglichkeiten in der Gushing-Forschung, da nun aus einer Würze gushendes und stabiles Bier

hergestellt werden können.

Summary

The more or less tempestuous foaming-over of bottled beer after appropriate opening of the bottle is called 'gushing'. Two distinct groups of factors are discussed as triggers. Particles like crystals of calcium oxalate or fine diatomaceous earth, excessive CO_2 content or unintended secondary fermentation of the bottled beer based on a too high residual extract are recognised as sources of secondary, or technological, gushing. Primary or malt-related gushing is caused by a malt qualitatively altered by fungal infection of the cereal grain. In spite of extensive research little is known as yet about the interrelation of mould infestation and primary gushing. Recently new hypotheses have been suggested on the chemical nature and origin of causal agents of primary gushing, focussing on fungal hydrophobins and non-specific lipid transfer proteins (ns-LTPs) found in cereals.

In the study presented here, research was conducted on surface-active proteins produced by *F. culmorum* and *F. graminearum*. Both species were found to be able to produce such proteins and to secrete them into the culture medium. PTFE or Parafilm can be made wettable by contact with the culture medium. Intensity and moment of secretion of the surfactant proteins depended on species, strain and medium. In extremo the wetting effect was annulled within the time of culturing. This variability might explain why not every infection with Fusaria leads to primary gushing. The addition of various types of detergents proved that the mere reduction of surface tension does not cause gushing, but is, if occurring, a concomitant phenomenon.

The proteins isolated from cultures of *F. culmorum* displayed properties which were in part similar to those of hydrophobins. The similarities concerned the ability to form stable aggregates, the solubility of such aggregates, the electrophoretical mobility and in part, the acidic isoelectric point. Investigation done in genome databases using parts of the amino acid sequences of these proteins revealed homologies to proteins of F. graminearum. So far however, these genes have only been annotated as hypothetical proteins, their function and structure remaining unknown. Homology between AfpA and PhiA of *E. nidulans* suggests a role of AfpA

in morphogenesis. The surfactant proteins of *F. culmorum* displayed isoelectric points at pH 3.4 and close to pH 9, those of *F. graminearum* mostly close to pH 9. Two of the proteins isolated from cultures of *F. culmorum* (14 kDa and AfpA) intensified existing gushing at concentrations of 1 ppm. The intensification was even higher after preliminary treatment of the proteins close to the brewing process, which was suitable to cause Maillard reaction. The epitopes of the proteins recognised by AfpA-antiserum were found to be heat stable. Polyclonal antisera were raised against these two proteins in rabbits. These antisera proved also reactive against Maillard products of the proteins. One of the proteins (AfpA) could be found in the two species by means of western blot technique. This protein was also found in infected malt with a high gushing propensity. The proteins of *F. culmorum* and *F. graminearum* showed a significant reduction of surface tension. The surface hydrophobicity of these proteins was in part positively influenced by heat treatment and depended on their pH value. Infection of germinating wheat with *F. culmorum* and *F. graminearum* caused a strong reduction of surface hydrophobicity of the proteins contained in the resulting malts. The reduction of surface hydrophobicity was correlated to the gushing propensity of the malt.

Brewing experiments were conducted to produce potential gushing factors *in situ* during fermentation. This was achieved by fermentation with transgenic yeasts containing plasmids which encode for the genes of two hydrophobins of *F. culmorum* and of wheat lipid transfer protein (LTP1500), respectively. Expression of these genes was under control of constitutive TPI promotor. The resulting beers were bottled and examined for the occurrence of gushing. Gushing was found to be induced by the class II hydrophobin FcHyd5p of *F. culmorum,* but not by LTP1500 and class I-hydrophobin FcHyd3p. This suggests a participation of surface active fungal proteins in gushing without the need of the extreme properties of class I hydrophobins. Furthermore, these transgenic yeasts offer new possibilities in gushing research, enabling production of gushing and non-gushing beers from identical wort.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Michael Wolfram Zapf
geb. 03. Juni 1977 in München
ledig, keine Kinder

Schulbildung

1983-1987	Grundschule in München
1987-1996	Staatliches math.-nat. Max-Planck-Gymnasium in München Abiturnote: 1,1

Zivildienst

1996-1997	Wolfart-Klinik in Gräfelfing

Studium

1997-2002	Studium Brauwesen und Getränketechnologie an der TU München, Weihenstephan. Abschluß als Dipl.-Ing. Univ., Note: 1,4 Diplomarbeit: Enzymatik und pH-Wert-Abhängigkeit der Ochratoxin A-Biosynthese, Note: 1,0

Praktika und Berufstätigkeit

08/1997-10/1997	Paulaner Brauerei, München
02-03/1998 und 09-10/1998	Forschungsbrauerei Jakob, München
03-04/2000	Native Brewing Co., Alexandria, VA, USA
7/2002-10/1002	wissenschaftlicher Angestellter am Lehrstuhl für Lebensmittelverfahrenstechnik und Molkereitechnologie

Promotion

11/2002-05/2006	wissenschaftlicher Angestellter am Lehrstuhl für Technische Mikrobiologie: Charakterisierung oberflächenaktiver Proteine von *Fusarium* spp. und deren Einfluss auf die Blasenstabilisierung in Bier

Zusatzqualifikationen

Umgangserlaubnis für Seuchenerreger nach §44 IfSG
Fortbildung zum Projektleiter nach §15 GenTSV
Teilnahme an Ringversuchen des Landesgesundheitsamtes Baden-Württemberg