



*Projekttitel:*

# Inhibierung filamentöser Pilze während der Mälzung durch Antifungalprotein

*Förderkennzeichen:*

49VF090046

*Name der Forschungsstelle(n):*

Forschungsinstitut für Rohstoffe (FIR)

*Kontakt:*

Henrike Vorwerk, vorwerk@vlb-berlin.org

*Bewilligungszeitraum:*

1.4.2010 – 31.3.2012

**INNO-KOM**

Gefördert durch:



Bundesministerium  
für Wirtschaft  
und Energie

aufgrund eines Beschlusses  
des Deutschen Bundestages

# SCHLUSSBERICHT



**WISSEN  
SCHAFFT  
QUALITÄT**

## **Impressum**

### **Herausgeber:**

Versuchs- und Lehranstalt für Brauerei in Berlin (VLB) e.V.  
Forschungskoordination - Gerhard Andreas Schreiber  
Seestraße 13, 13353 Berlin, Deutschland

Vereinsregister-Nr.: 24043 NZ, Amtsgericht Berlin-Charlottenburg

[www.vlb-berlin.org](http://www.vlb-berlin.org)

Gefördert durch das Bundesministerium für Wirtschaft und Energie aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages.

Alle Rechte vorbehalten, sofern nicht im Text nicht anders angegeben.

Kein Teil des Berichts darf ohne schriftliche Genehmigung des Herausgebers in irgendeiner Form reproduziert werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Handelsnamen, Warenbezeichnungen usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen in Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürfen.

All rights reserved (including those of translation into other languages).

No part of this book may be reproduced in any form.

**Kurzbeschreibung zum FuE-Vorhaben**

**Reg.-Nr.:** 49VF090046  
**Kurztitel:** Inhibierung filamentöser Pilze während der Mälzung durch Antifungalprotein  
**Laufzeit:** 01.04.2010 – 31.03.2012

|  |
|--|
| <p><u>Name und Anschrift des Zuwendungsempfängers</u></p> <p>Versuchs- und Lehranstalt für Brauerei in Berlin (VLB) e.V.<br/>         Seestraße 13, 13353 Berlin</p>   |
| <p><u>Kurzfassung (Zielstellung, Ergebnisse)</u></p> <p>Das Forschungsvorhaben untersuchte die Möglichkeiten der Inhibierung von <i>Fusarium ssp.</i> und anderen filamentösen Pilzen während des Mälzungsprozesses durch die gezielte Applikation eines natürlichen Anti-Fungal-Proteins (AFP).</p> <p>Im Rahmen des Forschungsprojektes konnte das Verfahren zur AFP-Gewinnung durch Optimierung des Fermentationsverfahrens sowie der Aufreinigungsschritte deutlich beschleunigt und die Ausbeute erhöht werden. In Wirksamkeits- und Sensitivitätstests wurde nachgewiesen, dass das aufgereinigte Protein eine Hemmwirkung gegenüber einem breiten Spektrum an Pilzarten besitzt. Quantitative PCR-Analysen der <i>Fusarium</i>-DNA an Gersten sowie den daraus hergestellten Malzen aus Kleinmälzungsversuchen mit und ohne AFP-Behandlung bestätigten die Hemmwirkung von AFP und zeigten, dass in AFP-behandelten Proben die nachweisbare DNA-Menge getreiderelevanter Pilze (insbesondere <i>Fusarium ssp.</i>) deutlich abnimmt bzw. stagniert. Mykotoxinanalysen der Malze zeigten eine signifikante Abnahme der Toxinbildung in AFP-behandelten Proben während der Mälzung. Der Einfluss der AFP-Behandlung auf das Gushing-Potenzial der Malze konnte bei stark variierenden Ergebnissen nicht eindeutig belegt werden. Eine Beeinträchtigung der Malz- und Würzequalität durch die Applikation von AFP konnte durch die Versuche sicher ausgeschlossen werden. Die Entwicklung einer LC-MS/MS Methode zur Quantifizierung von AFP in Würze und Bier konnte im Rahmen des Projektes insbesondere aufgrund der unzureichenden Stabilität des Standards in organischen Lösemitteln nicht erfolgreich abgeschlossen werden. Alternativ wurde eine semiquantitative MALDI-TOF MS Methode etabliert, die AFP qualitativ bis zu Konzentrationen von 0,4 mg/L Würze detektieren konnte. In Massenspektren von Würzen aus AFP-behandelten Malzen waren Rückstände von AFP nicht nachweisbar.</p> |
| <p><u>Veröffentlichungen</u></p> <p><b>The antifungal protein from <i>Aspergillus giganteus</i> prevents <i>Fusarium</i> growth of barley during the malting process</b></p> <p>International Conference on Antimicrobials Research ICAR 2012, Valladolid (Spain), 3.-5. November 2010</p> <p><u>Patentanmeldungen</u></p> <p>Bisher wurden keine Schutzrechte erworben oder angemeldet</p>  |

31.10.2012  
 Datum

Prof. Dr. Frank Rath  
 Projektleiter

Rechtsverbindliche Unterschrift

## Sachbericht (Schlussbericht)

zum Verwendungsnachweis

zu FuE Vorhaben

|                         |   |
|-------------------------|---|
| <b>Reg.-Nr.:</b>        | <b>VF090046</b>   |
| <b>FuE-Einrichtung:</b> | <b>Versuchs- und Lehranstalt für Brauerei<br/>In Berlin e.V. (VLB)</b>                |
| <b>Titel:</b>           | <b>Inhibierung filamentöser Pilze während der<br/>Mälzung durch Antifungalprotein</b> |
| <b>Projektlaufzeit:</b> | <b>01.04.2010 – 31.03.2012</b>  |

Berlin, den 31.10.2012

Name und Telefonnummer des Projektleiters: Prof. Dr. Frank Rath (030 45080154)

Versuchs- und Lehranstalt  
für Brauerei in Berlin

**VLB**

Firmenstempel

Seestraße 13 • D-13353 Berlin

Unterschrift des Projektleiters

rechtsverbindliche Unterschrift

## **Gliederung des Sachberichtes**

- 1. Technisch-technologische Zielstellung des Vorhabens**
- 2. Darstellung der erzielten Vorhabensergebnisse**
- 3. Bewertung der erzielten Ergebnisse in Gegenüberstellung mit den Zielsetzungen des Antrages, Bezugnahme auf die Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit, Bezugnahme auf die wichtigsten Positionen des zahlenmäßigen Nachweises**
- 4. Darstellung der Innovationspotenziale und Applikationsmöglichkeiten**
  - Wissenschaftliche und wirtschaftliche Bedeutung, Anwendungspotential, Anwendungsbereiche in der mittelständischen Wirtschaft
  - Darlegung der Ergebnisverwertung (eigene Nutzung, Technologietransfer, Know-how-Verkäufe u.a.)
  - Darlegung der Applikationsmöglichkeiten für die mittelständische Industrie
  - Perspektive und Chancen für sich anschließende Entwicklungsarbeiten
- 5. Angaben zu erworbenen bzw. angemeldeten Schutzrechten für Vorhabensergebnisse**
- 6. Zusammenstellung aller erfolgten bzw. geplanten Veröffentlichungen (Artikel in Zeitschriften, Seminare, Schulungen, Vorträge, Messen, Ausstellungen, Präsentationen)**

## 1. FORSCHUNGSZIEL

Das Forschungsvorhaben untersucht die Möglichkeiten der Inhibierung von *Fusarium ssp.* und anderen filamentösen Pilzen während des Mälzungsprozesses durch die gezielte Applikation eines natürlichen Anti-Fungal-Proteins (AFP). Das Projekt umfasst Wirksamkeitstest und Applikationsstudien ebenso wie die intensive Analyse der Auswirkungen des Einsatzes von AFP auf die Verarbeitungsprozesse in der Mälzerei/Brauerei und die Qualität der Produkte Braumalz und Bier. Diese Ergebnisse werden ergänzt durch die Entwicklung geeigneter Nachweisverfahren für AFP und die darauf basierenden Analysen des AFP-Metabolismus während der Vermälzung und während des Brauprozesses.

Die erwarteten Ergebnisse liefern damit grundlegende Erkenntnisse für eine qualifizierte Bewertung der Anwendungsmöglichkeiten von AFP in der Brau- und Malzindustrie. Sie sind darüber hinaus unbedingte Voraussetzung für die dann notwendige Einleitung weiterer Entwicklungsarbeiten z.B. zur Etablierung einer AFP-Produktion im halbertechnischen und industriellen Maßstab sowie zur Optimierung der AFP-Ausbeute in Fermentern mit *Aspergillus giganteus* oder alternativen Organismen.

### DAS ANTIMYKOTIKUM AFP

Das Antifungal-Protein AFP ist ein kleines, sehr stabiles, antifungal wirkendes Protein und wird von dem Schimmelpilz *Aspergillus giganteus* in das Kulturmedium sekretiert. Es konnte bereits gezeigt werden, dass eine Vielzahl von Schimmelpilzen in ihrem Wachstum durch den Einsatz von AFP gehemmt werden. Hierbei ist hervorzuheben, dass das Wachstum anderer Organismen, wie z.B. Säugerzellen, Pflanzen, Hefen und Bakterien nicht von AFP beeinträchtigt wird. Alle bisher bekannten Eigenschaften deuten darauf hin, dass AFP sehr gut geeignet sein könnte, das Wachstum von filamentösen Pilzen während des Mälzen zu hemmen und damit einhergehende Risiken wie einer Neubildung von Mykotoxinen und einer Verstärkung des Gushing-Potezials entgegen zu wirken.

Das Protein wurde bereits erfolgreich durch eine 500 ml Flüssig-Fermentation von *A. giganteus* gewonnen. Die im Labormaßstab gewonnenen Mengen waren ausreichend für notwendige Vorversuche. Für weiterführende Untersuchungen der Anwendungsmöglichkeiten im Technikumsmaßstab (Mälzerei & Brauerei) ist jedoch eine Produktion im größeren Maßstab unentbehrlich. Deshalb soll die Fermentation von *A. giganteus* und die Aufarbeitung des AFPs in einem Technikumsmaßstab etabliert werden.

### SCHIMMELBILDUNG ALS WIRTSCHAFTS- UND GESUNDHEITSRISIKO

Schimmelpilze der Gattungen *Penicillium*, *Aspergillus* und *Fusarium* können auf verschiedene Weise gesundheitsschädigend wirken. Viele Spezies der genannten Gattungen sind als Auslöser von Allergien sowie verschiedener Krankheiten

beschrieben worden (z. B. Asthma, allergischer Alveolitis und Aspergillose) (Al-Alawi *et al.*, 2005). Sie bilden meist hochgiftige Mykotoxine, sekundäre Stoffwechselprodukte, deren Gefahr in einer chronischen Toxizität (Kanzerogenität, Mutagenität und Teratogenität) und in einer akuten Toxizität liegt (Erbrechen und Durchfall). Mit der EU-Verordnung vom 6. Juni 2005 (Verordnung Nr. 1881/2006 der Kommission (EG) vom 19. Dezember 2006) gelten seit 1. Juli 2006 festgelegte Höchstwerte für Mykotoxine in Getreide und Getreideprodukten. Vor allem zur Gattung *Fusarium* gehört eine Vielzahl von Pflanzen schädigenden Schimmelpilzen. Weltweit entstehen sehr große Verluste, die bei der Produktion von Weizen und Gerste allein in den USA auf ca. 2,9 Mrd. US \$ pro Jahr geschätzt wird (Jestoi, 2008). *Fusarium*-Infektionen stellen weltweit eine ernsthafte Bedrohung für die Erntemenge und vor allem die Produktqualität von Getreide dar. In der Braugerstenproduktion sind wichtige Anbaugeländer in Europa, in den USA und Kanada sowie in Russland und China immer wieder von *Fusarium*-Infektionen betroffen. Die Häufigkeit und Intensität des Befalls wird dabei nicht nur von den Wachstumsbedingungen sondern zunehmend auch von acker- und pflanzenbaulichen Maßnahmen beeinflusst. Vor allem die stetige Erhöhung der Getreide- und Maisanteile in Fruchtfolgen sowie der aus betriebswirtschaftlichen Erwägungen notwendige Übergang zu einer ‚pfluglosen‘ Bodenbearbeitung im Vorfeld der Aussaat haben die Ausbreitung von *Fusarium*-Infektionen stark begünstigt.

Braugerste kann bereits vor der Ernte durch sogenannte „Feld-Pilze“ wie *Fusarium* infiziert werden. Dabei können bei bestimmten Temperaturen, entsprechender Feuchtigkeit, ausreichendem Nährstoffangebot oder in bestimmten Entwicklungsphasen eine Vielzahl unterschiedlicher Mykotoxine gebildet werden. Die Mykotoxinbildung ist weiterhin abhängig von der Art, Umfang und Zusammenstellung der Pilzkontamination und der An- bzw. Abwesenheit von antagonistisch wirkenden Mikroorganismen (Wolf-Hall, 2007). Nach der Ernte kann bei unsachgemäßer Lagerung eine Infektion durch sog. „Lager-Pilze“ wie *Aspergillus* und *Penicillium* erfolgen, die unter entsprechenden Bedingungen ebenfalls als Mykotoxinbildner – z.B. Ochratoxin A und div. Aflatoxine – in Erscheinung treten.

In der Brau- und Malzindustrie sind *Fusarium*-Infektionen nicht nur wegen der möglichen Bildung von Mykotoxinen gefürchtet. Zusätzliche Risiken gehen von *Fusarium*-Stoffwechselprodukten aus, die verantwortlich gemacht werden für das als ‚Gushing‘ bekannte Phänomen des unkontrollierten Überschäumens von Flaschenbieren. Zwar ist das Auftreten von Gushing nicht mit unmittelbaren gesundheitlichen Risiken verbunden, es stellt jedoch eine erhebliche Beeinträchtigung der Produktqualität dar. Verbraucher reagieren häufig mit Reklamationen und der Rückgabe der Produkte, Brauereien sind in ‚Gushing-Jahren‘ immer wieder zum Rückruf ganzer Produktionschargen gezwungen. Wirtschaftliche Schäden entstehen durch notwendige Veränderungen in der Produktion, zusätzlichen Aufwand in der Qualitätssicherung und vor allem durch aufwändige Rückrufaktionen. Neben den unmittelbaren wirtschaftlichen Schäden tritt dabei die mögliche Beschädigung der Marke durch das Auftreten von Gushing. Der durch Gushing hervorgerufene

wirtschaftliche Verlust ist nicht genau zu beziffern, da betroffene Brauereien über das wahre Ausmaß der Probleme nur selten Auskunft geben. Systematische Untersuchungen an Malzproben nach der Problemerknte 2007 haben gezeigt, dass etwa jede dritte kommerzielle Malzprobe ein hohes oder sehr hohes Gushing-Risiko aufwies. Diese Zahlen lassen den tatsächlichen Umfang der Schäden zumindest erahnen.

Die Produktions- und Qualitätsrisiken durch Fusarium-Infektionen sind in der Brau- und Malzindustrie deutlich prekärer als in anderen getreideverarbeitenden Industrien. Die besonderen Temperatur- und Feuchtigkeitsbedingungen während des Mälzungsprozesses bieten ideale Voraussetzungen für das erneute Wachstum latent vorhandener Fusarien (Wolf-Hall, 2007). In der Folge können auch Mykotoxine und Gushing auslösende Stoffwechselprodukte neu gebildet werden. Zur Abschätzung dieser Risiken stehen bis heute keine geeigneten Analysemethoden zur Verfügung, die einen latenten Fusariumbefall an der Gerste sicher nachweisen und vor allem eine verlässlich Aussage über das Risiko einer unerwünschten Vermehrung während der Vermälzung erlauben.

Die Entwicklung geeigneter Verfahren zur Vermeidung des Wachstums von Fusarium während der Vermälzung und der Neubildung schädlicher Stoffwechselprodukte würde deshalb gerade in kritischen Befallsjahren einen wichtigen Beitrag zur Verbesserung der Produktqualität und zur Vermeidung wirtschaftlicher Schäden leisten. Dies ist auch deshalb wichtig, weil es bislang weder durch züchterische Maßnahmen – resistente Gerstensorten – noch durch pflanzen-bauliche Maßnahmen gelungen ist, Fusarium-Infektionen auf dem Feld sicher zu vermeiden und eine Fusarium-freie Braugerste bereit zu stellen.

## GENTECHNISCH VERÄNDERTE PILZRESISTENTE GERSTE

Zurzeit wird unter anderem in einem BMBF Projekt an der Universität Gießen transgene Gerste auf ihre Pilzresistenz getestet. Durch das Einbringen von sogenannten Resistentgenen will man verhindern, dass die Gerste von filamentösen Pilzen infiziert werden kann. Bei dem eingebrachten „Resistenzgen“ handelt es sich in diesem Fall zum Beispiel um ein Enzym (Chitinase), das spezifisch die Zellwand filamentöser Pilze abbaut. Da dieses Enzym aber nur während des Wachstums der Pflanze exprimiert wird, ist es wahrscheinlich, dass es eine Sekundärinfektion nicht verhindern kann, weil es zum Beispiel nicht mehr aktiv ist und auch nicht ersichtlich ist, ob dieses „Resistenzgen“ auch in den Getreidekörner exprimiert wird. Damit scheint es nicht geeignet zu sein, den sekundären Befall bzw. das Wachstum von Schimmelpilzen während des Mälzungsprozesses nachhaltig zu verhindern. Ebenfalls ist der Einsatz von gentechnisch veränderter Gerste in Deutschland nicht konform mit dem deutschen Reinheitsgebot und stellt auch in anderen Ländern ein Akzeptanzproblem dar.

Bislang ist weltweit keine gentechnisch veränderte Gerste zum Anbau zugelassen. Die

Zahl der Freisetzen ist allerdings in den letzten Jahren deutlich gestiegen, dennoch ist ein kommerzieller Anbau von gentechnisch veränderter Gerste in der EU auf absehbare Zeit nicht zu erwarten.

#### VERWENDUNG VON MILCHSÄUREBAKTERIEN UND *GEOTRICHUM CANDIDUM* ALS BIOLOGISCHE SCHUTZORGANISMEN

Neben chemischen und physikalischen Methoden werden bereits biologische Verfahren verwendet, um das Schimmelwachstum und die Mykotoxinbildung auf der Gerste und während der Mälzung zu verhindern. Dabei kommen vor allem Milchsäurebakterien und die Hefe *Geotrichum candidum* zum Einsatz. Der Zusatz dieser Mikroorganismen während der Weiche hat sich zum Teil als effektiv erwiesen, den Gehalt an Fusarien und das Gushingpotential zu senken (Lowe and Arendt, 2004). Die Wirkungsweise der zugesetzten Kulturen beruht einerseits auf der Verdrängung der Schimmelpilze und andererseits auf der Bildung antimikrobiell wirkender Substanzen, wie Milchsäure, Essigsäure, Wasserstoffperoxid und der Bildung und Bacteriocinen und weiteren antifungal wirkenden Substanzen, die zum Teil noch nicht weiter untersucht worden sind (Lowe and Arendt, 2004). Berichte aus der Praxis zeigen allerdings, dass der Einsatz von *Geotrichum candidum* unter industriellen Mälzungsbedingungen zu stark variierenden Ergebnissen führt. Während bei einzelnen Produktionen eine sehr gute Wirksamkeit berichtet wurde, konnten in anderen Fällen keine Unterschiede in der Mykotoxinbildung oder beim Gushing-Risiko zwischen behandelten und unbehandelten Chargen festgestellt werden. Die Ursachen für diese stark schwankenden Resultate sind bislang nicht ausreichend untersucht.

#### DAS POTENTIAL DES ANTIFUNGAL-PROTEIN (AFP) AUS *A. GIGANTEUS* ALS BIOLOGISCHES ANTIMYKOTIKUM

AFP ist ein unter neutralen Bedingungen positiv geladenes Protein der Größe 5,8 kDa, bestehend aus einer Polypeptidkette von 51 Aminosäuren. Das Protein enthält insgesamt 8 Cysteinreste, die vier Disulfidbrücken ausbilden und dadurch die tertiäre Struktur des Proteins stabilisieren. Aufgrund dieser sehr kompakten Tertiärstruktur ist das Protein in einem pH-Bereich von pH 2 bis pH 9 sowie im Temperaturbereich von 0°C bis 80°C stabil und weist außerdem eine ausgeprägte Protease-Resistenz auf (Lacadena *et al.*, 1995).

Im erfolgreich durchgeführten AiF-Projekt 13305 N (Projektlaufzeit 1.10.2003 bis 30.09.2005) konnte bereits gezeigt werden, dass AFP spezies-spezifisch das Wachstum von Schimmelpilzen inhibiert (Tabelle ), während es keinen Einfluss auf das Wachstum von Bakterien, Hefen und Pflanzen ausübt. AFP zeigt ebenfalls keine cytotoxische Wirkung auf humane Zellen und ist darüber hinaus auch nicht immunogen (Szappanos *et al.*, 2006; Theis *et al.*, 2005). Innerhalb desselben Projekts konnte weiterhin gezeigt werden, dass die Wirkweise des AFP auf einen inhibitorischen Effekt

des Proteins auf pilz-spezifische Chitinsynthesen zurückzuführen ist (Hagen *et al.*, 2007; Theis *et al.*, 2003).

AFP konnte bereits für eine potentielle Anwendung in der Landwirtschaft erfolgreich getestet werden. So konnte der Befall von Nutzpflanzen wie Reis, Weizen, Tomate und Hirse durch phytopathogene Schimmelpilze erheblich reduziert oder sogar vollständig verhindert werden. Dies gelang durch eine externe Applizierung des AFP auf Pflanzenteile (Wurzel, Blatt) oder durch die Erstellung von transgenen (AFP-exprimierenden) Pflanzen (Girgi *et al.*, 2006; Moreno *et al.*, 2005; Oldach *et al.*, 2001; Theis *et al.*, 2005; Vila *et al.*, 2001).

Der Einsatz von isoliertem AFP aus *Aspergillus giganteus* im Vergleich zu dem Zusatz von Milchsäurebakterien oder Hefen als Starterkulturen hätte den entscheidenden Vorteil, dass eine definierte Komponente in definierter Konzentration zugegeben werden kann, die das Wachstum von Schimmelpilzen nachweislich hemmt (Tabelle A), ohne dass ein Gemisch von Metaboliten aus Bakterien und Hefen in den weiteren Produktionsverlauf / Bier gelangt. Da die Bioaktivität des AFP auf Schimmelpilze begrenzt ist und das Protein über eine sehr hohe Temperatur-, pH- und Protease-Stabilität verfügt (Lacadena *et al.*, 1995; Theis *et al.*, 2005), ist davon auszugehen, dass AFP über den gesamten Mälzungsprozess aktiv bleibt.

**Tabelle A: Wirkspektrum des AFP.** +: Wachstumsinhibierung durch AFP. -: kein Effekt von AFP. Konzentrationen von 0,1 – 10 µg/ml AFP sind in der Regel ausreichend, um ein Wachstum sensibler Organismen vollständig zu verhindern.

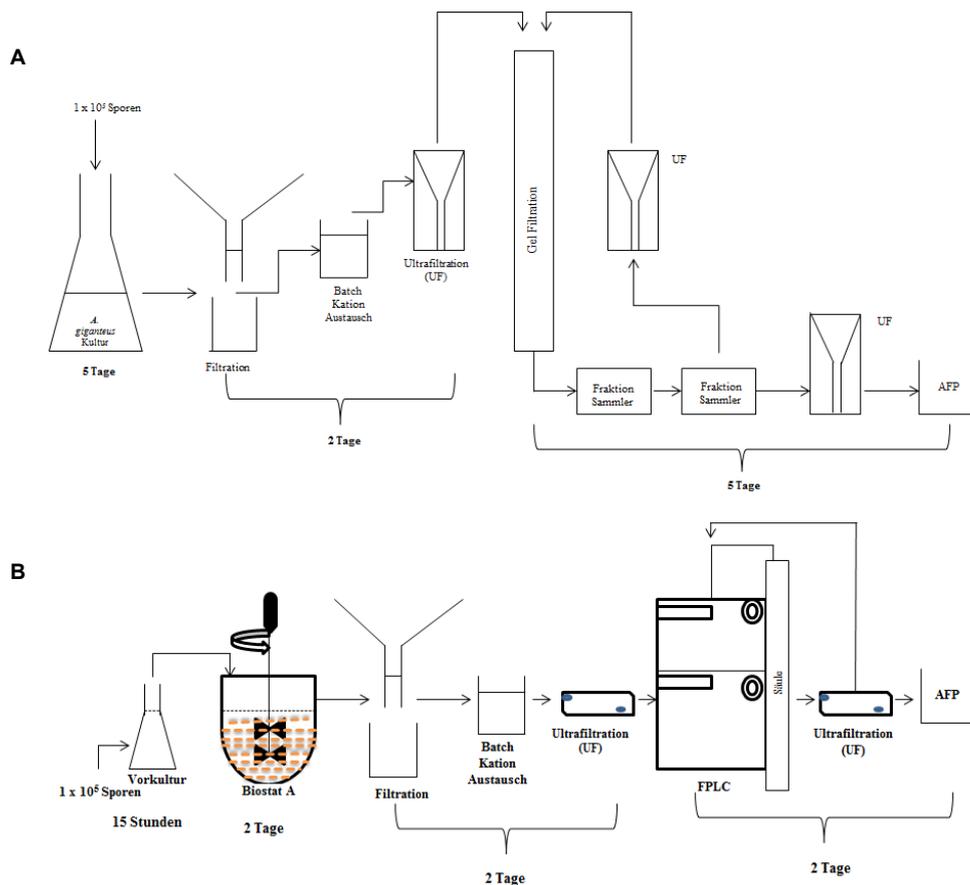
| Organismus                      | AFP<br>Sensitiv |
|---------------------------------|-----------------|
| <b>Schimmelpilze</b>            |                 |
| <i>Fusarium cerealis</i>        | +               |
| <i>F. equiseti</i>              | +               |
| <i>F. culmorum</i>              | +               |
| <i>F. sporotrichioides</i>      | +               |
| <i>F. acuminatum</i>            | +               |
| <i>F. avenaceum</i>             | +               |
| <i>F. tricinctum</i>            | +               |
| <i>F. poae</i>                  | +               |
| <i>F. graminearum</i>           | +               |
| <i>F. oxysporum</i>             | +               |
| <i>F. proliferatum</i>          | +               |
| <i>Aspergillus fumigatus</i>    | +               |
| <i>A. niger</i>                 | +               |
| <i>A. penicilloides</i>         | +               |
| <i>Penicillium chrysogenum</i>  | +               |
| <i>P. purpurogenum</i>          | +               |
| <i>Trichoderma koningii</i>     | +               |
| <i>Cladosporium herbarum</i>    | +               |
| <i>C. cladosporioides</i>       | +               |
| <b>Hefen</b>                    |                 |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | -               |
| <i>Pichia pastoris</i>          | -               |
| <b>Bakterien</b>                |                 |
| <i>Bacillus megaterium</i>      | -               |
| <i>Proteus vulgaris</i>         | -               |
| <i>Escherichia coli</i>         | -               |
| <b>Pflanzen</b>                 |                 |
| Reis, Weizen, Tomate, Hirse     | -               |
| <b>Säuger</b>                   |                 |
| Neuronen, Epithelzellen         | -               |

## 2. DARSTELLUNG DER ERZIELTEN FORSCHUNGSERGEBNISSE

### AFP-GEWINNUNG IM LABORMAßSTAB

Für die Gewinnung von AFP wurde *Aspergillus giganteus* im 2 l Erlenmeyerkolben kultiviert. Aus dem filtrierten Medium wurde mittels Ionenaustausch und Gelfiltration AFP gereinigt. In dieser Projektphase wurde erstmals ein synthetisches Minimalmedium (SMM) getestet durch dessen Verwendung die Medienkosten um bis zu 80 % reduziert werden konnten. Standardmedium für die AFP-Produktion waren bisher das Olson-Medium bzw. YPG-Medium mit Anschaffungskosten von ca. 6,7 Euro/l bzw. 2,4 Euro/l. Bei Verwendung des SMM ergeben sich verminderte Kosten von nur noch 1,3 Euro/l.

Durch die Verwendung von SMM im Labormaßstab konnte die AFP-Ausbeute bereits auf bis zu 30 mg/l gesteigert werden.



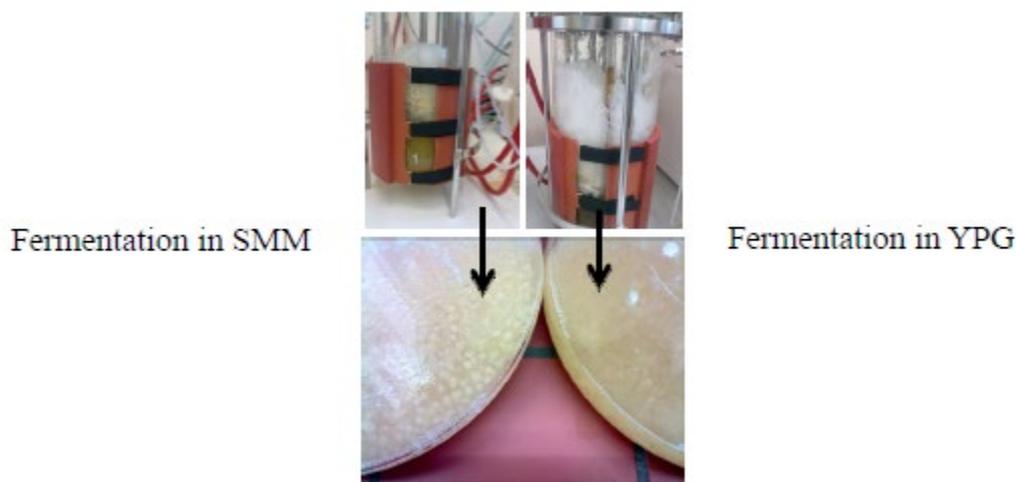
**Abbildung 1:** Schema der AFP-Produktion. **A** Labormaßstab. **B** Fermentation im Biostat und FPLC.

## SCALE UP DER AFP-GEWINNUNG

Um eine große Menge AFP für eine technologische Nutzung bereitzustellen, wurde *A. giganteus* im 5l-Fermenter kultiviert. Die zuvor im Labormaßstab optimierten Bedingungen wurden übernommen. Die Fermentation erfolgte im Biostat A mit SMM bei pH 8 und 37°C über 24h (Vorkultur: Animpfen mit  $1 \times 10^5$  Sporen in 200 ml für 15h, 28°C). Zum Vergleich wurde eine Fermentation mit YPG-Medium durchgeführt.

Das Myzelium von jeweils 2 l *A. giganteus*-Fermentationsbrühe wurde durch Filtration geerntet und AFP nach dem in Abbildung 1B dargestellten Schema aufgereinigt. Die Gelfiltrationsschritte wurden mittels FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography) durchgeführt. Im Vergleich zum bisherigen Reinigungsverlauf im Labormaßstab (Abbildung 1A) konnte der Zeitaufwand deutlich von 12 d auf 7 d verringert werden.

Während der Fermentation wurden morphologische Veränderungen von *A. giganteus* beobachtet. Bei Fermentation mit SSM bildete das Myzel kleine Kugeln mit ca. 0,5 mm Durchmesser (Abbildung 2). Diese morphologische Veränderung könnte die AFP-Sekretion beeinflussen. Eine Bestimmung des Trockengewichts (TS) des Myzeliums ergab für YPG-Medium 3,25 g/l und damit ca. das Doppelte an TS wie bei der Kultivierung im SSM. Es ist denkbar, dass *A. giganteus* bei Kultivierung auf YPG-Medium Nährstoffe hauptsächlich zur Bildung von Biomasse nutzt, während bei der Kultivierung auf SSM weniger Biomasse aber mehr Sekundärmetabolite wie AFP produziert werden.

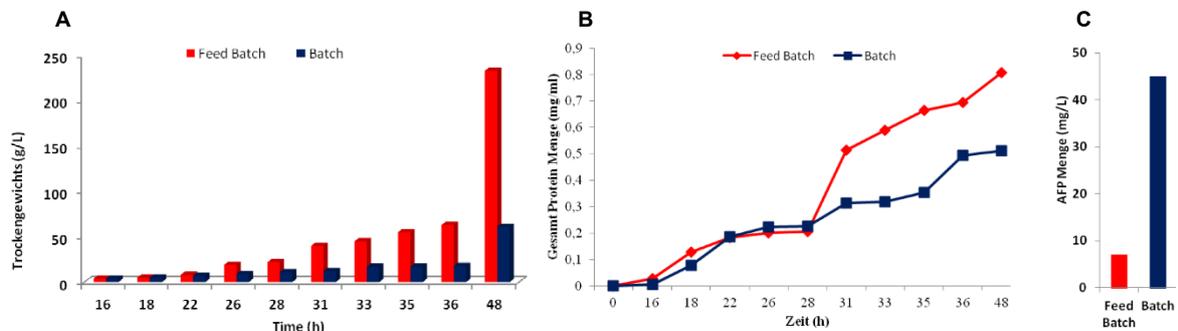


**Abbildung 2:** Morphologie des Myzeliums von *A. giganteus* nach Fermentation in SMM und YPG-Medium

Durch Anzucht von *A. giganteus* in 5l-Fermentern mittels eines Batch-Fermentationsprozesses konnte die AFP-Ausbeute im Vergleich zur Herstellung im Labormaßstab erhöht werden. Als alternative Fermentationsmethode wurde ein Feed Batch-Verfahren getestet. Es wurde angenommen, dass eine Erhöhung der Biomasse-Produktion bei Verwendung des Feed Batch-Fermentationsprozesses die AFP-

Sekretion verbessern könnte. Um dies näher zu untersuchen, wurde der zuvor etablierte Batch- mit einem Feed Batch-Fermentationsprozess verglichen. Die Zuführung der Feed Batch wurde nach 24 h mit Glucose (250 g/L) bei einer Flussrate von 5 ml/h gestartet. Die anderen Bedingungen entsprachen denen des Batch-Fermentationsprozesses.

Parameter wie das Trockengewicht (Abbildung 3A) oder der Gesamtproteingehalt (Abbildung 3B) wurden zu verschiedenen Zeitpunkten analysiert und die zwei Fermentationsprozesse anhand der generierten Ergebnisse miteinander verglichen. Idealerweise sollte auch der AFP-Gehalt während der Fermentation gemessen werden. Da jedoch keine schnelle und empfindliche Methode zur AFP-Bestimmung während des Fermentationsprozesses zur Verfügung stand, wurde nur der gesamte Proteingehalt gemessen. Erst nach Durchführung aller Reinigungsschritte wurde der AFP-Gehalt bestimmt (Abbildung 3C).



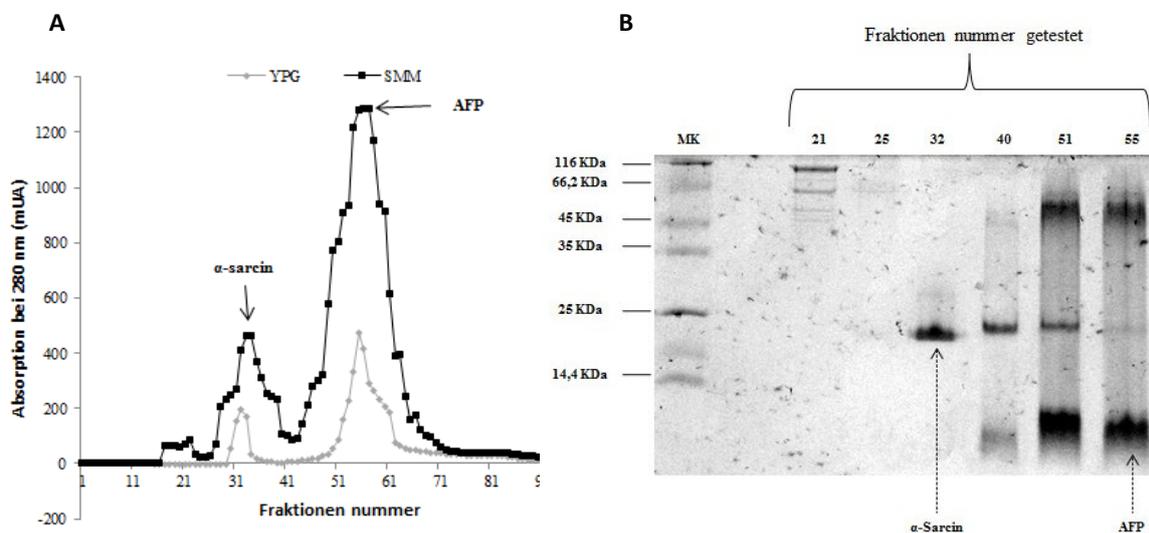
**Abbildung 3:** Vergleich der Kultivierungen von *A. giganteus* im Feed Batch und Batch Fermentationsprozess. **A** Trockengewicht. **B** Gesamtproteinkonzentration (Bradford-Assay). **C** AFP-Ausbeute nach Reinigung mittels FPLC

Die Ergebnisse zeigen, dass im Feed Batch-Verfahren höhere Trockensubstanz- und Gesamtproteinmengen produziert wurden als im Batch-Verfahren. Dahingegen war die gewonnene AFP-Menge im Batch-Fermentationsprozess deutlich höher als im Feed Batch-Verfahren, sodass das Batch-Verfahren hinsichtlich einer wirtschaftlichen AFP-Produktion zu bevorzugen ist.

## OPTIMIERUNG DES AUFREINIGUNGSPROZESSES

Nach Filtration des Myzeliums wurde eine Kationenaustauschchromatographie im Batch-Verfahren durchgeführt. Das verwendete Phasenmaterial Cellulosephosphat ist ein starker Kationenaustauscher mit hoher Kapazität. Nach einer Kontaktzeit von einer Stunde wurde das Gesamtprotein mit TE-Puffer (pH 7; 1,5 M NaCl) eluiert. Im Eluat wurde die Proteinkonzentration mittels Bradford Assay gemessen. Nach dem ersten Reinigungsschritt konnten bei Verwendung von SMM 124,5 mg/l und mit YPG-Medium nur 30 mg/l Gesamtprotein gewonnen werden.

Das bei der Ionenaustauschchromatographie eluierte Proteinextrakt enthielt  $\alpha$ -Sarcin ( $M_w$  17 kDa) und AFP ( $M_w$  5,8 kDa). Um die beiden Proteine zu trennen, wurde eine Gelfiltration der mittels Ultrafiltration aufkonzentrierten Proteineluats durchgeführt. In ersten Versuchen wurde dazu eine selbst gepackte Säule mit Sephadex G-50-Material verwendet. Dabei handelt es sich um ein Phasenmaterial auf Dextranbasis mit einem Trennbereich von 1,5 bis 30 kDa. In Abbildung 4A sind die Chromatogramme der Gelfiltration von Proteinextrakten aus der Kultivierung mit SMM bzw. YPG-Medium dargestellt. Je Chromatographielauf wurden 10 ml des Ultrafiltrats aufgetragen. Anhand der Peakgrößen konnte das Ergebnis bestätigt werden, dass die AFP-Ausbeute nach SMM-Fermentation deutlich höher ist als nach Fermentation mit YPG-Medium. Abbildung 4B zeigt mittels SDS-PAGE analysierte Fraktionen der Gelfiltration nach Fermentation in SMM.



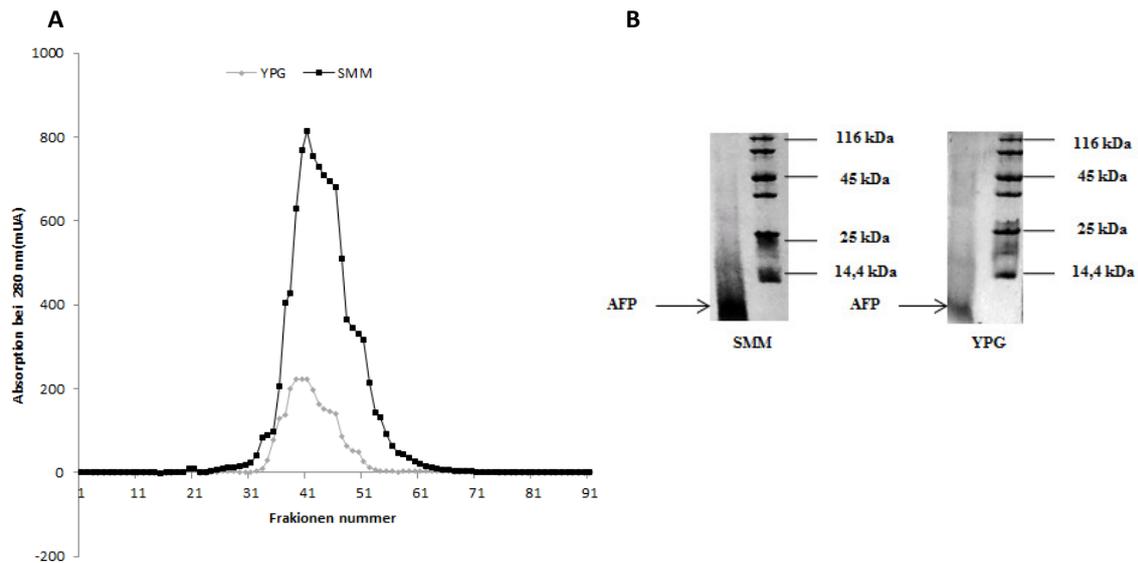
**Abbildung 4:** Gelfiltration 1 (Sephadex, 350 ml Säulenvolumen, je 10 ml Probenvolumen) von Proteinextrakten nach *A. giganteus* Kultivierung in SMM bzw. YPG-Medium. **A** Gelfiltrationschromatogramm. **B** SDS PAGE der Gelfiltrationsfraktionen nach SMM-Kultivierung

Das 17 kDa große  $\alpha$ -Sarcin wurde in den Fraktionen 32 bis 40 nachgewiesen. AFP war in der Fraktion 55 enthalten. In der Fraktion 51 lagen beide Proteine vor. Außerdem war in den Fraktionen 51 und 55 eine zusätzliche Bande von ca. 50 kDa zu erkennen. Unklar ist, um welches Protein es sich dabei handelt bzw. ob ein Proteinkomplex von  $\alpha$ -Sarcin und AFP aufgrund unvollständiger Reduktion der analysierten Proben vorliegt.

Um auch geringe Konzentrationen an  $\alpha$ -Sarcin aus den AFP-haltigen Fraktionen zu eliminieren, wurden die beide Proteine enthaltenden Fraktionen (Fraktionen 55-70) vereinigt, mittels Ultrafiltration aufkonzentriert und eine zweite Gelfiltration mit Sephadex G-50 durchgeführt. Abbildung 5A zeigt ein Chromatogramm der zweiten

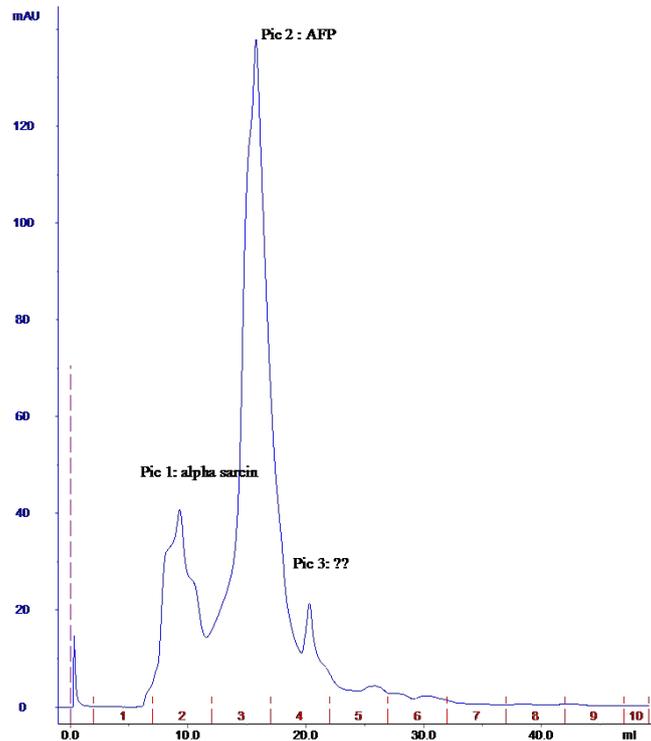
Gelfiltration. Darin zu erkennen ist nur ein Peak für AFP. Die AFP-haltigen Fraktionen 35-60 wurden gesammelt, vereinigt und mittels SDS PAGE analysiert (Abbildung 5B).  $\alpha$ -Sarcin sowie die unbekannte, ca. 50 kDa große Verunreinigung konnten durch den zweiten Gelfiltrationsschritt erfolgreich abgetrennt werden, sodass nur noch AFP in den gesammelten Fraktionen vorlag.

Eine Bestimmung der AFP-Ausbeute nach Kultivierung in SMM bzw. YPG-Medium und Aufreinigung mittels Kationenaustauschchromatographie und zweifacher Gelfiltration ergab 48 mg AFP/l SMM bzw. 17 mg AFP/l YPG-Medium.



**Abbildung 5:** Gelfiltration 2 (Sephadex, 350 ml Säulenvolumen, je 10 ml Probenvolumen) von Proteinextrakten nach A. *giganteus* Kultivierung in SMM bzw. YPG-Medium. **A** Gelfiltrationschromatogramm. **B** SDS PAGE der Fraktionen 35-60

Um eine mögliche Vereinfachung und Beschleunigung des Aufreinigungsverfahrens zu untersuchen, wurden auch Versuche mit Hochleistungs-Gelfiltrationssäulen, die schon betriebsbereit erhältlich sind, durchgeführt. Der Trennbereich des verwendeten Phasenmaterials Superdex 75 HR liegt bei 3 bis 600 kDa. Das in Abbildung 6 dargestellte Chromatogramm zeigt, dass auch Superdex 75 HR Säulen zur Aufreinigung von AFP geeignet sind. Weiterführende Versuche, insbesondere zur Auswahl eines geeigneten Elutionspuffers, könnten die Notwendigkeit eines zweiten Gelfiltrationsschritts eliminieren und dadurch das Aufreinigungsverfahren deutlich beschleunigen.



**Abbildung 6:** Gelfiltrationschromatogramm (Superdex 75 HR, 24 ml Säulenvolumen, je 2 ml Probenvolumen).

Während der AFP-Aufreinigung stellt die Ultrafiltration der Proteinextrakte vor der Trennung mittels Gelfiltration einen stark zeitlimitierenden Faktor dar, der mehrere Tage dauern kann. Um diese Zeit zu reduzieren, wurde das Ultrafiltrationssystem Vivaflow 200 der Fa. Sartorius Stedim GmbH getestet. Die aktive Membranfläche der eingesetzten Polyethersulfonmembran beträgt 200 cm<sup>2</sup>. Mit dieser Membran konnten bei einer Pumpenleistung von 300 ml/min 2 Liter Proteinlösung in 1 Stunde auf 20 ml konzentriert werden und somit der Aufreinigungsprozess deutlich verkürzt werden.

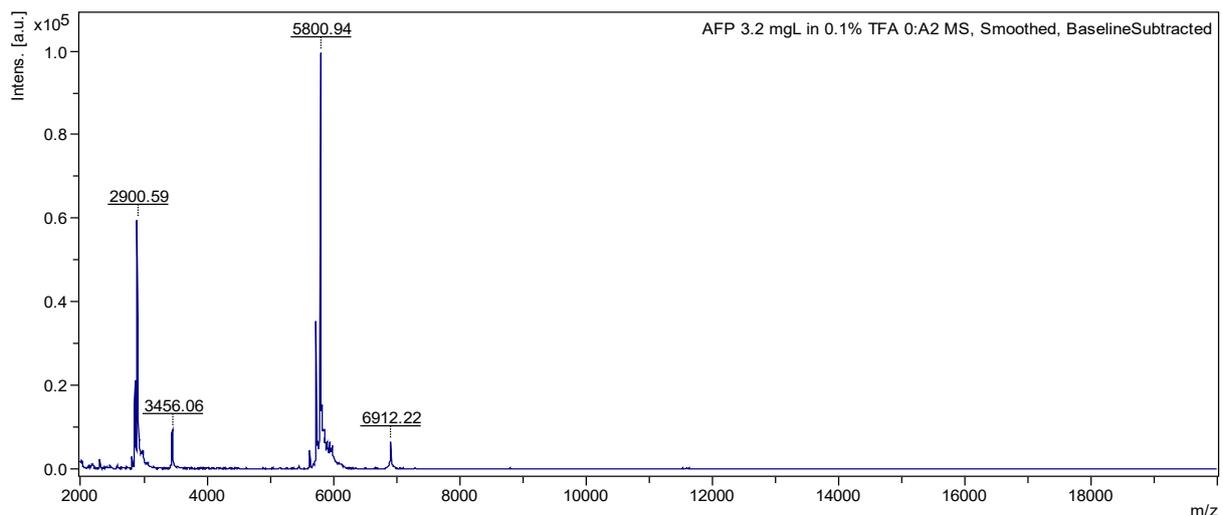
#### BESTIMMUNG DER MOLEKÜLMASSE UND REINHEIT VON AFP MITTELS MALDI-TOF MS

Die Matrix-unterstützte Laserdesorptions-/Ionisations-Flugzeit-Massenspektrometrie (MALDI TOF MS) dient der Massenanalyse chemischer Verbindungen. Die Methode basiert auf einer schonenden Erzeugung gasförmiger, meist einfach geladener Ionen im Hochvakuum und der anschließenden Auftrennung der geladenen Teilchen entsprechend ihrer Flugzeit. Dabei fliegen schwere Ionen langsamer als leichtere und erreichen daher den Detektor später, sodass ein Rückschluss auf die Molekülgröße einer Verbindung möglich ist. Da beim Ionisationsvorgang kaum Fragmentierungen auftreten, ermöglicht die MALDI-TOF MS die massenspektrometrische Untersuchung großer, thermisch labiler Moleküle und wird häufig zur Charakterisierung von Biopolymeren, insbesondere Proteinen, eingesetzt. Am Forschungsinstitut für

Rohstoffe steht für MALDI-TOF MS Analysen ein Autoflex Speed der Fa. Bruker Daltonics zur Verfügung, welches mit einem leistungsstarken modifizierten Nd:YAG Laser (smartbeam<sup>TM</sup>-II) ausgestattet ist.

Zur Überprüfung der Reinheit der Stammlösungen sowie zur Ermittlung der genauen Molekülmasse des aufgereinigten Proteins wurden die AFP-Stammlösungen in Aqua bidest. mit 0,1% Trifluoressigsäure (TFA) verdünnt und mittels MALDI-TOF MS analysiert. Die Matrixsubstanzen 2,5-Dihydroxyacetophenon (2,5-DHAP),  $\alpha$ -Cyano-4-hydroxymizsäure (HCCA), 2,5-Dihydroxybenzoesäure (2,5-DHB) sowie Sinapinsäure (SA) finden häufig Einsatz im Bereich der Proteinanalytik und wurden hinsichtlich ihrer Eignung zur Messung von AFP überprüft. Bei Verwendung von 2,5-DHB und SA konnten keine Massen detektiert werden. 2,5-DHAP lieferte sehr reine Spektren mit einem gut aufgelösten AFP-Basispeak, während bei der Messung mit HCCA neben dem Basispeak zum Teil weitere Peaks mit schwachen Intensitäten im höheren Massenbereich detektiert wurden, die aufgrund der bestimmten Masse-Ladungs-Verhältnisse ( $m/z$ ) vermutlich Moleküladdukten von AFP zuzuordnen sind. Da die Massenspektren der Auftragungen mit HCCA jedoch deutlich höhere Intensitäten aufwiesen als die mit 2,5-DHAP, wurde diese Matrixsubstanz für weitere MALDI-TOF Messungen von AFP verwendet.

Abbildung 7 zeigt ein aus 15 000 Shots aufsummiertes Massenspektrum einer verdünnten AFP-Lösung ( $c = 3,2$  mg/L) unter Verwendung der Matrix HCCA. Die Messung erfolgte im positiven Linear-Modus im Massenbereich von 2-20 kDa nach Auftragung der Proben-Matrix-Mischung auf ein MTP 384 Ground Steel Target. Der Basispeak mit einem  $m/z$  von 5800,9 kann dem Molekülion  $[M+H]^+$  von AFP zugeordnet werden. Der bei  $m/z$  2900,5 detektierte Peak entspricht vermutlich dem



**Abbildung 7:** MALDI-TOF Massenspektrum einer verdünnten AFP-Lösung (Matrix: HCCA, 10 mg/mL in ACN/H<sub>2</sub>O/TFA (50/50/0,1, v/v/v))

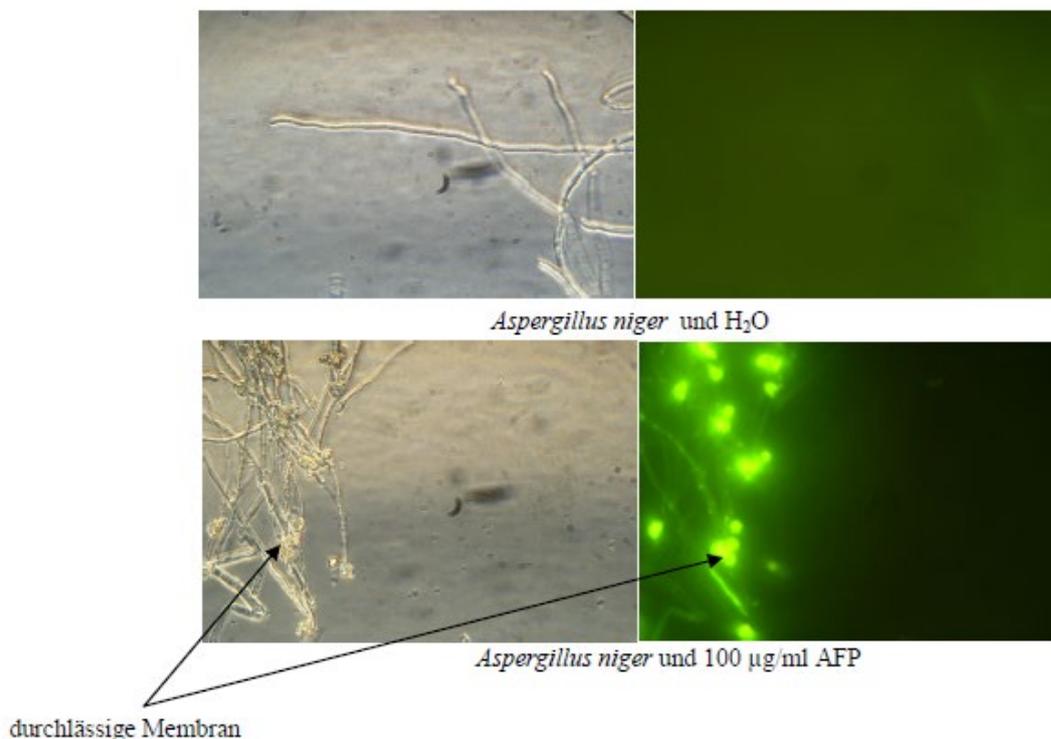
zweifach positiv geladenen AFP-Ion  $[M+2H]^{2+}$ . Bei den Peaks mit  $m/z$  6912,2 bzw. 3456,1 handelt es sich eventuell um das einfach bzw. zweifach positiv geladene Ion eines AFP-Addukts.

Die untersuchten AFP-Stammlösungen wiesen im erfassten Massenbereich eine hohe Reinheit auf und zeigten auch drei Monate nach Anbruch der Lösungen noch keine Anzeichen für eine Zersetzung des Proteins.

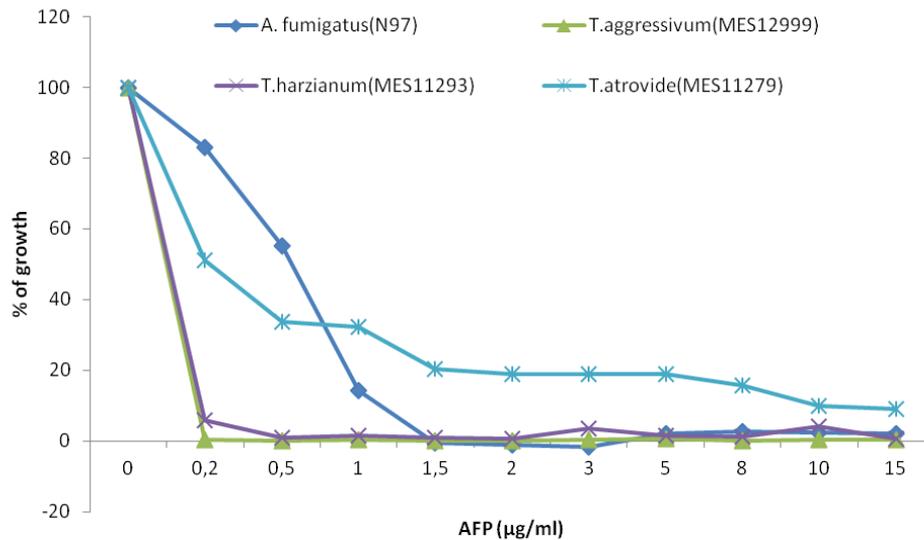
### AFP-Wirksamkeitstest

Die Wirksamkeit des nach Fermentation im Fermenter gewonnenen und mittels FPLC gereinigten AFPs wurde mit Hilfe eines anderen Vertreters der Aspergillen, *Aspergillus niger*, getestet. *A. niger* gehört zur Gruppe der AFP-sensitiven Pilze, bei denen die Behandlung mit AFP zu einer Permeabilisierung der Zellmembran und infolgedessen zum Zelltod führt.

Eine Schädigung der Zellmembran kann mittels SYTOX-Green-Assay überprüft werden. Dieses Assay basiert auf der Diffusion des Fluoreszenzfarbstoffs SYTOX-Green durch die permeabilisierte Zellmembran und eine nachfolgende Bindung an.



**Abbildung 8:** Membranpermeabilitätstest. *A. niger* wurde mit Wasser (als Kontrolle) bzw. 100 µg/ml AFP und jeweils 0,2 µM SYTOX-Green behandelt. Nach 2 Stunden Inkubation wurde die Membranpermeabilität der Zellen im Fluoreszenzmikroskop überprüft. (links Fluoreszenzmikroskopie; rechts Lichtmikroskopie)



**Abbildung 9:** AFP Wirksamkeitstest. *A. fumigatus* und *Trichoderma spp.* wurden mit verschiedenen Konzentrationen von AFP (0-15 µg/mL) behandelt.

DNA. Die Fluoreszenz von SYTOX-Green tritt erst nach einer Bindung an DNA auf, sodass eine Zerstörung der Zellmembran durch Auftreten von Fluoreszenz am Fluoreszenzmikroskop nachgewiesen werden kann. Die licht- bzw. fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen in Abbildung 8 zeigen erst nach AFP-Behandlung eine Fluoreszenz, d.h. die Zellmembran von *A. niger* wird durch AFP-Behandlung zerstört

Um das Wirkungsspektrum von AFP zu ermitteln, wurde auch die AFP-Sensitivität anderer filamentöser Pilze getestet. Dazu zählten unter anderem *Aspergillus fumigatus* sowie verschiedene *Trichoderma*-Stämme, die ubiquitär verbreitet sind und zum Teil bereits mit dem Auftreten von Gushing in Verbindung gebracht wurden. Abbildung 9 zeigt, dass AFP auch *Aspergillus fumigatus* und verschiedene *Trichoderma* Stämme hemmen kann. Diese Ergebnisse machen deutlich, dass das aufgereinigte AFP eine Wirksamkeit gegenüber einem breiten Spektrum an Pilzarten aufweist.

#### AFP-SENSITIVITÄTSTEST GETREIDESPEZIFISCHER PILZE

Der AFP-Sensitivitätstest beruht auf der Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MIC) von AFP auf getreiderelevante Pilze mittels eines etablierten Wachstumstests im Mikrotiterplatten-Maßstab. Dabei werden die zu untersuchenden Pilze aus einer Sporensuspension in Mikrotiterplatten angeimpft, mit der entsprechenden Menge AFP versetzt und auf dem Schüttler bei 28°C inkubiert. Das Wachstum wird über die optische Dichte der submers wachsenden Pilzkultur ermittelt, wobei eine Wachstumsinhibierung bzw. -verzögerung leicht festgestellt werden kann. Dieser Test eignet sich besonders gut für *Aspergillen*, die schnell und gut in Submerskultur wachsen. Im Rahmen dieses Projektes wurde der Test auf v

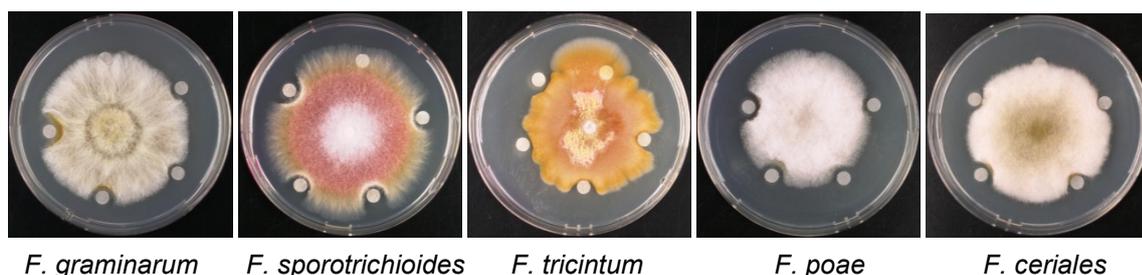
**Tabelle 1:** Bestimmung der MIC Werte verschiedener Fusarienarten

|                            |    |
|----------------------------|----|
| <i>F. graminearum</i>      | 2  |
| <i>F. acuminatum</i>       | 2  |
| <i>F. tricinctum</i>       | 1  |
| <i>F. sporotrichioides</i> | 1  |
| <i>F. crookwellense</i>    | 1  |
| <i>F. avenaceum</i>        | 2  |
| <i>F. poae</i>             | 15 |
| <i>F. equiestri</i>        | 5  |
| <i>F. oxysporum</i>        | 1  |

erschiedene Fusarienarten ausgedehnt. Wie aus Tabelle 1 hervorgeht, werden Fusarien bereits durch sehr geringe Mengen an AFP gehemmt und ordnen sich in die Gruppe der AFP-sensitiven Organismen ein.

Weiterhin wurde die Hemmwirkung auf festen Medien getestet. Hierzu wurde ein Agardiffusionstest eingesetzt. AFP kann dabei aus einem Papierplättchen in das Medium diffundieren. Die Konzentration des AFPs nimmt in den aufgelegten Papierplättchen radial ab. Aus Abbildung 10 wird durch die Ausbildung von Hemmhöfen ersichtlich, dass AFP eine Hemmwirkung besitzt, wogegen die mit Wasser getränkten Kontroll-Plättchen (oben) vollständig überwachsen werden.

Aufgrund dieser Werte wurde eine Konzentration festgelegt, die während der Vermälzungsversuche eingesetzt wird. Unter Berücksichtigung der Oberfläche, des Gewichts von Gerstenkörnern und eines Sicherheitsfaktors wurde eine Einsatzkonzentration von 16 µg AFP/g Gerste (Trockengewicht) ausgewählt. Mit dieser Konzentration soll in den Vermälzungsversuchen mit AFP gearbeitet werden.



**Abbildung 10:** Agardiffusionstest zur Bestimmung der Wachstumshemmung durch verschiedene AFP Konzentrationen. *Fusarium spp.* wurden auf Kartoffel-Dextrose-Agar kultiviert und Papierplättchen mit H<sub>2</sub>O (oben), 500, 250, 125 und 80 µg AFP/ml getränkt (gegen den Uhrzeigersinn).

## EINFLUSS AUF DIE MALZQUALITÄT UND WÜRZEQUALITÄT

Der beabsichtigte Einsatz von AFP im Mälzungsprozess zur Unterdrückung des Wachstums filamentöser Pilze setzt unabdingbar voraus, dass weder für den

Verarbeitungsprozess selbst noch für die Qualität der daraus resultierenden Produkte gravierende Nachteile zu erwarten sind. Um mögliche Einflüsse näher zu untersuchen, wurden entsprechende Mälzungsversuche durchgeführt und die hergestellten Malze analysiert. Die Ergebnisse dieser Malz- und Würzeanalysen sind in Tabelle 2 zusammengestellt.

Die Extraktausbeute, einer der wirtschaftlich besonders relevanten Parameter, wurde durch die AFP-Behandlung in keiner Weise beeinflusst. Bei anderen wichtigen Malz- bzw. Würzeigenschaften wurden dagegen signifikante Unterschiede zwischen unbehandelten und behandelten Proben beobachtet. Im Bereich der cytolytischen Lösung deuten eine geringfügige Verschlechterung des Friabilimeterwertes sowie ein deutlicher Anstieg des Glucangehaltes und eine entsprechende Zunahme der Viskosität der Würze auf eine mögliche Beeinträchtigung der Zellwandlösung der AFP-behandelten Malze hin.

Vergleichbare Auswirkungen deuten sich auch bei der proteolytischen Lösung an. Die durch enzymatische Abbauprozesse gebildete Menge an löslichen Stickstoffverbindungen und Aminosäuren (FAN) ist bei den behandelten Varianten signifikant geringer als bei den unbehandelten Kontrollen. Im Gegensatz dazu zeigen sich die Vergärungseigenschaften der AFP-behandelten Varianten gegenüber den Vergleichsmalzen verbessert.

**Tabelle 2:** Malz- und Würzeigenschaften von AFP-behandelten Gerstenproben nach der Vermälzung im Pilotmaßstab mit einer Weich-Keim-Zeit von 7 Tagen bei 15° C (Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung).

|  | – AFP Malz        | +AFP Malz          |
|--|-------------------|--------------------|
| <b>Malzeigenschaften</b>                   |                   |                    |
| – % Wassergehalt                           | 4.6 $\pm$ 0.08    | 4.6 $\pm$ 0.07     |
| – % Extrakt (TM)                           | 82.5 $\pm$ 0.58   | 82.5 $\pm$ 0.50    |
| – % Eiweiß (TM)                            | 10.6 $\pm$ 0.17   | 10.7 $\pm$ 0.07    |
| – % Friabilimeter                          | 79 $\pm$ 1.15     | 77 $\pm$ 1.20      |
| – $\alpha$ -Amylase CUg <sup>-1</sup> (TM) | 315.80 $\pm$ 6.95 | 320.25 $\pm$ 18.92 |
| – Gushing Potenzial g                      | negativ           | negativ            |
| <b>Würzeigenschaften</b>                   |                   |                    |
| – Löslicher Stickstoff mg/100g TM          | 787 $\pm$ 6.93    | 752 $\pm$ 4.73     |
| – % Kolbachzahl                            | 46.6 $\pm$ 0.36   | 44.0 $\pm$ 0.35    |
| – Viskosität (8,6%), mPa*s                 | 1.57 $\pm$ 0.03   | 1.65 $\pm$ 0.02    |
| – % Endvergärung                           | 78.3 $\pm$ 0.35   | 82.6 $\pm$ 0.17    |
| – Würze pH                                 | 6.05 $\pm$ 0.03   | 6.07 $\pm$ 0.03    |
| – $\beta$ -Glucangehalt mg/l               | 363 $\pm$ 4.04    | 441 $\pm$ 6.08     |
| – FAN, mg/l                                | 199 $\pm$ 4.62    | 189 $\pm$ 5.77     |
| – Würzefarbe, EBC                          | 6.2 $\pm$ 0.12    | 3.7 $\pm$ 0.25     |

In einer erneuten Pilotmälzung mit neuem Gerstenmaterial konnte allein die Erhöhung des Glucangehaltes bestätigt werden. Die übrigen analysierten Malz- und Würzeparameter wie Extraktausbeute, Viskosität, Endvergärung oder FAN zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen behandelten und unbehandelten Malzen, sodass ein negativer Einfluss einer AFP-Behandlung auf Verarbeitungs- und Qualitätseigenschaften der Malze ausgeschlossen wird.

#### ETABLIERUNG EINES PCR-GESTÜTZTEN NACHWEISVERFAHRENS GUSHING-RELEVANTER PILZSPEZIES

Die Etablierung eines PCR gestützten Nachweisverfahrens setzt ein reproduzierbares Verfahren für die DNA-Extraktion voraus. In den laufenden Versuchen wurde zu diesem Zweck das Maxwell® System der Fa. Promega erfolgreich eingesetzt. Es wurde eine Methode weiterentwickelt, mit der es möglich ist qualitativ gleichwertige DNA-Extraktionen aus Gerste- und Malzproben sowie anderen schwierigen Matrices zu erzeugen. Dem System liegt das Prinzip zugrunde, dass an paramagnetische Zellulose-Partikel (sogenannte magnetic beads) wesentlich mehr Nukleinsäuren (DNA) binden können als an herkömmliche andere Trägermaterialien. Das Maxwell® Gerät stellt ein geschlossenes System dar, in dem das Lyse-Reagenz, die paramagnetischen Partikel, die Waschpuffer sowie der Elutionspuffer in Kartuschen vorgelegt sind. Der eigentliche Aufschluss erfolgt automatisch und ist in 45 Minuten abgeschlossen. Für den PCR-Nachweis der Pilzspezies auf dem Untersuchungsmaterial Gerste und den dazugehörigen Malzen wurde eine definierte Menge an Körnern vermahlen und anschließend jeweils aus 100 mg Mehl DNA extrahiert. Die Nukleinsäuren wurden in 300 µl Puffer eluiert, wovon jeweils 2 µl für die quantitative Real-Time-PCR eingesetzt wurden.

#### AFP-WIRKSAMKEITSTEST WÄHREND DES MÄLZUNGSVORGANGS

In Vorversuchen (s.o.) konnte mit Hilfe des Agardiffusionstests bestätigt werden, dass unterschiedliche AFP-Konzentrationen zu Wachstumshemmungen von *Fusarium spp.* führen. Anhand der Ergebnisse wurde eine Einsatzkonzentration von 16 µg/g Gerste (Trockengewicht) festgelegt, die für den AFP-Wirksamkeitstest im Mälzungsprozess eingesetzt werden soll. Auf Grundlage dessen wurde ein groß angelegter Kleinmälzungsversuch durchgeführt. Die eingesetzten Gerstenproben wurden vorhergehend auf ihren *Fusarium spp.* Befall untersucht. Es wurden natürlich belastete Proben aus verschiedenen europäischen Anbaugebieten eingesetzt, wobei die Auswahl in einem ersten Schritt anhand einer optischen Bonitierung erfolgte. Um den Befall genauer kategorisieren zu können, wurden quantitative PCR Analysen mit dem Lightcycler der Fa. Roche durchgeführt. Anhand der gewonnenen Daten wurden Proben mit unterschiedlichen Befallsintensitäten für die verschiedenen Pilzspezies eingesetzt. Auch künstlich infizierte Proben aus dem Jahr 2011 wurden für den Test ausgewählt, wobei die PCR-Untersuchungen wie im Jahr 2010 keine vollständigen

**Tabelle 3:** DNA-Mengen (ng) diverser künstlich inokulierter *Fusarium* spp. an Gerstenproben der Sorte Quench

| Behandlung                 | [ng DNA]                   |                |                    |                     |                       |                      |                       |                      |                    |                            |
|----------------------------|----------------------------|----------------|--------------------|---------------------|-----------------------|----------------------|-----------------------|----------------------|--------------------|----------------------------|
|                            | <i>F. sporotrichioides</i> | <i>F. poae</i> | <i>F. cerealis</i> | <i>F. avenaceum</i> | <i>F. graminearum</i> | <i>F. acuminatum</i> | <i>F. langsethiae</i> | <i>F. tricinctum</i> | <i>F. culmorum</i> | <i>Microdochium nivale</i> |
| <i>F. avenaceum</i>        | 0                          | 0              | 0                  | 2,1                 | 0                     | 2,1                  | 0                     | 0,7                  | 1,1                | 0                          |
| <i>F. culmorum</i>         | 0                          | 0              | 0                  | 0                   | 0                     | 0                    | 0                     | 1,2                  | 85,4               | 0                          |
| <i>F. graminearum</i>      | 0                          | 0              | 0                  | 0,5                 | 0                     | 0,5                  | 0                     | 4,5                  | 196,3              | 0                          |
| <i>F. langsethiae</i>      | 0                          | 0              | 0                  | 0                   | 0                     | 0                    | 0                     | 0,6                  | 0,6                | 0                          |
| <i>F. poae</i>             | 0                          | 0,2            | 0,2                | 0                   | 0                     | 0                    | 0                     | 1,2                  | 1,2                | 0                          |
| <i>F. sporotrichioides</i> | 0                          | 0              | 0,2                | 0                   | 0                     | 0,1                  | 0                     | 3,0                  | 0,5                | 0                          |
| <i>F. tricinctum</i>       | 0                          | 0              | 0                  | 0                   | 0                     | 0                    | 0                     | 1,9                  | 1,5                | 0,5                        |
| <i>M. nivale</i>           | 0                          | 0              | 0                  | 0                   | 0                     | 0,2                  | 0                     | 6,5                  | 0,6                | 0                          |

Reininfektionen der inokulierten *Fusarium* spp. auf der Gerste zeigten (Tabelle 3). Die Inokulationen von *Fusarium sporotrichioides*, *Fusarium graminearum* und *Fusarium langsethiae* scheiterten vollständig. Aber auch die Infektionen mit *Fusarium poae*, *Fusarium cerealis* und *Microdochium nivale* zeigten nur sehr schwache Befallsintensitäten der Gerste.

Bessere Ergebnisse wurden für die Beimpfung der Gerste mit *Fusarium avenaceum* und *Fusarium tricinctum* erzielt. Zwar konnten neben dem Besatz mit den genannten Pilzspezies auch diverse andere *Fusarium*-Arten in ähnlichen Konzentrationen detektiert werden, jedoch hielt sich der Befall mit *Fusarium culmorum* deutlich unterhalb der bestimmten Konzentrationen im Hinblick auf die eigentliche Infizierung.

Die beste und fast reine Inokulation wurde mit *Fusarium culmorum* erzielt. Neben einer geringen Kreuzkontamination durch *Fusarium tricinctum* wurde eine sehr hohe Befallsintensität für diese künstliche Infektion festgestellt. Eine noch höhere Kontamination konnte jedoch für die eigentliche Infizierung mit *Fusarium graminearum* nachgewiesen werden. Wahrscheinlich lagen die Pflanzparzellen dicht nebeneinander, so dass eine Übertragung der Pilzsporen durch die Luft stattgefunden hat.

Nach der Mälzung der ausgewählten Gerstenproben wurden die AFP unbehandelten Malze optisch bonitiert und in drei Befallskategorien eingeteilt. Ein optisches Indiz für eine erhöhte *Fusarium* spp. Kontamination einer Probe war das verstärkte Auftreten

**Tabelle 4:** Exemplarische Ergebnisse der Gegenüberstellung der DNA-Mengen (ng) verschiedener *Fusarium spp.* auf der Gerste und den zugehörigen Malzen der drei Befallskategorien mit und ohne AFP Zudosierung

|                        | V2012005444 |           |           | V2012005448 |           |           | V2012005445 |           |           |
|------------------------|-------------|-----------|-----------|-------------|-----------|-----------|-------------|-----------|-----------|
|                        | Gerste      | Malz AFP- | Malz AFP+ | Gerste      | Malz AFP- | Malz AFP+ | Gerste      | Malz AFP- | Malz AFP+ |
| <b>Fus. culmorum</b>   | 1,463       | 3,390     | 0,226     | 0,0834      | 0,908     | 0,065     | 0           | 4,941     | 0,289     |
| <b>Fus. avenaceum</b>  | 0,074       | 0,215     | 0,244     | 0,199       | 1,388     | 1,073     | 0,091       | 1,588     | 0,816     |
| <b>Fus. tricinctum</b> | 0,087       | 5,264     | 2,199     | 5,645       | 11,432    | 11,069    | 0,49        | 14,8      | 7,922     |
| <b>Fus. acuminatum</b> | 0,243       | 0,795     | 0,602     | 2,951       | 4,328     | 4,671     | 0,492       | 11,960    | 1,840     |
| <b>Fus. Gesamt</b>     | 1,867       | 9,664     | 3,271     | 8,8784      | 18,056    | 16,878    | 1,073       | 33,289    | 10,867    |

roter Körner. Um eine gleichmäßige Verteilung der kontaminierten Körner innerhalb der Probe zu gewährleisten, wurde das gesamte Material vermahlen und Aliquots für die nachfolgenden DNA-Extraktionen und anschließende PCR-Analysen entnommen. Mit Hilfe der quantitativen Real-Time-PCR-Analytik konnten die Konzentrationen verschiedener *Fusarium spp.* auf den AFP unbehandelten und behandelten Malzproben bestimmt werden. Nach den ersten Mikromälzungen wurde eine sichtbare Abnahme der DNA-Menge in den AFP behandelten Proben detektiert (Tabelle 4). Zum Teil ist eine Halbierung der Gehalte von behandelter zu unbehaltener Probe zu beobachten. Ganz deutlich wird ebenfalls eine signifikante Zunahme der Befallsintensität während des Mälzungsprozesses im Vergleich zum Ausgangsmaterial Gerste. Die quantitativen Untersuchungen konnten außerdem die optische Einstufung der unbehandelten Malze in die 3 Befallskategorien bestätigen. Es konnte zusätzlich zu den in der Vergangenheit durchgeführten Agardiffusionstests festgestellt werden, dass AFP außerdem eine Hemmwirkung gegenüber den Spezies *Fusarium avenaceum* und *Fusarium acuminatum* aufzeigt. Anhand dieser ersten PCR Bestimmungen konnten DNA-Mengenabnahmen zwischen unbehandelten und behandelten Proben aufgezeigt werden. In Tabelle 4 sind exemplarisch Ergebnisse der quantitativen PCR Analysen für die ersten getätigten Untersuchungen dargestellt.

Wie aus Tabelle 4 deutlich wird, konnten trotz Wiederholungen (Ergebnisse nicht abgebildet) nicht bei allen Proben auffällige DNA-Mengenabnahmen festgestellt werden. Aus diesem Grund wurden die Mikromälzungsversuche in den Parametern Zeit und Menge der Zudosage von AFP variiert. Anstelle der einmaligen Dosage von AFP nach 48 Stunden auf das Grünmalz wurden die Proben zusätzlich nach 72 Stunden mit der gleichen Menge AFP behandelt. Um eventuelle Effekte auszuschließen, die sich durch den Puffer ergeben könnten, in dem das AFP vorliegt, wurden unterschiedliche Negativkontrollen im Versuchsaufbau integriert. Durch diese zweistufige Behandlungsstrategie sollte außerdem festgestellt werden, ob einige Pilzspezies nach der ersten AFP Behandlung nicht so stark unterdrückt werden wie andere und sich diese dann im Anschluss stärker vermehren können.

**Tabelle 5:** Exemplarische Ergebnisse der Gegenüberstellung der DNA-Mengen (ng) verschiedener *Fusarium spp* auf der Gerste und den zugehörigen Malzen nach der zweistufigen Mikromälzung

|                        | V2012005443 |                      |                  |                   |               |                      | V2012005446 |                      |                  |                   |               |                      |
|------------------------|-------------|----------------------|------------------|-------------------|---------------|----------------------|-------------|----------------------|------------------|-------------------|---------------|----------------------|
|                        | Gerste      | Malz AFP-            |                  | Malz AFP+         |               |                      | Gerste      | Malz AFP-            |                  | Malz AFP+         |               |                      |
|                        |             | Puffer 48h & H2O 72h | Puffer 48h & 72h | AFP 48h & H2O 72h | AFP 48h & 72h | AFP 48h & Puffer 72h |             | Puffer 48h & H2O 72h | Puffer 48h & 72h | AFP 48h & H2O 72h | AFP 48h & 72h | AFP 48h & Puffer 72h |
| <b>Fus. culmorum</b>   | 0,19        | 0,01                 | 0,11             | 0,02              | 0,01          | 0,00                 | 0,47        | 0,09                 | 0,03             | 0,03              | 0,05          | 0,04                 |
| <b>Fus. avenaceum</b>  | 0,64        | 0,00                 | 0,02             | 0,00              | 0,02          | 0,00                 | 0,49        | 0,00                 | 0,01             | 0,00              | 0,05          | 0,10                 |
| <b>Fus. tricinctum</b> | 1,26        | 4,86                 | 3,54             | 1,66              | 1,98          | 0,00                 | 1,45        | 3,08                 | 3,65             | 3,54              | 3,23          | 2,68                 |
| <b>Fus. acuminatum</b> | 1,60        | 0,51                 | 0,20             | 0,12              | 0,15          | 0,00                 | 1,02        | 0,16                 | 0,18             | 0,24              | 0,13          | 0,35                 |
| <b>Fus. Gesamt</b>     | 3,69        | 9,24                 |                  | 3,95              |               |                      | 3,43        | 7,19                 |                  | 7,27              |               |                      |

Die mittels quantitativer Real-Time-PCR-Analytik eruierten Ergebnisse bezüglich der unterschiedlichen Befallsintensitäten der Malze und der zugehörigen Gersten mit *Fusarium spp.* sind in Tabelle 5 exemplarisch dargestellt. Anhand der ermittelten DNA-Mengen wurde deutlich, dass beide Proben unterschiedlich stark auf die zweistufige AFP-Behandlung während der Mälzung reagiert haben. Eine Probe zeigte eine deutliche Abnahme bezogen auf die *Fusarium*-Gesamtmenge zwischen AFP-Behandlungen und den Negativkontrollen. Die Befallsintensität nach den AFP-Behandlungen sank mit 3,95 ng DNA deutlich bis auf das Ausgangsniveau der zugehörigen Gerste. Dieser Effekt konnte in der gegenübergestellten Probe nicht festgestellt werden. Während der Mälzung fand mehr als eine Verdopplung des *Fusarium*-Befalls statt. Diese Verdopplung auf 7,19 ng DNA-Menge konnte durch die AFP-Dosagen nicht reduziert werden. Das Befallslevel blieb auch mit AFP-Behandlungen konstant. Die Ursachen dafür konnten nicht eindeutig bestimmt werden. Denkbar wäre, dass Fehler bei der AFP-Dosage auftraten oder dass nicht alle Gersten bzw. Malze gleichmäßig auf die AFP-Dotierungen reagieren, da es sich um komplexe Matrices mit unterschiedlichen Stoffgruppenzusammensetzungen handelt.

Es wurde außerdem festgestellt, dass eine doppelte AFP-Dosage keine zusätzliche Reduzierung des *Fusarium*-Befalls auslöst. Die gemessenen DNA-Mengen lagen nach einmaliger und nach zweimaliger AFP-Zudotierung auf einem Niveau. Zusätzlich konnte ein Effekt des Puffers ausgeschlossen werden. Auch doppelte Puffer-Zugaben führten zu keinen signifikanten DNA-Mengenabnahmen der untersuchten *Fusarium spp.*.

**Tabelle 6:** Exemplarische Ergebnisse der Gegenüberstellung der DNA-Mengen (ng)

verschiedener *Fusarium spp* auf der Gerste und den zugehörigen Malzen nach der Kleinmälzung

|                    | V2012020692 |              |              |
|--------------------|-------------|--------------|--------------|
|                    | Gerste      | Malz<br>AFP- | Malz<br>AFP+ |
| Fus.<br>culmorum   | 0,20        | 0,33         | 0,03         |
| Fus.<br>avenaceum  | 0,00        | 0,33         | 0,04         |
| Fus.<br>tricinctum | 0,83        | 3,26         | 1,18         |
| Fus.<br>acuminatum | 0,14        | 0,57         | 0,41         |
| Fus.<br>Gesamt     | 1,17        | 4,50         | 1,66         |

Nach den Mikromälzversuchen wurden anschließend Kleinmälzungsversuche durchgeführt, um genug Material für weiterführende Malzanalysen zu generieren. Da die zweistufige Mälzung keine eindeutige Verbesserung der *Fusarium*-Befallsreduktion aufzeigte, wurde während der Kleinmälzung nur eine AFP-Dosage nach 48 Stunden vorgenommen. Auch für diese Versuche wurden im Anschluss die DNA-Mengen verschiedener *Fusarium spp.* auf den generierten Malzen eruiert und mit denen der Ausgangsgerste verglichen (Tabelle 6). Es konnte gezeigt werden, dass in einem vergrößerten Mälzungsmaßstab die AFP-Dosage zu einem deutlichen Abfall der gemessenen *Fusarium*-Gesamt-DNA-Menge führte, die vergleichbar mit der Menge für die Ausgangsgerste war. Grundsätzlich konnten die Ergebnisse der Mikromälzung auf die Kleinmälzung übertragen werden, so dass in diesem Punkt ein erfolgreiches Upscaling erreicht wurde.

#### MULTI-MYKOTOXINANALYSE NACH MÄLZUNGSVERSUCHEN

Nach den einzelnen Mälzungsversuchen wurden die AFP-behandelten und AFP-unbehandelten Malze einer Multimykotoxinanalyse unterzogen. Untersucht wurde auf Zearalenon, Desoxynivalenol, Nivalenol, T2-Toxin, HT2-Toxin, 3-Acetyl-DON und Fusarenon X. In einigen Fällen konnten zum Teil starke Toxinabnahmen zwischen AFP-unbehandelten Proben und AFP-behandelten Proben nachgewiesen werden. Am deutlichsten konnte dies für die Toxine Nivalenol und Zearalenon bestimmt werden. In mehreren Proben wurde mindestens eine 3-fache Abnahme des Nivalenol-Gehaltes (in mg/kg OS) für die AFP-behandelten Malze eruiert. Ähnliche Ergebnisse konnten auch für den Zearalenon-Gehalt bestimmt werden. In mehreren Proben wurde eine 2- bis 3-fache Abnahme des Zearalenon-Gehaltes (in mg/kg OS) nachgewiesen. Es konnten sogar Grenzwertüberschreitungen festgestellt werden. Die eruierten Ergebnisse korrelieren mit den Ergebnissen bezüglich der ermittelten DNA-Mengen verschiedener *Fusarium spp.* von AFP-behandelten bzw. AFP-unbehandelten Malzen.

#### EINFLUSS VON AFP AUF DIE GUSHINGNEIGUNG

AFP soll zur Hemmung filamentöser Pilze während der Vermälzung eingesetzt werden, um u.a. der Entstehung bzw. Vergrößerung des Gushing-Potentials der Malze entgegenzuwirken. Das Gushingpotential wurde unter Nutzung des Modifizierten Carlsberg-Tests (MCT) ermittelt. Um auszuschließen, dass AFP selbst über eigenes Gushing-Potential verfügt, wurden zunächst Malzextrakte eines Gushing-freien Kontrollmalzes mit steigenden AFP-Konzentrationen (16 bzw. 32 µg AFP/g Malz) versetzt und im MCT im Vergleich zu einem unbehandelten Extrakt des Kontrollmalzes analysiert. Alle untersuchten Malzextrakte zeigten kein Gushing-Potential, sodass eine gushing-auslösende Wirkung von AFP ausgeschlossen werden kann.

Die Ausgangsgersten sowie die während der Mälzungsversuche unterschiedlich behandelten Proben wurden einem Gushingtest unterzogen. Alle ausgewählten Ausgangsgersten zeigten ein hohes Gushingpotential >150 g Überschäumvolumen. Aus diesem Grund wurden sie für die weiteren Untersuchungen ausgewählt. Aus den Gersten wurden in unterschiedlichen Mälzungsverfahren (einstufige oder zweistufige AFP-Dosage, Mikro- oder Kleinmälzungsversuche) Malze hergestellt, die anschließend auf ihr Gushingpotential untersucht wurden. Grundsätzlich konnte gezeigt werden, dass alle kreierte Malze ein hohes Gushingpotential >150 g Überschäumvolumen zeigten. Dabei spielte es keine Rolle, ob eine AFP-Zudotierung stattgefunden hatte oder nicht. Im Vergleich mit der jeweiligen Ausgangsgerste konnte keine signifikante Abnahme des Gushingpotentials festgestellt werden. Da Überschäumvolumina >150 g die obere Detektionsgrenze des Gushingtests darstellen, wurden die Malzextrakte verschieden verdünnt und erneut einem Gushingtest unterzogen. In den einzelnen Verdünnungsstufen konnten zum Teil

**Tabelle 7:** Exemplarische Ergebnisse und Gegenüberstellung der Gushingpotentiale nach Verdünnungen der einzelnen Malzextrakte

| Probe          | Kodierung   | Gushingpotential [g] 1:2 Verdünnung |       |       |       | Gushingpotential [g] 1:3 Verdünnung |      |      |      |
|----------------|-------------|-------------------------------------|-------|-------|-------|-------------------------------------|------|------|------|
|                |             | F1                                  | F2    | F3    | Ø     | F1                                  | F2   | F3   | Ø    |
| V2012005444-03 | unbehandelt | 3,5                                 | 0,4   | 0,4   | 0,4   | 0,3                                 | 0,4  | 0,3  | 0,4  |
| V2012005444-04 | behandelt   | 21,4                                | 6,8   | 7,3   | 11,8  | 0,4                                 | 0,5  | 0,5  | 0,4  |
| V2012005445-03 | unbehandelt | 46,9                                | 38,6  | 57,5  | 47,7  | 5,7                                 | 0,4  | 63,1 | 23,1 |
| V2012005445-04 | behandelt   | 116,1                               | 114,4 | 86,2  | 105,6 | 0,6                                 | 14,6 | 6,8  | 7,3  |
| V2012005448-03 | unbehandelt | 120,1                               | 99,7  | 126,2 | 115,3 | 118,4                               | 26,6 | 11,7 | 52,2 |
| V2012005448-04 | behandelt   | 116,9                               | 108,7 | 82,5  | 102,7 | 17,1                                | 15,4 | 41   | 24,5 |
| V2012005449-03 | unbehandelt | 88,2                                | 82,1  | 113,6 | 94,7  | 21,5                                | 24,1 | 17,9 | 21,2 |
| V2012005449-04 | behandelt   | 95,5                                | 83    | 47,8  | 75,4  | 30                                  | 3,9  | 23,1 | 19   |

Unterschiede zwischen AFP-behandelten und AFP-unbehandelten Proben festgestellt werden (Tabelle 7). Jedoch widersprechen sich die eruierten Ergebnisse zum Teil auch stark, da es im Test zum Teil zu erheblichen Schwankungen bei den ermittelten Überschäumvolumina aus einem Ansatz kommt. So konnte bei der 1:3 Verdünnung im Durchschnitt eine Abnahme des Gushingpotentials von unbehandelter zu behandelter Probe eruiert werden. Im Gegensatz dazu zeigt die 1:2 Malzextraktverdünnung keine eindeutigen Werte. Es konnte hier zum Teil gezeigt werden, dass sowohl AFP-unbehandelte als auch AFP-behandelte Proben ein vergleichbares Level bezüglich des Gushingpotentials aufweisen. Eine Schwankungsbreite von 20-30 g Überschäumvolumen zwischen unbehandelter und behandelter Probe ist aufgrund der Beschaffenheit des durchgeführten Gushingtests zu vernachlässigen. Auch wenn in den Extraktverdünnungen leichte Unterschiede zwischen unbehandelten und behandelten Proben detektiert werden konnten, sind diese Unterschiede nicht ausreichend um im regulären Gushingtest einen sichtbaren Effekt aufzuzeigen. Die AFP-Behandlungen während der Mälzungen haben demzufolge nicht ausgereicht, um das Gushingpotential entscheidend zu verringern bzw. zu unterdrücken.

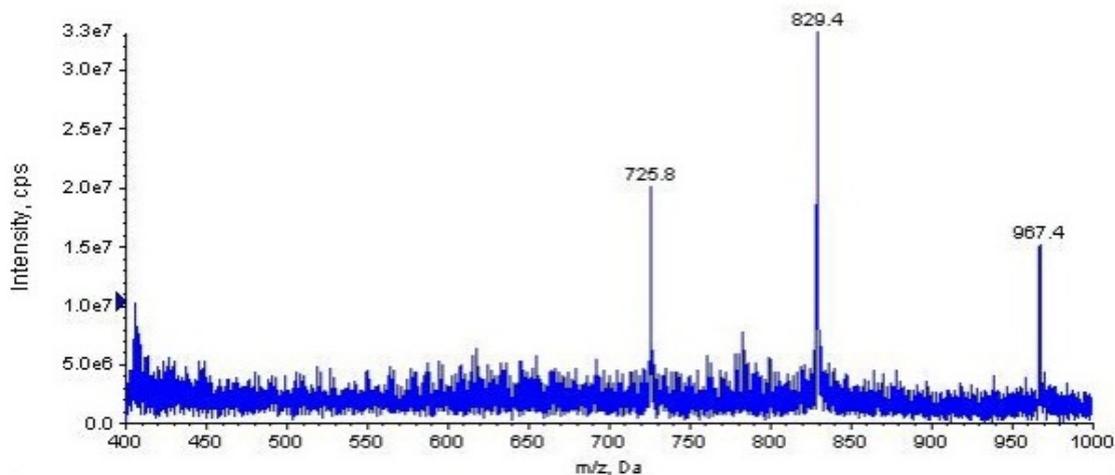
#### ENTWICKLUNG EINER LC-MS/MS METHODE ZUR QUANTITATIVEN BESTIMMUNG VON AFP

Die Hochleistungsflüssigchromatographie in Kopplung mit der Tandemmassenspektrometrie (LC-MS/MS) stellt ein schnelles und empfindliches Analyseverfahren dar. Die Etablierung einer LC-MS/MS Methode zur Quantifizierung von AFP erfolgt im Forschungsinstitut für Rohstoffe an einem QTrap 5500 der Fa. AB Sciex.

In einer Substanzentuning wurden zunächst die Hauptmassen von AFP mit ihrem Ladungszustand sowie stabile Fragmentierungsreaktionen und geeignete Geräteeinstellungen zur massenspektrometrischen Bestimmung von AFP im positiven ESI-Modus ermittelt. Im Full-Scan-Modus am Quadrupol 1 (Q1 MS) wurden durch Variation von verschiedenen Quellenparametern (Ionensprayspannung, etc.) geeignete Grundeinstellungen für die nachfolgenden Fragmentierungsversuche ermittelt, die im Verlauf der Versuche fortlaufend angepasst wurden.

Zur Bestimmung der für AFP auftretenden Hauptionen wurde ein Enhanced MS (EMS) Scan durchgeführt. Das erhaltene Massenspektrum wies drei Peaks mit  $m/z$  von 725, 829 bzw. 967 auf (Abbildung 11).

Mittels eines Enhanced Resolution (ER) Scans erfolgte die Berechnung des Ladungsstatus der drei detektierten Peaks sowie die Ermittlung der Molekülmasse der jeweiligen Ionen. Auf diese Weise konnten die im EMS Scan detektierten Peaks bei  $m/z$  725, 829 bzw. 967 den acht-, sieben- bzw. sechsfach positiv geladenen AFP-Molekülonen  $[M+8H]^{8+}$ ,  $[M+7H]^{7+}$  bzw.  $[M+6H]^{6+}$  zugeordnet werden.



**Abbildung 11:** EMS Spektrum der verdünnten AFP-Lösung ( $c = 9,6 \text{ mg/mL}$ )

Anhand von Product Ion (MS<sup>2</sup>) Scans wurden spezifische Massenübergänge für eine quantitative AFP-Bestimmung mittels LC-MS/MS ermittelt. In allen drei Massenspektren korrespondierte der Basispeak mit dem jeweiligen Vorläuferion, d.h. es tritt nur eine unvollständige Fragmentierung ein. Zum Erreichen der höchsten Intensität der 2-3 intensivsten Fragmentionen wurden Parameter wie Declustering Potential und Collision Energy im Multiple Reaction Monitoring (MRM) Modus optimiert. Die im Substanzentuning ermittelten Einstellungen wurden für eine weitere Methodenentwicklung in Kopplung mit der HPLC eingesetzt.

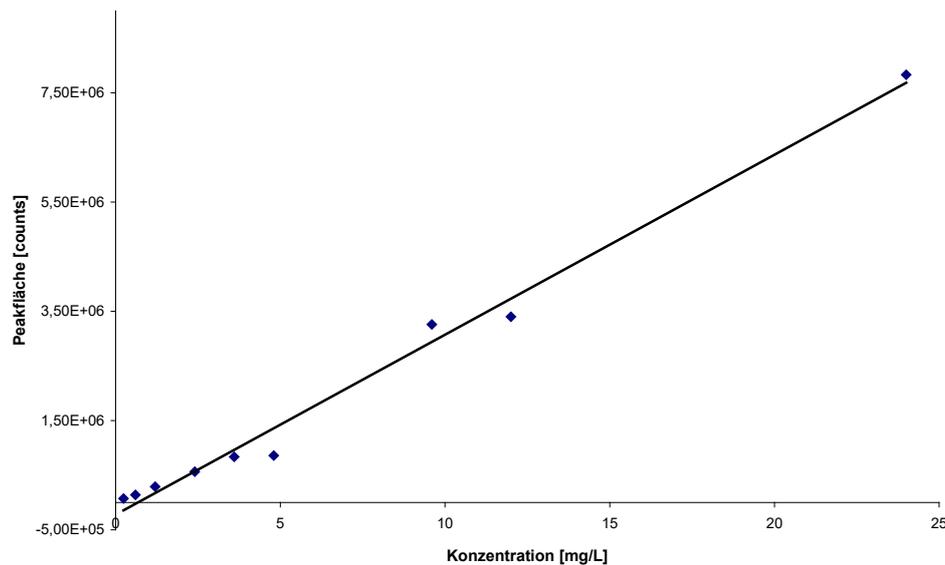
Die Entwicklung der chromatographischen Trennbedingungen erfolgte an der analytischen Säule Jupiter C5 (150,0 x 2,0 mm, 5  $\mu\text{m}$ , 300  $\text{\AA}$ ) der Fa. Phenomenex, die speziell zur Analyse von intakten Proteinen und großen Biomolekülen ausgelegt ist. Als mobile Phase wurden Aqua bidest. mit 0,1% Ameisensäure (Eluent A) und Acetonitril mit 0,1% Ameisensäure (Eluent B) eingesetzt. Ausgewählte MS Parameter wurden unter HPLC Bedingungen überprüft und gegebenenfalls angepasst.

Zur Ermittlung eines geeigneten Lösungsmittelgradienten wurde das Elutionsverhalten von AFP bei variierenden Endkonzentrationen an Acetonitril untersucht. Ausgehend von einer Startkonzentration von 5% Eluent B wurde die Konzentration bei einer Flussrate von 0,20 mL/min und einer Säulentemperatur von 35 °C innerhalb von 10 min linear auf 45-85% erhöht, die Endkonzentration für 3 min gehalten und anschließend die Säule für weitere 5 min bei 5% Eluent B re-equilibriert. Mit zunehmendem Anteil an Acetonitril im Gradienten verbesserte sich die Peakform deutlich und führte zu einer Zunahme der Peakhöhe, sodass eine Endkonzentration von 85% Eluent B für die weiteren Versuche festgesetzt wurde. Eine Erhöhung von Flussrate bzw. Säulentemperatur konnte das Elutionsverhalten von AFP nicht verbessern.

**Tabelle 8:** Ausgewählte MRM-Übergänge der AFP-Molekülonen zur Quantifizierung mittels LC-MS/MS

| Vorläuferion | Fragmentation | Typ        |
|--------------|---------------|------------|
| 725.5        | 819.1         | Qualifier  |
| 829.2        | 955.5         | Quantifier |
|              | 938.4         | Qualifier  |
| 967.2        | 1126.1        | Qualifier  |

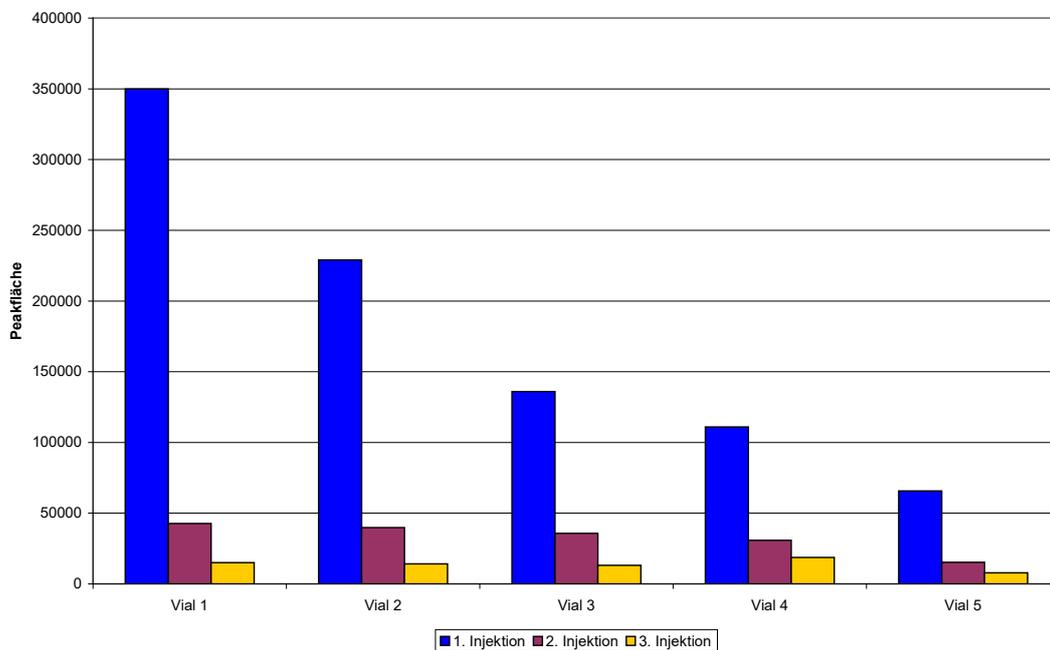
Nach Optimierung der LC-MS/MS Bedingungen wurden geeignete MRM Übergänge der drei Vorläuferionen für eine quantitative LC-MS/MS Methode ausgewählt (Tabelle 8). Dabei wird der intensivste Übergang zur Quantifizierung herangezogen (Quantifier), während die Intensitätsverhältnisse der weiteren Übergänge zur qualitativen Identifizierung von AFP dienen (Qualifier).

**Abbildung 12:** AFP-Kalibration im Bereich von 0,24 – 24,0 mg/L nach Einfachinjektion von Standardlösungen in ACN/H<sub>2</sub>O/FA (50/50/0,1, v/v/v) (Peakfläche des MRM Übergangs des Quantifiers)

Für eine erste Abschätzung des möglichen Kalibrationsbereichs wurden AFP-Standardlösungen in einem Konzentrationsbereich von 0,24 – 24,0 mg/L in Acetonitril/Aqua bidest (50/50, v/v) mit 0,1% Ameisensäure (FA) angesetzt und jeweils fünffach injiziert (Injektionsvolumen 20 µL). Insbesondere bei Konzentrationen kleiner 5,0 mg/L war ab der 2. Injektion eine deutliche Abnahme der Peakfläche zu beobachten, was auf eine unzureichende Lagerstabilität von AFP im Autosampler (T = 15 °C) hindeutet. Anhand der 1. Injektion der Standardlösungen wurde eine Kalibrationsgerade im Bereich von 0,24 – 24,0 mg/L mit einer Geradengleichung von

$y = 329.479x - 222.664$  und einem Bestimmtheitsmaß von  $R^2 = 0,9888$  erstellt (Abbildung 12).

Aufgrund der bei den Kalibrationsversuchen beobachteten Abnahme der Peakflächen mit fortlaufender Injektionszahl wurde die Stabilität des AFP-Standards untersucht. Während AFP in höheren Konzentrationen ( $c = 9,6$  mg/L) über mehrere Injektionszyklen hinweg relativ stabile Peakflächen aufwies, nahmen diese bei niedrigeren Konzentrationen ( $c = 2,4$  mg/L) stark ab. Auch bei AFP-Lösungen (ACN/H<sub>2</sub>O/FA, 40/60/0,1, v/v/v) in original verschlossenen Vials trat mit längerer Standzeit im Autosampler eine Abnahme der detektierten Peakflächen auf, sodass ein äußerer Einfluss auf die Stabilität aufgrund des durchbrochenen Septums (Verdampfung, vermehrter Sauerstoffzutritt, etc.) ausgeschlossen wurde (Abbildung 13).



**Abbildung 13:** Mehrfache Injektion von AFP ( $c = 2,4$  mg/L) in ACN/H<sub>2</sub>O/FA (40/60/0,1, v/v/v)

Weitere Versuche zur Verbesserung der AFP-Stabilität konzentrierten sich daher auf die Suche nach einem geeigneten Lösemittel für Standardlösungen und aufgearbeitete Proben. Es kamen verschiedene Zusammensetzungen von Acetonitril bzw. Methanol mit Aqua bidest zum Einsatz, denen Ameisensäure in variierenden Konzentrationen zugesetzt wurde. Dabei zeigte sich ein deutlicher Einfluss des verwendeten Lösemittels auf die Höhe der detektierten Peakflächen. Auch der Anteil an Ameisensäure im Lösemittel beeinflusste entscheidend die Ergebnisse der LC-MS/MS Messungen, wobei jedoch je nach verwendetem Lösemittel ein positiver bzw. negativer Effekt zu beobachten war. Die beste Stabilität von AFP wurde über einen kurzen Messzeitraum von etwa 2 Stunden unter Verwendung von Acetonitril mit 0,5% Ameisensäure sowie ACN/H<sub>2</sub>O (30/70, v/v) mit 1,0% Ameisensäure erreicht. Da aber

schon für eine sichere 5-Punkt-Kalibration mit dreifacher Injektion der einzelnen Kalibranten eine Messzeit von etwa 5 Stunden erforderlich ist, waren die erzielten Ergebnisse als Grundlage für eine quantitative Bestimmung von AFP mittels LC-MS/MS nicht ausreichend.

Des Weiteren trat mit zunehmender Säurekonzentration zum Teil ein zusätzlicher Peak in den aufgenommenen Chromatogrammen auf, der die gleichen Massenübergänge wie AFP jedoch mit verschobenen Intensitätsverhältnissen aufwies. Eventuell handelt es sich dabei um ein AFP-Addukt, welches bei höheren Säurekonzentrationen bevorzugt gebildet und zeitversetzt zu dem AFP-Hauptpeak eluiert wird. Die tatsächliche Ursache für das Auftreten sowie die Identität des zweiten Peaks in den Chromatogrammen konnte jedoch nicht abschließend geklärt werden.

Aufgrund der beschriebenen Schwierigkeiten zum Erreichen der erforderlichen Stabilität der Standardsubstanz, der zum Teil auftretenden Begleitpeaks unbekanntem Ursprungs sowie einer schlechten Wiederholbarkeit von Ergebnissen bei Messungen an verschiedenen Tagen erwies sich die Analyse von AFP mittels LC-MS/MS insgesamt als schwierig. Für eine Nutzung dieser Analysenmethode zur Quantifizierung von AFP in Würze und Bier müsste eine weiterführende aufwändige Methodenentwicklung erfolgen. Dies war im verbleibenden Zeitrahmen dieses Projektes nicht mehr möglich.

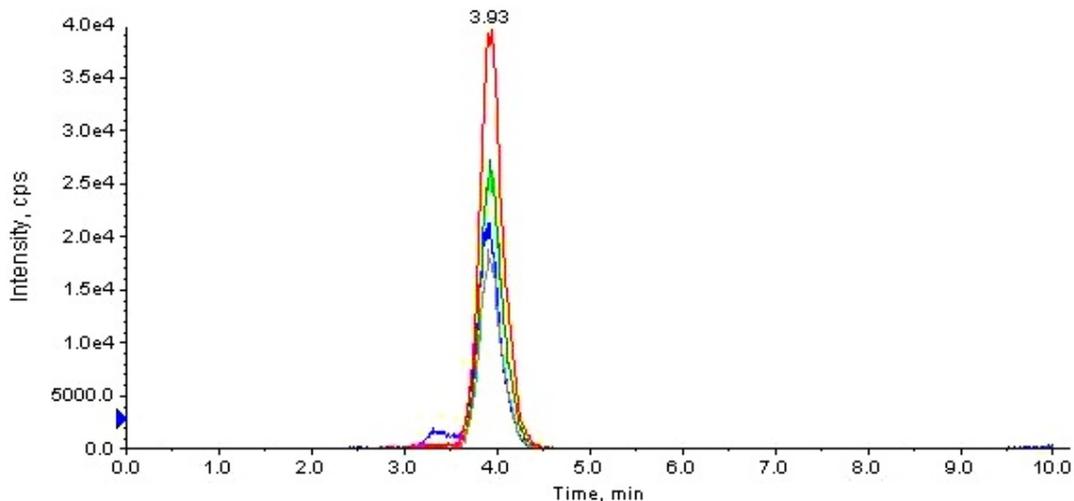
#### ENTWICKLUNG GEEIGNETER AUFREINIGUNGSMETHODEN ZUR LC-MS/MS BESTIMMUNG VON AFP AUS WÜRZE UND BIER

Zur quantitativen Bestimmung von AFP in Würze und Bier mittels LC-MS/MS sind eine Aufkonzentrierung des Analyten sowie eine möglichst umfassende Abtrennung von Matrixbestandteilen erforderlich. Methode der Wahl ist hierfür in der Regel die Festphasenextraktion (SPE), bei der nach Aufgabe der Probenlösung auf eine SPE-Säule die Analyten an eine geeignete stationäre Phase gebunden werden, während Matrixbestandteile die Säule ungehindert passieren. Nach optionalen Waschschrritten erfolgt die Elution der Analyten von der Säule mit einem geeigneten Lösemittelgemisch.

In ersten Vorversuchen wurde eine wässrige AFP-Lösung ( $c = 0,8 \mu\text{g/L}$ ) über SPE-Säulen Strata-X ( $33 \mu\text{m}$ ,  $85 \text{ \AA}$ , polymeric reversed phase,  $30 \text{ mg/3mL}$ ) der Fa. Phenomenex aufkonzentriert. Nach einem Standardverfahren des Herstellers zur Fraktionierung von Proteingemischen erfolgte die Elution mit Lösemittelgemischen wechselnder Zusammensetzung in drei aufeinanderfolgenden Schritten. Zunächst wurden mit Acetonitril/Aqua bidest (40/60, v/v) saure Verbindungen eluiert, dann folgte die Elution neutraler Verbindungen mit Acetonitril/Aqua bidest (70/30, v/v). Basische Verbindungen wurden mit Acetonitril/Aqua bidest (70/30, v/v) mit 0,1% Ameisensäure eluiert. Die Eluate wurden anschließend ohne weitere Behandlung mittels LC-MS/MS analysiert.

Natives AFP eluierte ausschließlich in der dritten Fraktion, was durch den im basischen Milieu liegenden isoelektrischen Punkt des AFPs von 8,8 zu erklären ist. Jedoch wurden nur etwa 5% des aufgegebenen AFPs im Eluat wiedergefunden. Dies könnte z.B. auf eine unvollständige Elution des AFPs bei der gewählten Lösungsmittelzusammensetzung oder eine Überladung der Säule bei der Probenaufgabe zurückzuführen sein.

Um die Möglichkeit der Abtrennung störender Matrixbestandteile mittels SPE zu überprüfen, wurden eine mit AFP dotierte Kongresswürze ( $c = 0,8 \text{ mg/L}$ ) nach dem zuvor beschriebenen Protokoll aufgearbeitet und mittels LC-MS/MS analysiert. In Abbildung 14 ist ein LC-MS/MS Chromatogramm des dritten SPE Eluats, in dem AFP mit einer Wiederfindung von etwa 20% nachgewiesen wurde, dargestellt. Die Quantifizierung störende, coeluiierende Matrixbestandteile waren bei den detektierten MRM Übergängen nicht erkennbar, sodass die verwendete Methodik der SPE zur Aufreinigung von AFP aus Würze grundsätzlich geeignet erscheint.



**Abbildung 14:** LC-MS/MS Chromatogramm einer mittels SPE aufgearbeiteten, mit  $0,8 \text{ mg/L}$  AFP dotierten Kongresswürze [ $m/z$  829/955 (rot), 829/938 (grün), 725/819 (blau) und 967/1126 (grau)]

Im Anschluss an diese Vorversuche wurden zur Optimierung des SPE-Verfahrens verschiedene Elutionsmittel und Elutionsvolumina mit AFP-Standardlösungen getestet. Ein Säureanteil im verwendeten Lösemittel erwies sich dabei als zwingend erforderlich für eine Elution von AFP. Dagegen zeigte der Anteil an Acetonitril im Elutionsmittel nur einen geringen Einfluss, wobei der Einsatz niedrigerer Konzentrationen von 20-40% Acetonitril in der Regel bessere Ergebnisse lieferte. Eine Erhöhung des Elutionsvolumens bewirkte meist eine leichte Zunahme der eluierten Absolutmenge an AFP. Aufgrund des dabei auftretenden Verdünnungseffekts würde dies jedoch die Implementierung eines zusätzlichen Aufkonzentrierungsschritts (z.B. Entfernen des Lösemittels im Stickstoffstrom) erfordern, um tatsächlich höhere AFP-Konzentrationen in den Messlösungen und damit eine Erniedrigung der

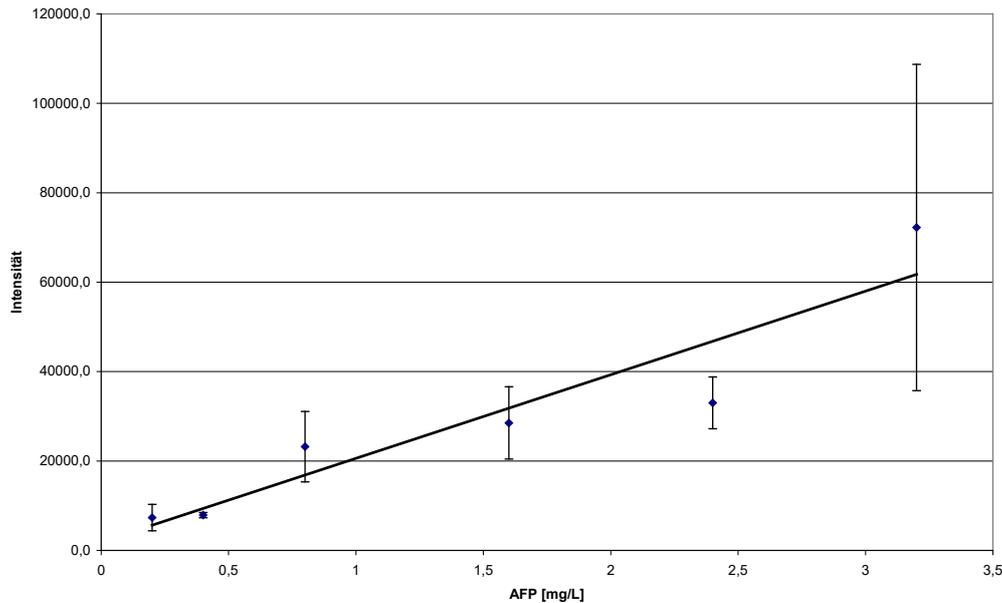
Nachweisgrenze bei der Messung realer Proben zu erreichen.

Insgesamt erwies sich die Auswertung der Optimierungsversuche als schwierig, da nicht eindeutig zu klären war, ob beobachtete Konzentrationsunterschiede auf die Änderung der SPE-Bedingungen oder eine mangelnde Stabilität des AFPs in den Eluaten zurückzuführen waren. Aufgrund der bei der Entwicklung der LC-MS/MS Methode aufgetretenen Schwierigkeiten bezüglich der Stabilität von AFP wurde die Etablierung der Aufreinigungsmethode mittels SPE zunächst nicht fortgeführt.

#### ENTWICKLUNG EINER MALDI-TOF MS METHODE ZUR SEMIQUANTITATIVEN BESTIMMUNG VON AFP

Aufgrund der aufgetretenen Probleme bei der Methodenentwicklung an der LC-MS/MS wurde parallel die Etablierung einer semiquantitativen Bestimmungsmethode mittels MALDI-TOF MS angestrebt. Erste Versuche mit verdünnten AFP-Lösungen zeigten, dass sich Konzentrationsunterschiede grob in den gemessenen Peakintensitäten und Peakflächen widerspiegelten, sodass eine Abschätzung der AFP-Gehalte in Würzen und Bieren anhand von MALDI-TOF MS Messungen möglich sein könnte. Abbildung 15 zeigt eine Verdünnungsreihe von AFP in Aqua bidest. mit 0,1% TFA im Konzentrationsbereich von 0,2-3,2 mg/L. Die Lösungen wurden im Verhältnis 1:1 mit einer HCCA-Matrixlösung (10 mg/mL in ACN/H<sub>2</sub>O/TFA, 50/50/0,1, v/v/v) gemischt, 1,0 µL der Mischung auf je zwei Spots eines MTP 384 Ground Steel Targets pipettiert und die getrockneten Spots anschließend im positiven Linear-Modus im Massenbereich von 2-20 kDa vermessen. Die Auftragung der Mittelwerte der Peakintensitäten von zwei vermessenen Spots gegen die jeweilige Konzentration lieferte eine Geradengleichung von  $y = 18708x + 1993,1$  mit einem Bestimmtheitsmaß von  $R^2 = 0,8743$ .

Da eine direkte Messung von Würzen mittels MALDI-TOF MS aufgrund der komplexen Probenmatrix nicht möglich ist, wurden verschiedene Methoden zur Aufreinigung und Aufkonzentration von AFP aus Würze getestet. Neben der SPE über Strata-X Säulen (33 µm, 85 Å, polymeric reversed phase, 30 mg/1mL) der Fa. Phenomenex und Elution der basischen Proteine mit ACN/H<sub>2</sub>O/TFA (70/30/0,1, v/v/v) wurden Fällungsreaktionen mit den organischen Lösemittel Ethanol und 1-Propanol untersucht. Bei Vergleich einer undotierten sowie einer dotierten Kongresswürze (c = 3,2 mg/L AFP) konnte in allen Aufarbeitungsvarianten das Molekülion  $[M+H]^+$  von AFP in der dotierten Probe eindeutig nachgewiesen werden. Trotz einer fünffach höheren Aufkonzentrierung wiesen dabei die Spektren nach SPE niedrigere Intensitäten und Peakflächen als die Spektren der verschiedenen Fällungsreaktionen auf. Die Spektren nach Fällung mit Ethanol lieferten im Vergleich zu denen mit 1-Propanol vergleichbare Peakmuster jedoch deutlich niedrigere Intensitäten der detektierten Peaks. Zur Ermittlung der optimalen Fällungsbedingungen wurden die Konzentrationen an 1-Propanol variiert. Eine Fällung mit 20% 1-Propanol zeigte



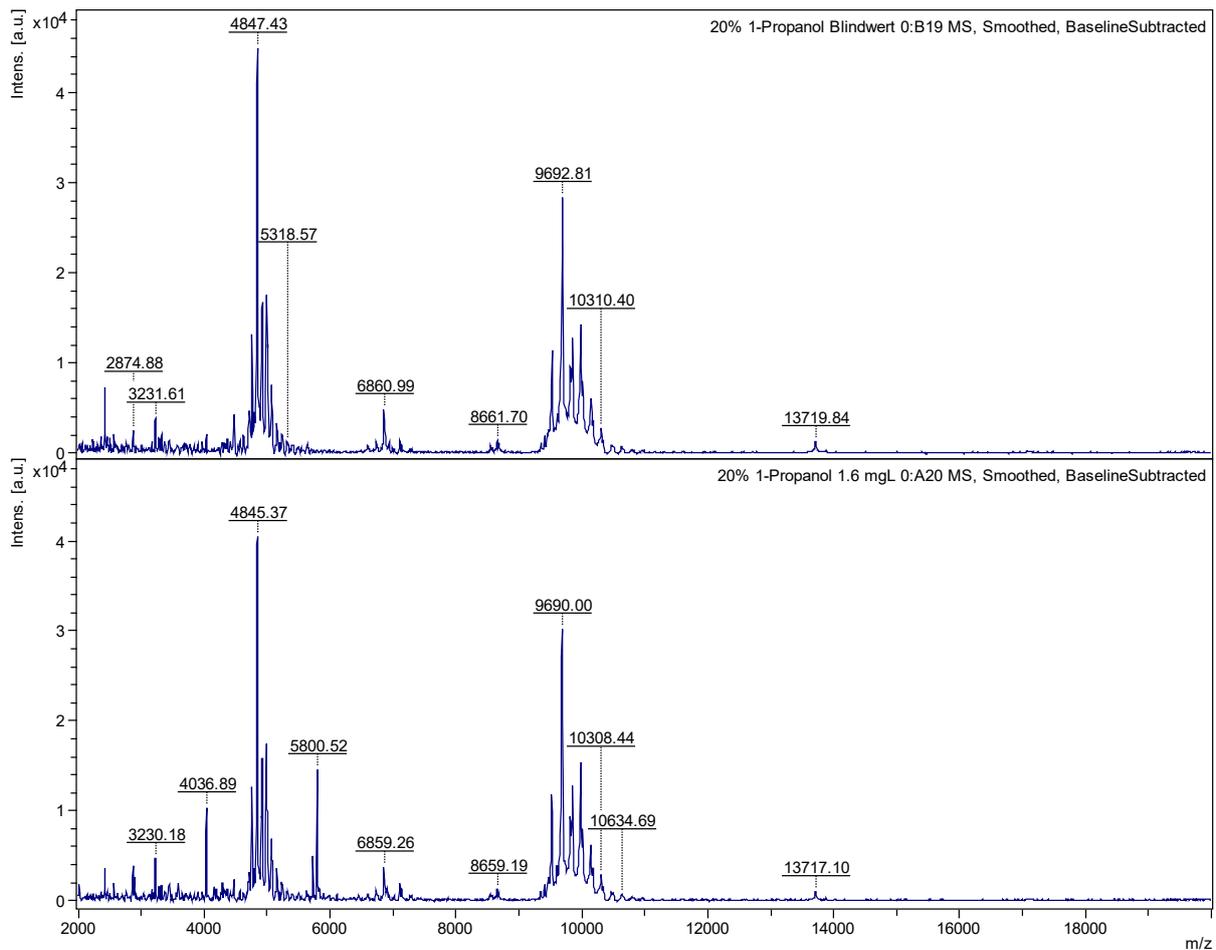
**Abbildung 15:** AFP-Verdünnung in Aqua bidest. mit 0,1% TFA im Bereich von 0,2 - 3,2 mg/L (Mittelwert aus 2 Spots, Matrix HCCA, 10 mg/mL in ACN/H<sub>2</sub>O/TFA, 50/50/0,1, v/v/v)

dabei im Vergleich zum Einsatz von 33% bzw. 50% 1-Propanol das höchste Intensitätsverhältnis von AFP zu den übrigen ausgefällten Würzeproteinen.

Eine Aufreinigung von Probelösungen über SupelTips C18 (Fa. Supelco) kann die Qualität von Massenspektren durch eine zusätzliche Entfernung von Salzen und anderen Störsubstanzen verbessern. Anhand von wässrigen AFP-Lösungen wurden verschiedene Zusammensetzungen von ACN/H<sub>2</sub>O/TFA (x/100-x/0,1, v/v/v) zur Optimierung der AFP-Elution getestet. Im Bereich von 30-70% ACN eluierte AFP in vergleichbaren Größenordnungen, während ACN-Konzentrationen von kleiner 30% bzw. größer 70% niedrigere Intensitäten im Massenspektrum aufwiesen. Ein Anteil von 50% ACN im Elutionsmittel wurde als optimal angesehen, da bei niedrigeren Konzentrationen starke Intensitätsschwankungen zwischen verschiedenen Spektren auftraten und höhere Anteile an organischem Lösemittel das Kristallisationsverhalten auf dem Spot verschlechtern. Die zusätzliche SupelTips C18-Aufreinigung der Probelösungen aus den verschiedenen Aufarbeitungsversuchen lieferte Massenspektren mit besser aufgelösten Peaks und höheren Intensitäten, sodass die Aufarbeitung um diesen Arbeitsschritt ergänzt wurde.

Mit der finalen Aufarbeitungsmethode wurde eine Verdünnungsreihe von AFP in Kongresswürze im Konzentrationsbereich von 0,4-3,2 mg/L AFP für MALDI-TOF MS Messungen vorbereitet. Abbildung 16 zeigt die Spektren einer unbehandelten und einer mit AFP dotierten Kongresswürze nach Proteinfällung mit 20% 1-Propanol, anschließender Aufreinigung über SupelTips C18 und Messung mittels MALDI-TOF MS im Massenbereich von 2-20 kDa (Matrix: HCCA, 10 mg/L in ACN/H<sub>2</sub>O/TFA,

50/50/0,1, v/v/v).



**Abbildung 16:** MALDI-TOF Massenspektrum einer unbehandelten und einer mit AFP dotierten Kongresswürze

Der Molekülpeak  $[M+H]^+$  von AFP bei  $m/z$  5800,5 war bis zu einer AFP-Konzentration von 0,4 mg/L noch in den Spektren erkennbar, sodass ein qualitativer Nachweis in Würzen aus AFP-behandelten Malzen bis zu diesen Konzentrationen möglich sein sollte. Auch eine grobe Abschätzung des AFP-Gehalts könnte durch Vergleich der Realproben mit einer AFP-Verdünnungsreihe in Würzen der unbehandelten Vergleichsmalze erfolgen.

Die Kongresswürzen einer unbehandelten und einer mit AFP behandelten Malzprobe aus Kleinmälzungsversuchen wurden anschließend mit der beschriebenen Methode untersucht. Bei einer Applikation von 1,6 mg AFP/100 g Malz müssten bei vollständigem Übergang Konzentrationen von etwa 2 mg/L AFP in der Kongresswürze vorliegen. Massenspektrometrisch konnten jedoch keine Unterschiede zwischen den MALDI-TOF Spektren der dotierten und undotierten Würze festgestellt werden. Der Molekülpeak  $[M+H]^+$  von AFP bei  $m/z$  5800,5 war nicht nachweisbar. Dies könnte zum einen bedeuten, dass AFP durch Verluste oder Abbaureaktionen während des Mälzungs- und Maischprozesses nur noch in Konzentrationen kleiner 0,4 mg/L in der

Kongresswürze vorliegt. Zum anderen könnte AFP durch thermisch, chemisch oder enzymatisch induzierte Reaktionen modifiziert worden sein, sodass natives AFP in der Würze nicht mehr nachzuweisen ist. Eine weiterführende Methodenentwicklung sollte sich daher insbesondere auf den Nachweis von modifiziertem AFP konzentrieren.

### **3. BEWERTUNG DER ERZIELTEN ERGEBNISSE**

Im Rahmen des Projektes konnte die AFP-Ausbeute durch Optimierung der Nährmedien und der Fermentationsbedingungen auf fast 50 mg AFP/l gesteigert werden. Gleichzeitig ist es gelungen, die APF-Gewinnung vom Labormaßstab in einen 5-l-Fermenter zu überführen und einen Batch-Fermentationsprozess zu etablieren.

Durch die Umstellung der Fermentation auf ein synthetisches Minimalmedium SMM konnten die Kosten um ca. 80% auf 1,30 €/l reduziert werden. Desweiteren die Aufreinigungsschritte bei der AFP-Produktion zu verbessern und damit die Gesamt-Prozessdauer von 12 Tagen auf nur noch 7 Tage zu verkürzen.

Mit den genannten Verbesserungen wurden wichtige Projektziele erreicht. Im Hinblick auf die Produktion industriell relevanter Mengen zu akzeptablen Preisen kann dieser Erfolg allerdings nicht mehr als ein erster Schritt sein, dem weitere folgen müssen. Die in Mälzungsversuchen ermittelten Aufwandmengen von etwa 10 mg/kg Gerste erfordern zur Behandlung einer üblichen industriellen Batchgröße von 100 t eine AFP-Menge von 1 kg. Bei den bisher erzielten Ausbeuten von 50 mg AFP/l erfordert dies ein Gesamtvolumen von 20.000 l Nährmedium. Allein über das Nährmedium entstehen dabei Kosten von ca. 260,00 € für die AFP-Behandlung von 1 t Gerste. Bei Malzpreisen von 400,00 €/t wird sehr schnell deutlich, dass für eine zukünftige industrielle Anwendung die AFP-Produktion erheblich optimiert werden muss.

Die Wirksamkeit der AFP-Behandlung gegenüber *Fusarium ssp.* und anderen filamentösen Pilzen konnte in Wirksamkeits- und Sensitivitätstest nachgewiesen werden.

Die dort gewonnenen Erkenntnisse wurden in Mälzungsversuchen im Wesentlichen bestätigt. Durch die AFP-Behandlung der Grünmalze konnte die Entwicklung der verschiedenen *Fusarium ssp.* gegenüber unbehandelten Varianten zwar nicht vollständig unterdrückt, jedoch signifikant vermindert werden. Gleichzeitig ist es gelungen, die Neubildung von Mykotoxinen während des Mälzungsprozesses deutlich zu reduzieren. Der Mälzungsprozess selbst und die Qualität der hergestellten Malze wurde durch die Anwendung von AFP nicht nachteilig beeinflusst.

Mit diesem Nachweis der Wirksamkeit und Verträglichkeit des Einsatzes von AFP wurde eine wichtige Zielsetzung des Forschungsprojektes erreicht. Die Ergebnisse zeigen, dass eine Behandlung von Grünmalzen ohne Qualitätseinbußen möglich ist und die erwartete antifungale Wirkung des AFP eintritt.

Rückstände von AFP in Würzen, die aus AFP-behandelten Malzen hergestellt wurden, konnten auch unter Einsatz sehr sensitiver Methoden wie MALDI-TOF-MS oder LC-MS/MS nicht nachgewiesen werden. Diese negativen Befunde sind im Hinblick auf die angestrebten Anwendung im industriellen Maßstab von großer Bedeutung.

Leider konnte die erhoffte Wirkung einer AFP-Behandlung des Grünmalzes während des Mälzungsprozesses auf das Gushing-Potenzial der hergestellten Malze in den Versuchen bisher nicht eindeutig bestätigt werden. In Abhängigkeit von den verwendeten Gersten ergaben sich höchst unterschiedliche Befunde, die von völliger Wirkungslosigkeit bis hin zu einer signifikanten Verminderung des Gushing-Risikos der behandelten Malze im Vergleich zu unbehandelten Standardmalzen reichten. Hier sind weitere Untersuchungen notwendig, um die Ursachen dieser stark variierenden Ergebnisse zu klären.

#### **4. DARSTELLUNG DER INNOVATIONSPOTENZIALE UND APPLIKATIONSMÖGLICHKEITEN**

Das Forschungsvorhaben hat die Möglichkeiten der Inhibierung von *Fusarium ssp.* und anderen filamentösen Pilzen während des Mälzungsprozesses durch die gezielte Applikation eines natürlichen Anti-Fungal-Proteins (AFP) untersucht. Die Ergebnisse des Projektes haben die Wirksamkeit einer AFP-Behandlung bestätigt und ein signifikante Abnahme der *Fusarium*-Entwicklung während des Mälzungsprozesses ebenso nachgewiesen wie eine deutliche Verminderung der Neubildung verschiedener Mykotoxine. Mit dem Nachweis der Wirksamkeit ist eine wichtige Voraussetzung für die angestrebte Nutzung in der industriellen Malzproduktion erfüllt.

Trotz dieser in Grundsatz sehr positiven Projektergebnisse ist eine unmittelbare industrielle Anwendung im gegenwärtigen Stadium noch nicht möglich. Auf dem Weg zu einem wirtschaftlich sinnvollen Einsatz im industriellen Maßstab sind weitere Forschungs- und Entwicklungsarbeiten notwendig, in denen zwei wesentlich Aspekte näher untersucht werden müssen.

Die zukünftigen Einsatzmöglichkeiten von AFP in der industriellen Malzproduktion hängen entscheidend davon ab, ob es gelingt, die Ausbeute in einem kommerziellen Herstellungsprozess soweit zu steigern, dass AFP zu akzeptablen Kosten angeboten und angewendet werden kann. Zwar ist es im Rahmen des Projektes gelungen, die AFP-Ausbeute durch Verfahrens- und Medienoptimierung signifikant zu steigern und die Machbarkeit einer AFP-Produktion im Batch-Verfahren in Fermentern nachzuweisen. Die dabei erreichten Ausbeuten sind jedoch bei weitem nicht ausreichend, um eine wirtschaftliche Anwendung von AFP in der Malzindustrie zu ermöglichen. Eine grobe Kalkulation der Herstellungskosten (s.o.) macht sehr schnell deutlich, dass eine Kostensenkung um den Faktor 100 notwendig wäre, um die Kosten der AFP-Anwendung in einen wirtschaftlich akzeptablen Bereich von 2-3 € je Tonne

Malz abzusenken. Möglichkeiten hierzu liegen in einer weiteren Steigerung der Ausbeute der AFP-Produktion und/oder in einer Verminderung der Aufwandmengen bei der Behandlung des Grünmalzes. Während nach den bisher erarbeiteten Ergebnissen für eine weitere Absenkung der Aufwandmenge nur begrenzter Spielraum zu bestehen scheint, birgt die Herstellung von AFP noch erhebliches Optimierungspotenzial.

Auch wenn im Rahmen des jetzt abgeschlossenen Projektes bereits eine signifikante Ausbeutesteigerung erreicht werden konnte, ist die erzielte AFP-Ausbeute noch weit entfernt von den Ergebnissen kommerzieller Produktionsprozesse, in denen Proteinausbeuten von bis zu 30 g/l erreicht werden können. Möglichkeiten einer Ausbeutesteigerung liegen neben einer weiteren Optimierung der Fermentationsbedingungen vor allem in einer Steigerung der AFP-Expression, z.B. durch die Verwendung konstitutiver Promotoren und/oder die heterologe Expression des AFP-Gens in alternativen Systemen (z.B. *Pichia pastoris*). Um in einen wirtschaftlichen relevanten Bereich vorzudringen, sollte eine Steigerung der Ausbeute auf 2-3g /l angestrebt werden, was angesichts der in anderen Bereichen bereits realisierten Ausbeuten (s.o.) als nicht unrealistisches Ziel erscheint.

Neben der Steigerung der AFP-Ausbeute erfordert der Nachweis der Wirksamkeit von AFP bei der Verminderung des Gushing-Potenzials von Malzen weitere Aufmerksamkeit. Für die Akzeptanz des AFP-Einsatzes im industriellen Maßstab ist dieser Nachweis von besonderer Bedeutung. Da es für die Gushing-Problematik bislang weder genaue Erkenntnisse zu den verursachenden Substanzen noch wirksame technologische Gegenmaßnahmen gibt, käme dem Einsatz von AFP im Erfolgsfalle besondere Bedeutung zu. Ein Alleinstellungsmerkmal bei der Gushing-Prävention würde auch entsprechende Kosten für die Applikation während der Vermälzung rechtfertigen. Weiterführende Untersuchungen müssen vor allem die Ursachen der bisher vorliegenden, teilweise widersprüchlichen Ergebnisse klären.

## **5. ANGABEN ZU ERWORBENEN BZW. ANGEMELDETEN SCHUTZRECHTEN**

Bisher wurden keine Schutzrechte erworben oder angemeldet.

## **6. ZUSAMMENSTELLUNG ALLER ERFOLGTEN BZW. GEPLANTEN VERÖFFENTLICHUNGEN**

**The antifungal protein from *Aspergillus giganteus* prevents *Fusarium* growth of barley during the malting process**

International Conference on Antimicrobials Research ICAR 2012, Valladolid (Spain),  
3.-5. November 2010

Weitere Veröffentlichung in Fachzeitschriften und Vorträge auf Fachkonferenzen sind vorgesehen. Einzelheiten hierzu sind zum Zeitpunkt der Erstellung des Sachberichts noch nicht bekannt.

## LITERATUR

- Abdel-Latif M, Garbe LA, Koch M, Ruther J (2008) An epoxide hydrolase involved in the biosynthesis of an insect sex attractant and its use to localize the production site. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105: 8914-8919.
- Al-Alawi A, Ryan CF, Flint JD, Muller NL (2005) *Aspergillus*-related lung disease. *Can Respir J* 12: 377-387.
- Anderson TM and Moselio S (2009) Industrial Fermentation Processes. In *Encyclopedia of Microbiology*. Oxford: Academic Press, pp. 349-361.
- Boettner M, Steffens C, von Mering C, Bork P, Stahl U, Lang C (2007) Sequence-based factors influencing the expression of heterologous genes in the yeast *Pichia pastoris*-- A comparative view on 79 human genes. *J Biotechnol* 130: 1-10.
- Bohlin C, Jonsson LJ, Roth R, van Zyl WH (2006) Heterologous expression of *Trametes versicolor* laccase in *Pichia pastoris* and *Aspergillus niger*. *Appl Biochem Biotechnol* 129-132: 195-214.
- Felske-Zech H (2001) Genotypische Differenzierung und Detektion pathogener *Aspergillus*-Spezies. TU Berlin.
- Garbe LA, Moreno-Horn M, Rewicki D, Tressl R, Gorisch H (2004) Microbial desaturation of bis(1-chloro-2-propyl) ether into a dichloro vinyl ether. *Chembiochem* 5: 876-878.
- Garbe LA and Tressl R (2004) Metabolism of deuterated threo-dihydroxy fatty acids in *Saccharomyces cerevisiae*: Enantioselective formation and characterization of hydroxylactones and gamma-lactones. *Helvetica Chimica Acta* 87: 180-196.
- Garbe LA, Hubke H, Tressl R (2005) Enantioselective formation pathway of a trihydroxy fatty acid during mashing. *Journal of the American Society of Brewing Chemists* 63: 157-162.
- Garbe LA, Moreno-Horn M, Tressl R, Gorisch H (2006) Preferential attack of the (S)-configured ether-linked carbons in bis-(1-chloro-2-propyl) ether by *Rhodococcus* sp. strain DTB. *FEMS Microbiol Ecol* 55: 113-121.
- Garbe LA, Wurtz A, Piechotta CT, Tressl R (2008) The peptide-catalyzed Maillard reaction - Characterization of C-13 reductones. *Maillard Reaction: Recent Advances in Food and Biomedical Sciences* 1126: 244-247.
- Girgi M, Breese WA, Lorz H, Oldach KH (2006) Rust and downy mildew resistance in pearl millet (*Pennisetum glaucum*) mediated by heterologous expression of the *afp* gene from *Aspergillus giganteus*. *Transgenic Res* 15: 313-324.
- Gouka RJ, Punt PJ, van den Hondel CA (1997) Efficient production of secreted proteins by *Aspergillus*: progress, limitations and prospects. *Appl Microbiol Biotechnol* 47: 1-11.
- Guglielmo-Viret V, Attree O, Blanco-Gros V, Thullier P (2005) Comparison of electrochemiluminescence assay and ELISA for the detection of *Clostridium botulinum* type B neurotoxin. *J Immunol Methods* 301: 164-172.
- Hagen S, Marx F, Ram AF, Meyer V (2007) The antifungal protein AFP from *Aspergillus giganteus* inhibits chitin synthesis in sensitive fungi. *Appl Environ Microbiol* 73: 2128-2134.
- Jestoi M (2008) Emerging fusarium-mycotoxins fusaproliferin, beauvericin, enniatins, and moniliformin: a review. *Crit Rev Food Sci Nutr* 48: 21-49.
- Lacadena J, Martinez del Pozo A, Gasset M, Patino B, Campos-Olivas R, Vazquez C, Martinez-Ruiz A, Mancheno JM, Onaderra M, Gavilanes JG (1995) Characterization

- of the antifungal protein secreted by the mould *Aspergillus giganteus*. *Arch Biochem Biophys* 324: 273-281.
- Leisegang R and Stahl U (2005) Degradation of a foam promoting barley protein by a proteinase from brewing yeast. *Journal of the Institute of Brewing Vol 11* 112-117.
- Lubertozzi D and Keasling JD Developing *Aspergillus* as a host for heterologous expression. *Biotechnology Advances* 27: 53-75.
- Marx F, Binder U, Leiter E, Pocsi I (2008) The *Penicillium chrysogenum* antifungal protein PAF, a promising tool for the development of new antifungal therapies and fungal cell biology studies. *Cell Mol Life Sci* 65: 445-454.
- Meyer V (2008) A small protein that fights fungi: AFP as a new promising antifungal agent of biotechnological value. *Appl Microbiol Biotechnol* 78: 17-28.
- Meyer V and Stahl U (2002) New insights in the regulation of the *afp* gene encoding the antifungal protein of *Aspergillus giganteus*. *Curr Genet* 42: 36-42.
- Meyer V, Wedde M, Stahl U (2002) Transcriptional regulation of the Antifungal Protein in *Aspergillus giganteus*. *Mol Genet Genomics* 266: 747-757.
- Meyer V, Spielvogel A, Funk L, Tilburn J, Arst HN, Jr., Stahl U (2005) Alkaline pH-induced up-regulation of the *afp* gene encoding the antifungal protein (AFP) of *Aspergillus giganteus* is not mediated by the transcription factor PacC: possible involvement of calcineurin. *Mol Genet Genomics* 274: 295-306.
- Meyer V, Damveld RA, Arentshorst M, Stahl U, van den Hondel CA, Ram AF (2007) Survival in the presence of antifungals: Genome-wide expression profiling of *aspergillus niger* in response to sub-lethal concentrations of caspofungin and fenpropimorph. *J Biol Chem*.
- Meyer V (2008) A small protein that fights fungi: AFP as a new promising antifungal agent of biotechnological value. *Appl Microbiol Biotechnol* 78: 17-28.
- Moreno AB, Penas G, Rufat M, Bravo JM, Estopa M, Messeguer J, San Segundo B (2005) Pathogen-induced production of the antifungal AFP protein from *Aspergillus giganteus* confers resistance to the blast fungus *Magnaporthe grisea* in transgenic rice. *Mol Plant Microbe Interact* 18: 960-972.
- Oldach KH, Becker D, Lorz H (2001) Heterologous expression of genes mediating enhanced fungal resistance in transgenic wheat. *Mol Plant Microbe Interact* 14: 832-838.
- Prinz B, Schultchen J, Ryzewski R, Holz C, Boettner M, Stahl U, Lang C (2004) Establishing a versatile fermentation and purification procedure for human proteins expressed in the yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia pastoris* for structural genomics. *J Struct Funct Genomics* 5: 29-44.
- Punt PJ, van Biezen N, Conesa A, Albers A, Mangnus J, van den Hondel C (2002) Filamentous fungi as cell factories for heterologous protein production. *Trends Biotechnol* 20: 200-206.
- Singhania RR, Patel AK, Soccol CR, Pandey A (2009) Recent advances in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal* 44: 13-18.
- Spielvogel A, Findon H, Arst Jr HN, Araujo-Bazan L, Hernandez-Ortiz P, Stahl U, Meyer V, Espeso EA (2008) Two zinc finger transcription factors, *CrzA* and *SlfA*, are involved in cation homeostasis and detoxification in *Aspergillus nidulans*. *Biochem J*.
- Szappanos H, Szigeti GP, Pal B, Rusznak Z, Szucs G, Rajnavolgyi E, Balla J, Balla G, Nagy E, Leiter E, Pocsi I, Marx F, Csernoch L (2005) The *Penicillium chrysogenum*-derived antifungal peptide shows no toxic effects on mammalian cells in the intended therapeutic concentration. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 371: 122-132.

- Szappanos H, Szigeti GP, Pal B, Rusznak Z, Szucs G, Rajnavolgyi E, Balla J, Balla G, Nagy E, Leiter E, Pocsi I, Hagen S, Meyer V, Csernoch L (2006) The antifungal protein AFP secreted by *Aspergillus giganteus* does not cause detrimental effects on certain mammalian cells. *Peptides* 27: 1717-1725.
- Theis T, Wedde M, Meyer V, Stahl U (2003) The antifungal protein from *Aspergillus giganteus* causes membrane permeabilization. *Antimicrob Agents Chemother* 47: 588-593.
- Theis T, Marx F, Salvenmoser W, Stahl U, Meyer V (2005) New insights into the target site and mode of action of the antifungal protein of *Aspergillus giganteus*. *Res Microbiol* 156: 47-56.
- Tressl R, Wondrak GT, Garbe LA, Kruger RP, Rewicki D (1998) Pentoses and hexoses as sources of new melanoidin-like Maillard polymers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46: 1765-1776.
- Tressl R, Garbe LA, Lange H (2000) Biosynthesis of optically active lactones by lipoyxygenase/peroxyxygenase catalyzed pathways in yeast. *Frontiers of Flavour Science*: 383-388, 602.
- Vila L, Lacadena V, Fontanet P, Martinez del Pozo A, San Segundo B (2001) A protein from the mold *Aspergillus giganteus* is a potent inhibitor of fungal plant pathogens. *Mol Plant Microbe Interact* 14: 1327-1331.
- Wang L, Ridgway D, Gu T, Moo-Young M (2005) Bioprocessing strategies to improve heterologous protein production in filamentous fungal fermentations. *Biotechnology Advances* 23: 115-129.
- Wen H-W, Borejsza-Wysocki W, DeCory TR, Durst RA (2007) Peanut Allergy, Peanut Allergens, and Methods for the Detection of Peanut Contamination in Food Products. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 6: 47-58.
- Wolf-Hall CE (2007) Mold and mycotoxin problems encountered during malting and brewing. *Int J Food Microbiol* 119: 89-94.