

MIKROBIELLE PRODUKTION VON FUNKTIONELLEM GLUTEN

VORBEREITUNG ZUR MACHBARKEITSSTUDIE

Christine M. Leufken, Mareike E. Dirks-Hofmeister

Lebensmittelbiotechnologie, Fakultät Agrarwissenschaften und Landschaftsarchitektur, Hochschule Osnabrück

DEFINITION
„Die Präzisionsfermentation kombiniert den Prozess der traditionellen Fermentation mit den neuesten Fortschritten in der **Biotechnologie**, um eine Verbindung von Interesse, wie z. B. ein Protein, ein Geschmacksmolekül, ein Vitamin, ein Pigment oder ein Fett, effizient herzustellen.“ [1]

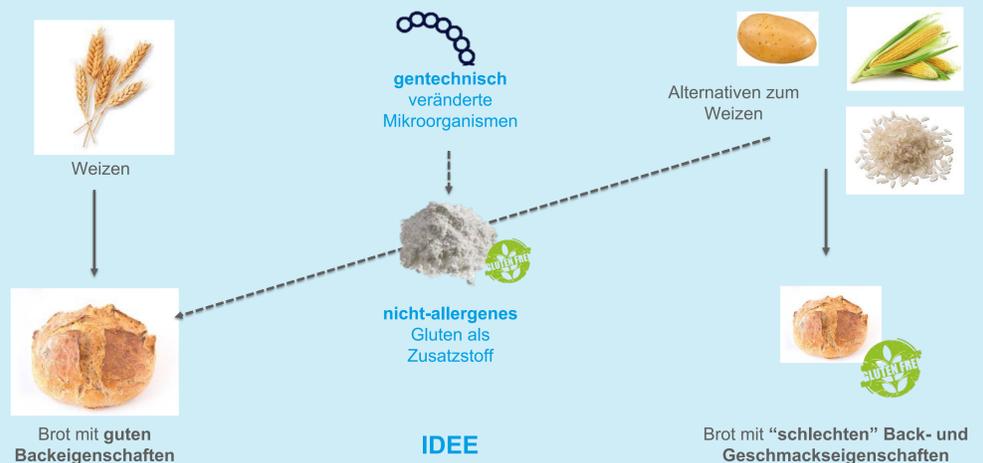
Idee: Nicht-allergenes Gluten als Lebensmittelzusatzstoff

Können wir Gluten mit Hilfe einer **Präzisionsfermentation** produzieren und biotechnologisch so verändern, dass es **nicht mehr allergen** wirkt, aber trotzdem noch alle funktionellen **Eigenschaften als Klebereiweiß behält**?

Gluten – was ist das?

Gluten ist ein Gemisch aus **Proteinen**. Es wird umgangssprachlich auch Klebereiweiß genannt, weil es hauptverantwortlich für die **Backeigenschaften** von Teigen ist. Beim Knetvorgang vernetzen sich die einzelnen Proteine (Gliadine und Glutenine) und bilden ein Gerüst, welches dem Teig Elastizität und Gärstabilität vermittelt und so dafür sorgt, dass Backwaren aufgehen und luftig werden. Auch beim Geschmack des fertigen Backproduktes spielen sie eine Rolle. [2]

Gluten kommt unter anderem in Weizen, Roggen, Gerste, Dinkel oder Hafer vor. Die Krankheit **Zöliakie** beschreibt die Unverträglichkeit von Gluten. Gluten ist schwer verdaulich, so dass bestimmte Bruchstücke der Glutenproteine als Allergene wirken. Bei Fortschritt der Krankheit kommt es zusätzlich zu einer Autoimmunreaktion im Dünndarm. Zöliakiepatienten benötigen eine **glutenfreie Diät** was zwangsläufig mit dem Verzicht der funktionellen Vorteile von Gluten in Backwaren einhergeht.



Produktion von Gluteninen und Gliadinen in *Escherichia coli*

Welche Proteine sollen produziert werden?

Weizengluten besteht aus α , γ , ω **Gliadinen** und *low molecular weight* (LMW) bzw. *high molecular weight* (HMW) **Gluteninen** (s. Abb. 1).

In Anlehnung an Jiang *et al.* 2015 haben wir zwei kodierende Gene für ein LMW Glutenin ausgewählt, sowie ein α - und ein γ -Gliadin. Diese wurden in ihrer Sequenz für *E. coli* optimiert und in einen **Expressionsvektor** (pET-System mit N- bzw. C-terminalen Strep2-Tag) kloniert (s. Abb. 2).

Ist eine Produktion in Bakterien machbar?

Eine Produktion von Glutenproteinen im Labororganismus *E. coli* wurde bereits beschrieben. [4] Deshalb haben wir zuerst auch ***E. coli* als Produktionsstamm** getestet, mit den klonierten Vektoren transformiert und dann so kultiviert, dass die Proteine produziert werden sollten. Getestet wurden verschiedene kommerzielle Bakterienstämme (BL21, Rosetta™ und Origami™) und Kultivierungstemperaturen (30°C und 16°C) in Autoinduktionsmedium. [5]

Die **Ausbeuten** an Gluteninproteinen waren aber immer **nur sehr gering** und die Proteine meist **unlöslich** (s. Abb. 3), so dass weitere Optimierungen erforderlich wären.

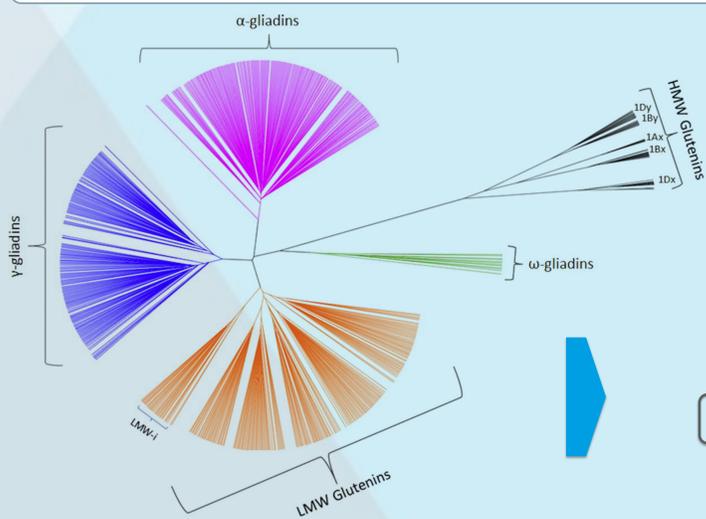


Abb. 1: Verwandtschaftsgruppen der Weizenglutene (α -, γ -, ω -Gliadine und LMW und HMW Glutenine). [3]

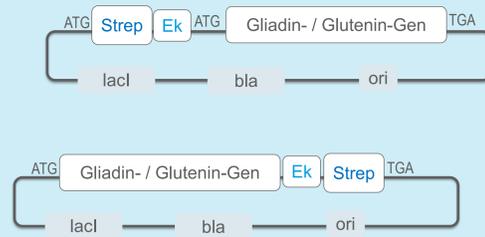


Abb. 2: Schema der Genkonstrukte im pET-System. ATG, Startcodon; TGA, Stopcodon; Ek, Enterokinase-Schnittstelle; Strep, Strep2-Tag.

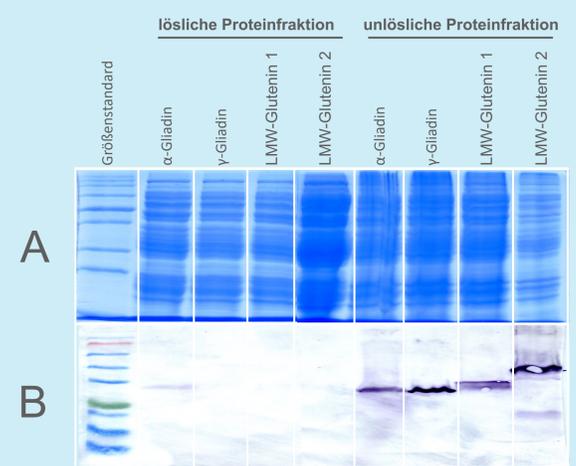


Abb. 3: Auswahl einiger produzierte Glutenproteine in *E. coli*. (A) Mittels einer reduzierenden SDS-PAGE wurden alle Proteine aus den *E. coli* Zellen nach ihrer Größe aufgetrennt und blau angefärbt. (B) Anschließend wurde mit Hilfe eines Western-Blots und spezifischen Antikörpern für den Strep-Tag, die Gliadine und Glutenine gezielt markiert. Aufgetragen sind hier nur Proteinextrakte von *E. coli* Kulturen des Stamms BL21, der bei 30°C kultiviert wurde mit Konstrukten mit N-terminalem Strep-Tag.

Fazit

Andere Mikroorganismen sollten getestet werden

Die ersten Ergebnisse weisen darauf hin, dass eine Präzisionsfermentation mit *E. coli* nicht wirtschaftlich wäre. Zwar könnten noch einige **Optimierungsversuche** unternommen werden, doch erscheint es sinnvoller direkt einen **anderen Mikroorganismus** zu testen. Anbieten würde sich hier z.B. der filamentöse Pilz *Aspergillus niger*.

Weitere Arbeiten könnten dann klären, ob das mikrobiell produzierten Gluten die gleichen Funktionen erfüllt, wie das native Proteingemisch und welche Bereiche der Proteine wie verändert werden müssten, um eine allergene Wirkung zu verhindern.

Ausblick: Potential für die Pflanzenzüchtung?

Je mehr Wissen über die **Struktur-Funktions-Beziehungen** von Gluteninen und Gliadinen bekannt ist, desto besser könnten sowohl die funktionellen Eigenschaften in Backwaren, als auch die allergene Wirkung gezielt modifiziert werden.

Zukünftig könnte das Wissen z.B. auch auf die **Pflanzenzüchtung** übertragen werden: es gibt bereits erste „glutenfreie“ Weizensorten ohne die immunodominanten α -Gliadine. [6] Diese Sorten könnten durch moderne *Genome Editing* Methoden zukünftig noch besser werden, wenn „nur“ die allergenen Bereiche der Gliadine entfernt würden.

[1] Definition der „Precision Fermentation Alliance“ vom Februar 2024

[2] Scherf KA, Brockow K, Biedermann T, Koehler P, Wieser H (2016): Wheat-dependent exercise-induced anaphylaxis. *Clin Exp Allergy* 46, 10–20, doi: 10.1111/cea.12640.

[3] Bromilow S, Gethings LA, Bucklev M, Bromley M, Shewry PR, Langridge JI, Clare Mills EN (2017): A curated gluten protein sequence database to support development of proteomics methods for determination of gluten in gluten-free foods. *Journal of Proteomics* 163, 67–75, doi: 10.1016/j.jprot.2017.03.026

[4] Jiang P, Wang K, Gao J, Zheng X, Feng J, Ma W, Yan Y, Li X (2015): High-level expression of LMW-GS and α -gliadin genes promoted by the expressed tag sequence of 5' end in *Escherichia coli*. *Protein Expr. Purif.* 105, 54–60, doi: 10.1016/j.pep.2014.09.016.

[5] Studier FW (2005): Protein production by auto-induction in high density shaking cultures. *Protein Expr. Purif.* 41, 207–234, doi: 10.1016/j.pep.2005.01.016.

[6] García-Molina MD, Giménez MJ, Sánchez-León S, Barro F (2019): Gluten Free Wheat: Are We There? *Nutrients* 11, 487, doi: 10.3390/nu11030487.