

Entwicklung eines sensitiven Nachweises von hitzestabilen Peptidasen in Milch

– Anschluss zu AiF 16588 N –

Koordinierung:	Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI), Bonn
Forschungsstelle:	Universität Hohenheim Institut für Lebensmittelwissenschaft und Biotechnologie FG Biotechnologie und Enzymwissenschaft Prof. Dr. Lutz Fischer
Industriegruppe:	Milchindustrie-Verband e.V. (MIV), Berlin
	Projektkoordinator: Dr. Christopher Guyot Müller Service GmbH, Freising
Laufzeit:	2017 - 2020
Zuwendungssumme:	€ 250.010,-- (Förderung durch BMWi via AiF/FEI)

Ausgangssituation:

Während der Kühlung von Rohmilch bis zur Prozessierung ist bekannt, dass sich psychrotolerante Mikroorganismen vermehren können. Einige dieser Mikroorganismen, z.B. jene der Gattung *Pseudomonas*, sind in der Lage, hitzestabile Endopeptidasen zu sekretieren, die im Gegensatz zu den Mikroorganismen die thermische Prozessierung der Milch aktiv überstehen können. Nach unvollständiger Inaktivierung der Endopeptidasen sind selbst geringe Mengen im Endprodukt ausreichend, um zu Produktveränderungen während langen Haltbarkeitsperioden zu führen. Diese Produktveränderungen äußern sich sowohl in der Gelierung der Milchproteine als auch in der Bildung eines bitteren Geschmacks. Solch geringe Endopeptidaseaktivitäten sind mit den kommerziell erhältlichen Methoden zur Endopeptidaseaktivitätsbestimmung nicht quantifizierbar.

Ziel des Forschungsvorhabens war es deshalb, aufbauend auf den Ergebnissen des IGF-Projekts AiF 16588 N eine sensitive und spezifische analytische Methode für den quantitativen Nachweis hitzestabiler Endopeptidasen in Milch zu entwickeln. Dabei wurden zwei verschiedene Lösungswege ver-

folgt: A) basierend auf der Substratselektivität unter Verwendung spezifischer Marker-substrate, B) anhand der Sequenzhomologie unter Verwendung spezifischer Antikörper. Die entwickelten Methoden sollten die Möglichkeit geben, betroffene Rohmilch zu identifizieren und dementsprechend zu Produkten mit geringer Haltbarkeitsperiode zu verarbeiten.

Forschungsergebnis:

Anhand der Sequenzhomologie der sekretierten Endopeptidasen wurden acht *Pseudomonas*-Spezies zur Produktion dieser Endopeptidasen ausgewählt. Die Endopeptidasen wurden unter geeigneten Bedingungen (100 % (v/v) Milch (0,3 % Fett), 20 °C) produziert und mittels FPLC aus dem Kulturüberstand gereinigt. Nach einer UHT-Erhitung von Milch waren diese mit 25-40 % der initialen Endopeptidaseaktivität aktiv.

Für beide Lösungsansätze (A und B) wurde eine einfache Aufarbeitungsmethode für Milch entwickelt, um den Einfluss von Störsubstanzen zu minimieren und die enthaltene Endopeptidaseaktivität zu konzentrieren. Im ersten Schritt wurde die Probe auf pH

5 angesäuert, um die Caseinmicellen auszufällen. Um hitzelabile Endopeptidasen zu inaktivieren, wurde die Probe für eine Minute auf 95 °C erhitzt. Anschließend erfolgte die Konzentrierung der Probe durch hydrophobe Interaktionschromatographie mittels Gravity-flow-Zentrifugenröhrchen. Die Wiederfindung der Endopeptidaseaktivität lag bei 43 %.

Für Lösungsansatz A wurde zuerst die Substratelektivität der Endopeptidasen durch Hydrolyse verschiedener Peptide/Proteine mit bekannter Aminosäuresequenz (z. B. β -Casein, BSA) und nachfolgender massenspektrometrischer Analytik der Peptide bestimmt. Dabei wurde eine breite Substratelektivität der Endopeptidasen mit einer Präferenz für hydrophile, basische Aminosäuren (z. B. Arginin, Lysin, Glutaminsäure) an P1-Position der Peptidbindung und unpolare, aliphatische Aminosäuren (z. B. Valin, Leucin, Asparaginsäure) an P1'-Position ermittelt. Anhand der Ergebnisse der Substratelektivität ließen sich die Endopeptidasen in zwei Gruppen abhängig von deren Sequenzhomologie einteilen. So bevorzugte eine Gruppe Arginin an P1-Position (Sequenzhomologie innerhalb der Gruppe 86-98 %), während die zweite Gruppe (Sequenzhomologie 91 %) Alanin bevorzugte. Die beiden Gruppen wiesen eine Sequenzhomologie zwischen 66-68 % auf. Durch die Verwendung von chromogenen Para-Nitroanilin-Substraten oder fluorometrisch aktiven Substanzen konnte gegenüber dem bisher verwendeten Na-Caseinat/OPA-Nachweis keine Sensitivitätssteigerung erreicht werden. Da es sich hierbei um einen universellen Endopeptidasenachweis handelte, war die Methode nicht selektiv. Daher war der Erhitzungsschritt für die Aufarbeitung der Milch unerlässlich, um den Einfluss hitzelabiler Endopeptidasen, wie z. B. Plasmin, auszuschließen.

Für Lösungsansatz B wurden auf Basis von zwei Endopeptidasen (*P. lactis* und *P. weihenstephanensis*, Sequenzhomologie 68 %) polyklonale Antikörper produziert. Die Antikörper interagierten mit den Endopeptidasen weiterer Pseudomonas-Spezies abhängig von deren Sequenzhomologie. Milchkomponenten wurden nicht durch die Antikörper detektiert. Die verwendeten Antikörper waren spezifisch für Pseudomonas-Endopeptidasen, konnten allerdings auch die Endopeptidase von *Serratia marescens*, die eine Sequenzhomologie von 51 % zu Pseudomonas-

Endopeptidasen besaß, nachweisen. Endopeptidasen weiterer Milchkontaminanten, wie z.B. Microbacterium oder Stenotrophomonas, oder milchendogene Peptidasen wurden durch die Antikörper nicht erkannt.

Des Weiteren wurde ein indirekter ELISA mit einer Durchführungsdauer von 6-7 h, der eine hohe Präzision und Reproduzierbarkeit aufwies, entwickelt. Die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen lagen bei 21,0 bzw. 25,7 ng_{Protein} mL⁻¹. Um die Sensitivität zu erhöhen, sollte ein indirekter Sandwich-ELISA entwickelt werden. Aufgrund der Verwendung polyklonaler Antikörper, die mehrere Epitope erkannten, traten Kreuzreaktionen der Antikörper untereinander auf. Somit konnte kein verlässlicher Sandwich-ELISA entwickelt werden. Als Alternative wurde ein indirekter, kompetitiver ELISA entwickelt, der als Ergänzung zum indirekten ELISA eingesetzt werden kann. Durch das umgekehrt proportionale Verhalten von Antigenkonzentration und Signalstärke kann diese Methode bei geringen Antigenkonzentrationen verwendet werden, um falsch-positive Ergebnisse auszuschließen.

Als kritische Endopeptidaseaktivität, die bei 20 °C innerhalb von 3-6 Monaten zur Destabilisierung von Milchprodukten führen konnte, wurde $\geq 0,1$ pkat_{Na-Caseinat/OPA} mL⁻¹ identifiziert. Bei erhöhten Temperaturen könnte jedoch schon eine geringere Endopeptidaseaktivität zur Destabilisierung des Milchprodukts führen. Um diese Aktivitäten verlässlich nachweisen zu können, muss die Sensitivität der Detektionsmethoden mindestens um das 10fache gesteigert werden.

Wirtschaftliche Bedeutung:

In Deutschland werden in 140 Unternehmen jährlich ca. 30 Mio. t Rohmilch verarbeitet und ein Umsatz von 25 Mrd. € generiert. Der Export von Erzeugnissen ins Ausland macht dabei 25 % aus. Durch Transport und Lagerung der Milchprodukte in klimatisch wärmere Länder steigen die Anforderungen an deren Mindesthaltbarkeit. Die Produzenten müssen über die gesamte Logistik- und Vertriebskette der internationalen Märkte sicherstellen, dass ihre Produkte bis zum Ende der angegebenen Mindesthaltbarkeit keine negativen Veränderungen in der Textur oder Sensorik aufweisen, ansonsten sind Gewinn-

einbußen durch Regresspflichten gegenüber den Geschäftspartnern und Imageschäden für die Unternehmen zu erwarten. Hitze-stabile Endopeptidasen stellen dabei ein potenzielles Risiko für die Einhaltung von Haltbarkeitsgarantien dar. Rohmilch, die aufgrund von technischen Produktionsstörungen oder schwankenden Lagerzeiten (Bestandsplanung, Wochenendbetrieb) länger als drei Tage gelagert wurde, sollte routinemäßig auf hitzestabile Endopeptidasen untersucht werden. Dies würde den Unternehmen eine größere Sicherheit geben, ihre Haltbarkeitszusagen einhalten zu können.

Die Ergebnisse dieses Projektes geben erste Anhaltspunkte über die Möglichkeiten zur sensitiven Detektion hitzestabiler Endopeptidasen. Die entwickelte Aufarbeitungsmethode zeichnet sich durch ihre einfache Umsetzbarkeit ohne die Verwendung komplexer Geräte aus und kann einfach in den Probeneingang integriert werden. Durch die Vermeidung von FPLC-Systemen wird außerdem eine parallele Aufarbeitung mehrerer Proben möglich. Der entwickelte ELISA setzt die Analysedauer des zuvor verwendeten Na-Caseinat/OPA-Assays von 96 h auf 7 h herab und kann daher zu einer Verbesserung führen. In Hinblick auf die ermittelte kritische Endopeptidaseaktivität, die zur Produktveränderung führen könnte, muss die Sensitivität der Nachweismethode allerdings nochmals gesteigert werden, um eine verlässliche Aussage über die getestete Milch zu geben.

Publikationen (Auswahl):

1. FEI-Schlussbericht 2020.
2. Volk, V., Glück, C., Leptihn, S., Ewert, J., Stressler, T. & Fischer, L.: Two heat resistant endopeptidases from *Pseudo-monas* species with destabilizing potential during milk storage. *J. Agric. Food Chem.* 67, 905-915. DOI: 10.1021/acs.jafc.8b04802 (2019).
3. Stressler, T., Volk, V., Glück, C., Ewert, J., Merz, M. & Fischer, L.: Entwicklung einer sensitiven Nachweismethode für hitzestabile Peptidasen in Milch zur Verbesserung der Produktionssicherheit. *DMW, Milchwirt.* 8, 343-358 (2017).

Der Schlussbericht ist für die interessierte Öffentlichkeit bei der Forschungsstelle abzurufen.

Weiteres Informationsmaterial:

Universität Hohenheim
Institut für Lebensmittelwissenschaft und Biotechnologie
FG Biotechnologie und Enzymwissenschaft
Garbenstraße 25, 70599 Stuttgart
Tel.: +49 711 459-22311
Fax: +49 711 459-24267
E-Mail: lfischer@uni-hohenheim.de

Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI)
Godesberger Allee 125, 53175 Bonn
Tel.: +49 228 3079699-0
Fax: +49 228 3079699-9
E-Mail: fei@fei-bonn.de

Gefördert durch:



Bundesministerium
für Wirtschaft
und Energie

aufgrund eines Beschlusses
des Deutschen Bundestages

Das IGF-Vorhaben **AiF 18618 N** der Forschungsvereinigung Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI), Godesberger Allee 125, 53175 Bonn, wurde über die AiF im Rahmen des Programms zur Förderung der Industriellen Gemeinschaftsforschung (IGF) vom Bundesministerium für Wirtschaft und Energie aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages gefördert.