

Freisetzung von salzgeschmacksverstärkenden Peptiden aus Milch- und Eiklarproteinen mittels Peptidasen aus Basidiomyceten

Der Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

zur Erlangung des Grades

Doktorin der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigte Dissertation

von

M. Sc. Lisa Harth

geboren am 18.06.1987 in Achim

2016

Referent: Prof. Dr. rer. nat. Dr.-Ing. habil. Ralf G. Berger

Korreferentin: Prof. Dr.-Ing. Brita M. Watkinson

Tag der Promotion: 10.05.2016

Danksagung

Großer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dr. Ralf G. Berger für die Überlassung des interessanten Themas und die Bereitstellung der ausgezeichneten Arbeitsbedingungen. Danke für die anregenden Diskussionen und die konstruktive Kritik, die mich und meine Arbeit vorangebracht haben.

Frau Dr. Diana Linke und Herrn PD Dr. Ulrich Krings danke ich für die Betreuung meiner Arbeit. Sie standen mir stets hilfsbereit mit fachkundigem Rat zur Seite. Frau Linke gilt Dank für die langjährige Begleitung seit meinem Studium, für ihre kreativen Anregungen und ihren Optimismus. Herrn Krings danke ich insbesondere für die Hilfestellungen zur LC-MS/MS.

Frau Prof. Dr. Watkinson (Institut für Lebensmittelwissenschaft und Humanernährung, Leibniz Universität Hannover) danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferats und Frau Prof. Dr. Rinas (Institut für Technische Chemie, Leibniz Universität Hannover) für die Bereitschaft, den Prüfungsvorsitz meiner Disputation zu führen.

Dem Forschungskreis für Ernährungsindustrie (FEI) danke ich für die gewährte finanzielle Unterstützung in meinem Projekt.

Ferner gilt mein Dank Frau Ulrike Krahl (Lehrstuhl für Lebensmittelchemie und molekulare Sensorik, Technische Universität München) für die Durchführung der LC-MS/MS zur Quantifizierung der L-Arginyl-Dipeptide. Ich danke ihr und ihren Kolleginnen und Kollegen des geschulten Sensorikpanels für die Evaluierung meiner Hydrolysate.

Ich bedanke mich bei allen Probanden aus dem Institut für Lebensmittelchemie für das Interesse und die rege Teilnahme an diversen Sensorikexperimenten. Außerdem danke ich allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Lebensmittelchemie für die Zusammenarbeit, die Hilfsbereitschaft, die sehr gute Arbeitsatmosphäre und die gemeinsam verbrachte Zeit.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern Ursula Schiller-Harth und Wolfgang Harth, die mir mein Studium ermöglicht und mich stets unterstützt haben.

Vorbemerkungen

Diese Arbeit wurden im Rahmen des Forschungsvorhabens „Enzymatische Produktion von salzgeschmacksverstärkenden Peptiden aus Milch- und Eiklarproteinen“ des Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (AiF 16721 N) durchgeführt.

Posterpräsentation:

Harth, L.; Krahl, U.; Linke, D.; Krings, U.; Hofmann, T.; Berger, R. G.: Release of Salt Taste Enhancing Peptides from Milk and Egg White Proteins by Peptidases of Basidiomycota. 34th International Symposium on the Separation of Proteins, Peptides and Polynucleotides, Würzburg, 05.-07. November 2014

Zusammenfassung

In den letzten Jahren wurden salzgeschmacksverstärkende Peptide wie L-Arginyl-Dipeptide in Proteinhydrolysaten identifiziert. Sie eröffnen eine Möglichkeit Speisesalz in Lebensmitteln zu reduzieren, ohne gleichzeitig Einbußen im Geschmack hinnehmen zu müssen. Um die Entwicklung in diesem Gebiet voran zu bringen, befasste sich die vorliegende Arbeit mit der Freisetzung salzgeschmacksverstärkender Peptide mittels Peptidasen aus Basidiomyceten. Als Modellsubstrate wurden Casein und Lysozym verwendet. Das angestrebte Anwendungsgebiet waren Milchprodukte wie Käse.

In einem Screening nach extrazellulären Peptidasen hatten sechs von 22 Basidiomyceten hohe azocaseinolytische Aktivität ($> 3 \text{ kaU mL}^{-1}$): *Grifola frondosa*, *Pleurotus eryngii*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Pleurotus ostreatus* var. *florida*, *Schizophyllum commune* und *Trametes versicolor*. Durch Variation der Substrate (hauptsächlich Gluten, Erbsen-, Reis- und Sojaproteine) wurden die Peptidaseaktivitäten weiter erhöht. Die höchste Aktivität ($> 15 \text{ kaU mL}^{-1}$) besaß der essbare Basidiomycet *T. versicolor* kultiviert in Minimalmedium mit Sojaproteinen. Die Kulturüberstände der sechs Basidiomyceten wurden ultrafiltriert, wodurch ihre extrazellulären Peptidasen als komplexe Gemische von Endo- und Exoenzymen im semi-präparativen Maßstab gewonnen wurden. Daraus wurden insgesamt 30 Peptidasen identifiziert und eine Übersicht der Peptidasefamilien und Spaltspezifitäten erstellt. Alle Peptidasegemische waren in einem breiten und leicht sauren pH-Bereich hoch aktiv. Zudem waren die Peptidasen von *T. versicolor* bei pH 4 bis 6 besonders stabil, sodass deren Einsatz auch während der Verarbeitung von Milchprodukten realisierbar wäre.

Mit den sechs Peptidasegemischen wurden die Modellsubstrate Casein und Lysozym vergleichend hydrolysiert. Besonders zu Beginn stieg der Hydrolysegrad und lag nach 24 Stunden bei 14 bis 29 %. Es entstanden u. a. niedermolekulare Hydrolyseprodukte wie Aminosäuren und Dipeptide. Obwohl kein Peptidasegemisch eine arginylspezifische Peptidase enthielt, wurden salzgeschmacksverstärkende L-Arginyl-Dipeptide frei. Generell wurden aus Lysozym mindestens 20fach höhere Gehalte freigesetzt (43 bis $75 \mu\text{mol g}^{-1}$) als aus Casein. Mit *P. chrysosporium* und *T. versicolor* wurden in der Lysozymhydrolyse rund 10 % der maximal möglichen Ausbeuten an L-Arginyl-Dipeptiden erzielt.

In ersten Applikationsstudien wurden die Lysozymhydrolysate sowohl in eine synthetische Käsematrix als auch in verdünnten Magerquark (jeweils mit 50 mM NaCl) eingearbeitet. Die Hydrolysate von *G. frondosa* und *T. versicolor* hatten einen salzgeschmacksverstärkenden Effekt. Für *T. versicolor* wurde außerdem gezeigt, dass bei erhöhten Gehalten des Hydrolysats (2,5 % (w/v)) dessen süßer Eigengeschmack dominierte, während bei niedrigeren Gehalten (0,1 bis 0,5 % (w/v)) der salzmodulierende Effekt wahrgenommen wurde.

Schlagwörter: Basidiomycota, Peptidasen, Salzgeschmacksverstärker, L-Arginyl-Dipeptide

Abstract

Some peptides, such as L-arginyl dipeptides, have been identified as salt taste enhancers in protein hydrolysates, thus opening the possibility to reduce the sodium chloride content of food without compromising palatability. Peptidases of basidiomycetes were investigated for their ability to release salt taste enhancing peptides from the model substrates casein and lysozyme. Dairy products such as cheese were the intended area of application.

Screening extracellular peptidases of basidiomycetes revealed six out of 22 species with high azo-caseinolytic activity ($> 3 \text{ kaU mL}^{-1}$): *Grifola frondosa*, *Pleurotus eryngii*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Pleurotus ostreatus* var. *florida*, *Schizophyllum commune* und *Trametes versicolor*. Their secretion of peptidases was increased by different substrates (mainly gluten, pea, rice, and soy proteins). Overall, the highest peptidolytic activity ($> 15 \text{ kaU mL}^{-1}$) was observed for *T. versicolor* cultivated in minimal medium containing soy proteins. The culture supernatants of the six basidiomycetes were ultrafiltrated, and their extracellular peptidases obtained as complex endo- and exoenzyme sets on a semi-preparative scale. In total, 30 peptidases were identified, and an overview of families and cleavage specificities is given. All peptidase mixtures were highly active in a wide and slightly acidic pH range. *T. versicolor* peptidases were additionally most stable at pH 4 to 6 and should, thus, be applicable in dairy products (even during food processing).

As model substrates casein and lysozyme were hydrolysed by the six peptidase mixtures. The degree of hydrolysis increased and was between 14 to 29 % after 24 hours. Low molecular mass products of peptidolysis, such as amino acids and dipeptides were liberated. Though no peptidase mixture contained an arginyl specific peptidase, all released L-arginyl dipeptides. At least 20 times higher amounts of L-arginyl dipeptides were released from lysozyme ($43\text{-}75 \mu\text{mol g}^{-1}$) compared to casein. Lysozyme hydrolysates prepared by peptidases of *P. chrysosporium* and *T. versicolor* showed about 10 % of the theoretical yield.

Lysozyme hydrolysates were added to a synthetic cheese matrix and to diluted low fat curd cheese (each with 50 mM NaCl) in a first application study. The hydrolysates of *G. frondosa* and *T. versicolor* exhibited a salt taste enhancing effect. A sweet natural taste of the *T. versicolor* hydrolysate dominated at higher hydrolysate concentrations (2.5 % (w/v)), while lower levels (0.1 to 0.5 % (w/v)) showed salt taste modulating activity.

Keywords:

Basidiomycota, peptidases, salt taste enhancers, L-arginyl dipeptides

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	I
Abstract	II
Inhaltsverzeichnis	III
Abkürzungsverzeichnis	VI
1 Einleitung	1
1.1 Speisesalz in Lebensmitteln	1
1.2 Gesundheitliche Beeinträchtigungen durch Speisesalz	2
1.3 Strategien zur Senkung des Speisesalzgehalts in Lebensmitteln	4
1.3.1 Veränderung der Lebensmittelstrukturen	5
1.3.2 Salzassoziierte Riechstoffe	5
1.3.3 Speisesalzsubstitute	6
1.3.4 Salzgeschmacksverstärker	7
1.4 Gewinnung von Dipeptiden.....	10
1.5 Proteinhydrolyse in der Lebensmittelindustrie.....	12
1.6 Peptidasen.....	13
1.7 Peptidasen aus Basidiomyceten.....	15
1.8 Zielsetzung der Arbeit	17
2 Material und Methoden	18
2.1 Chemikalien.....	18
2.2 Allgemeine Geräte.....	19
2.3 Kultivierung.....	21
2.3.1 Basidiomycetenstämme	21
2.3.2 Nährmedien	22
2.3.3 Kulturführung	24
2.4 Proteinchemische Assays	25
2.4.1 Proteinbestimmung nach Bradford	25
2.4.2 Peptidase-Assay mit Azocasein.....	25
2.4.3 Peptidase-Assay mit <i>para</i> -Nitroanilid-Substraten.....	25
2.4.4 Peptidase-Assay mit Hippuryl-Arginin	26
2.4.5 Untersuchung der Peptidaseaktivität in Abhängigkeit des pH-Werts	26

2.4.6	Untersuchung der Peptidastabilität in Abhängigkeit des pH-Werts.....	26
2.4.7	Inhibierungsstudien	27
2.5	Gelelektrophoretische Verfahren	27
2.5.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	27
2.5.2	Zymografie	29
2.5.3	Analytische isoelektrische Fokussierung (IEF)	30
2.6	Flüssigchromatografische Methoden (FPLC) zur Proteinreinigung	31
2.6.1	Affinitätschromatografie (AC)	31
2.6.2	Größenausschlusschromatografie (SEC).....	32
2.6.3	Ionenaustauschchromatografie (IEX).....	32
2.7	Hydrolyseexperimente.....	33
2.8	Untersuchung der zunehmenden Löslichkeit des Caseins	33
2.9	Bestimmung der Aminosäuren und des Hydrolysegrades	33
2.10	Bestimmung der L-Arginyl-Dipeptide.....	35
2.11	Herstellung einer Käsematrix	36
2.12	Humansensorische Experimente	36
2.13	Proteinsequenzierung mittels ESI-MS/MS	38
3	Ergebnisse	40
3.1	Screening nach Peptidasen aus Basidiomyceten	40
3.1.1	Allgemeine Peptidaseaktivität	40
3.1.2	Arginylspezifische Peptidaseaktivität.....	48
3.2	Gewinnung und Charakterisierung komplexer Peptidasegemische	50
3.2.1	Visualisierung von Peptidasen mittels Zymografie.....	50
3.2.2	Einfluss des pH-Werts auf die Peptidasegemische.....	51
3.2.3	Analyse der Substratspezifität	53
3.3	Hydrolyseexperimente zur Freisetzung salzgeschmacksverstärkender Peptide....	55
3.3.1	Gelelektrophoretische Analysen der Hydrolysate	55
3.3.2	Effekt der Peptidolyse auf die Löslichkeit des Caseins.....	56
3.3.3	Hydrolysegrade der Casein- und Lysozymhydrolyse.....	57
3.3.4	Freisetzung von L-Aminosäuren.....	58
3.3.5	Freisetzung von L-Arginyl-Dipeptiden.....	59
3.3.6	Humansensorische Untersuchungen der Lysozymhydrolysate	66
3.4	Identifizierung der Peptidasen.....	69
3.4.1	Partielle Reinigung der Peptidasegemische.....	70

3.4.2	Isoelektrische Fokussierung der Peptidasen von <i>T. versicolor</i>	73
3.4.3	Klassifizierung der identifizierten Peptidasen	74
4	Diskussion	76
4.1	Kultivierung von Basidiomyceten zur Gewinnung von Peptidasen.....	76
4.2	Arginin-Affinitätschromatografie zur Isolierung von Peptidasen.....	80
4.3	Hydrolyse von Casein und Lysozym mit Peptidasen aus Basidiomyceten.....	82
4.3.1	Peptidasegemische aus Basidiomyceten.....	82
4.3.2	Peptidolyse von Casein und Lysozym.....	85
4.3.3	Sensorische Evaluierung der Lysozymhydrolysate	88
4.3.4	Identifizierte Peptidasen der Basidiomyceten	91
5	Ausblick	96
6	Literaturverzeichnis	99
7	Anhang	120
7.1	Affinitätschromatografische Reinigung	120
7.2	Freisetzung von L-Arginyl-Dipeptiden.....	122
7.2.1	Berechnung der maximalen Ausbeuten an L-Arginyl-Dipeptiden	122
7.2.2	Enzymatische Freisetzung von L-Arginyl-Dipeptiden	124
7.3	Identifizierung von Peptidasen.....	125
	Lebenslauf	131

Abkürzungsverzeichnis

α	Irrtumswahrscheinlichkeit
ACN	Acetonitril
APS	Ammoniumperoxodisulfat
aU	<i>Arbitrary Unit</i> (frei definierte Einheit der Peptidaseaktivität)
BIS	Bisacrylamid
Bz	Benzoyl-
CBB	<i>Coomassie Brilliant Blue</i>
ddH ₂ O	Bidestilliertes Wasser
dH ₂ O	Destilliertes Wasser
DH	<i>Degree of Hydrolysis</i> (Hydrolysegrad)
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ESI	Elektronenstoßionisation
EtOH	Ethanol
FPLC	<i>Fast Protein Liquid Chromatography</i>
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HIC	Hydrophobe Interaktionschromatografie
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> (Hochleistungsflüssigkeitschromatografie)
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IEX	<i>Ion Exchange Chromatography</i> (Ionenenaustauschchromatografie)
LC	<i>Liquid Chromatography</i> (Flüssigchromatografie)
MALDI	<i>Matrix-Assisted Laser Desorption / Ionization</i> (Matrix-unterstützte Laser-Desorption / Ionisation)
MeOH	Methanol
MES	2-(N-Morpholino)-ethansulfonsäure
MM	Minimalmedium
MS	Massenspektrometrie
MW	<i>Molecular Weight</i> (molekulare Masse)
MWCO	<i>Molecular Weight Cut-Off</i> (Ausschlussgröße)
<i>m/z</i>	Masse-Ladungsverhältnis

NaAc	Natriumacetat
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
pI	Isoelektrischer Punkt
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
pNA-	<i>para</i> -Nitroanilid-
rpm	<i>Revolutions per Minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i> (Natriumdodecylsulfat)
SEC	<i>Size Exclusion Chromatography</i> (Größenausschlusschromatografie)
SNL	Standardnährlösung
spp.	<i>Species</i> (Arten)
Suc	Succinyl-
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TOF	<i>Time of Flight</i> (Flugzeit)
U	Unit ($\mu\text{mol min}^{-1}$)
UV	Ultraviolett
var.	Variante
v/v	<i>Volume by volume</i> (Volumenkonzentration)
w/v	<i>Weight by volume</i> (Massenkonzentration)
Z	Benzyloxycarbonylschutzgruppe

Die verwendeten Basidiomyceten werden wie in Tabelle 2.3 aufgeführt abgekürzt. Die am meisten verwendeten Basidiomyceten und deren Abkürzungen sind:

Gfr	<i>Grifola frondosa</i>
Pch	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>
Per	<i>Pleurotus eryngii</i>
Posf	<i>Pleurotus ostreatus</i> var. <i>florida</i>
Sco	<i>Schizophyllum commune</i>
Tve	<i>Trametes versicolor</i>

Aminosäuren werden nach dem internationalen Ein- und Dreibuchstabencode abgekürzt.

1 Einleitung

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Freisetzung salzgeschmacksverstärkender Peptide. Einleitend sind die Funktionen von Speisesalz in Lebensmitteln und die Notwendigkeit sowie Strategien zur Reduktion beleuchtet. Außerdem ist das Potenzial von Basidiomyceten zur Peptidolyse in der Lebensmittelindustrie dargestellt. Im Anschluss sind die Ziele dieser Arbeit formuliert.

1.1 Speisesalz in Lebensmitteln

Etwas ist „wie das Salz in der Suppe.“ Mit einer solchen Formulierung beschreibt man einen Bestandteil, der unbedingt zu einer Sache dazu gehört und ohne den diese Sache unvollständig oder uninteressant wäre. Diese Redewendung spiegelt die immense Bedeutung von Speisesalz für Lebensmittel wider.

NaCl hat einen entscheidenden Einfluss auf die Geschmacksqualität von würzigen und deftigen Lebensmitteln. Bei Produkten wie Käse, Suppen, Soßen, Knabberartikeln und Fertiggerichten korreliert die Auswahl und Akzeptanz der Verbraucher mit deren Gehalt an NaCl. Generell werden NaCl-Konzentrationen präferiert, die im Bereich der Blutplasmakonzentration liegen. Dies erklärt sich mit den physiologischen Funktionen von Natrium als wichtigsten Elektrolyten der extrazellulären Körperflüssigkeiten (Daniels und Fluharty, 2004; Wittmann, 1991). NaCl führt neben dem salzigen Geschmack zu einer verringerten Wahrnehmung von Bitterstoffen. Dieser maskierende Effekt verbessert den Geschmack und erhöht zusätzlich die Präferenz für gesalzene Produkte (Breslin und Beauchamp, 1997).

Speisesalz hat neben dem Würzen von Lebensmitteln auch eine wichtige Rolle in der Konservierung. Durch den Einsatz von Salz kann die Haltbarkeit eines Lebensmittels verbessert werden. Es schränkt das Wachstum von unerwünschten Mikroorganismen wie Fäulnisbakterien ein, indem die Wasseraktivität (a_w -Wert) reduziert wird. Dieser Effekt wird z. B. beim Einsalzen und Pökeln von Lebensmitteln genutzt. Gleichzeitig begünstigt Salz das Wachstum von nützlichen Mikroorganismen wie Milchsäurebakterien im Käse (Guinee und Fox, 2004).

Darüber hinaus beeinflusst NaCl die physikochemischen Eigenschaften von Lebensmitteln und trägt zu einer besseren Verarbeitbarkeit sowie Qualität bei. Beispiele dafür sind: die Festigung von Teigen für Backwaren, die Festigung der Textur von Hartkäse, der Erhalt einer knackigen Textur

von eingelegtem Gemüse oder die Regulierung der Fermentation von Gemüse wie Sauerkraut (Brady, 2002; Guinee und Fox, 2004; Miller und Hosoney, 2008).

In Japan und China wird das meiste Salz durch frisch zubereitete Nahrung konsumiert. Im Gegensatz dazu erfolgen in Europa und Nordamerika über 75 % der Natriumaufnahme durch den Genuss verarbeiteter Lebensmittel. Studien zeigten, dass in Großbritannien und den USA das meiste Natriumchlorid über Getreideprodukte und Backwaren aufgenommen wird (Brown *et al.*, 2009). Weitere verarbeitete Lebensmittel mit hohen Salzgehalten sind Produkte wie Käse, Fleisch- und Fischwaren. **Tabelle 1.1** listet die typischen NaCl-Gehalte einiger Lebensmittel auf.

Tabelle 1.1: NaCl-Gehalt verschiedener verarbeiteter Lebensmittel nach Souci *et al.* (2008).

Lebensmittel	NaCl-Gehalt in mg pro 100 g	
Milchprodukte	Speisequark mager	100
	Schmelzkäse (45 oder 60 % Fett i. Tr.)	1200
	Gouda (45 % Fett i. Tr.)	1300
	Parmesan	1500
	Münsterkäse (45 % Fett i. Tr.)	2600
	Feta	3180
Fleischerzeugnisse	Bockwurst	1800
	Gekochter Schinken	2300
	Bündner-Fleisch	5330
Fischerzeugnisse	Marinierter Bismarckhering	2500
	Matjeshering	6400
	Lachs in Öl	10400
Backwaren	Roggenbrot	1278*
	Weißbrot	1350*

i. Tr. – in Trockenmasse, * aus dem Na-Gehalt wurde durch Multiplikation mit 2,5 der NaCl-Gehalt berechnet.

1.2 Gesundheitliche Beeinträchtigungen durch Speisesalz

In der menschlichen Geschichte war Speisesalz lange Zeit ein seltener und wertvoller Rohstoff. Das sogenannte *weiße Gold* war daher eine beliebte Tauschwährung. Heute ist NaCl eine der verbreitetsten und günstigsten Zutaten zum Würzen von Lebensmitteln. Das trug allerdings dazu bei, dass die NaCl-Aufnahme den physiologischen Bedarf mittlerweile weit übersteigt.

Bereits in den 1940er Jahren wurde der Speisesalzkonsum in Zusammenhang mit Bluthochdruck gebracht (Grant und Reischman, 1946; Schroeder *et al.*, 1949). Es folgte eine Vielzahl an epidemiologischen, Interventions-, Migrations-, Tier- und meta-analytischen Studien zu gesundheitlichen Beeinträchtigungen durch NaCl (Cook *et al.*, 2007; Denton *et al.*, 1995; Nagata *et al.*, 2004; Poulter *et al.*, 1990). Inzwischen ist es Konsens, dass ein hoher Speisesalzkonsum für genetisch prädisponierte Personen ein Gesundheitsrisiko darstellt. Durch die Erhöhung des Blutdrucks (Group, 1988; He und MacGregor, 2010) können Herz-Kreislauf- und Nierenerkrankungen folgen (Cianciaruso *et al.*, 1998; Cook *et al.*, 2007). Unabhängig davon kann übermäßiger Konsum von Speisesalz auch direkt zu Schlaganfällen, Linksherzhypertrophie und zur Verschlechterung von Nierenerkrankungen führen (Cianciaruso *et al.*, 1998; Kupari *et al.*, 1994; Nagata *et al.*, 2004; Perry und Beevers, 1992). Diverse Studien legten nahe, dass auch erhöhte Inzidenzen für Osteoporose, Nierensteine, Asthma und Magenkrebs bestehen (Arvaniti *et al.*, 2011; Cappuccio *et al.*, 2000; Kurosawa *et al.*, 2006).

Eine Reduktion des Speisesalzkonsums verringert dagegen den Blutdruck (Graudal *et al.*, 2012; Sacks *et al.*, 2001). Dies gilt besonders für hypertensive, aber auch für normotensive Personen (Sacks *et al.*, 2001). Außerdem sinkt der Blutdruck in Abhängigkeit des Alters, des Geschlechts und der ethnischen Herkunft (Vollmer *et al.*, 2001), was in der Literatur als unterschiedliche Salzsensitivität beschrieben wird. So wird der Blutdruck nicht bei jeder Person durch eine reduzierte NaCl-Aufnahme verringert. Allerdings sind bis zu 50 % aller Patienten mit starker Hypertension empfindlich gegenüber NaCl (Doaei und Gholamalizadeh, 2014) und würden von einer Speisesalzreduktion profitieren.

Die *World Health Organization* (WHO) empfiehlt eine tägliche Aufnahme von weniger als 5 Gramm Natriumchlorid. Dementsprechend müsste der aktuelle Konsum (8 bis 12 Gramm pro Tag) in etwa halbiert werden (World Health Organization, 2012). Analysen zeigten, dass je stärker der Verzehr von Speisesalz reduziert wurde (Testbereich: 3 bis 12 Gramm pro Tag), desto mehr sank der Blutdruck. Einige Studien empfehlen daher eine noch weitere Reduktion auf 3 Gramm Speisesalz pro Tag (He *et al.*, 2013). Entsprechend einer Metaanalyse würde eine solch drastische Begrenzung deutlich weniger Herzinfarkte und Schlaganfälle bedeuten. Es wurden 44.000 bis 92.000 weniger Todesfälle pro Jahr in den USA prognostiziert. Der Studie zufolge würden neben der reduzierten Sterblichkeit auch Einsparungen von 10 bis 24 Milliarden US-Dollar (9 bis 22 Milliarden Euro) im Gesundheitsbereich erzielt werden (Bibbins-Domingo *et al.*, 2010). Auch in Deutschland wäre bereits durch moderate Salzreduktion eine verbesserte Gesundheit zu erwarten, schließlich sind etwa 30 % der Bevölkerung von Hypertonie betroffen (Neuhauser *et al.*, 2013).

1.3 Strategien zur Senkung des Speisesalzgehalts in Lebensmitteln

Heutzutage gibt es weltweit Bestrebungen zur Reduktion der NaCl-Aufnahme. Vor allem in Europa etablierten verschiedene Länder und Organisationen Programme zur Senkung der NaCl-Aufnahme (Webster *et al.*, 2011). Zur öffentlichen Gesundheitsvorsorge beschloss der Rat der Europäischen Union am 08.06.2010 konzertierte Aktionen zur Senkung des Speisesalzverzehrs (Council of the European Union, 2010). In Finnland beispielsweise wurden bereits erfolgreich Programme zur Speisesalzreduktion durchgeführt. Dadurch wurde der Konsum seit 1970 um ein Drittel reduziert (Karppanen und Mervaala, 2006).

Es bestehen zwei grundsätzlich verschiedene Strategien zur Senkung der NaCl-Aufnahme. Zum einen kann bewusst auf NaCl verzichtet werden. Durch Aufklärungsarbeit über die gesundheitlichen Beeinträchtigungen übermäßigen Speisesalzkonsums sollen Verbraucher sensibilisiert werden. Zum anderen sind reduzierte NaCl-Gehalte verarbeiteter Lebensmittel bei gleichbleibender Geschmacksqualität und Verbraucherakzeptanz angestrebt. In **Abbildung 1.1** ist eine Übersicht möglicher Strategien zur Reduktion der NaCl-Aufnahme aufgelistet. Nachfolgend werden die Ansätze zur NaCl-Reduktion unter Erhalt des Salzgeschmacks näher aufgezeigt.

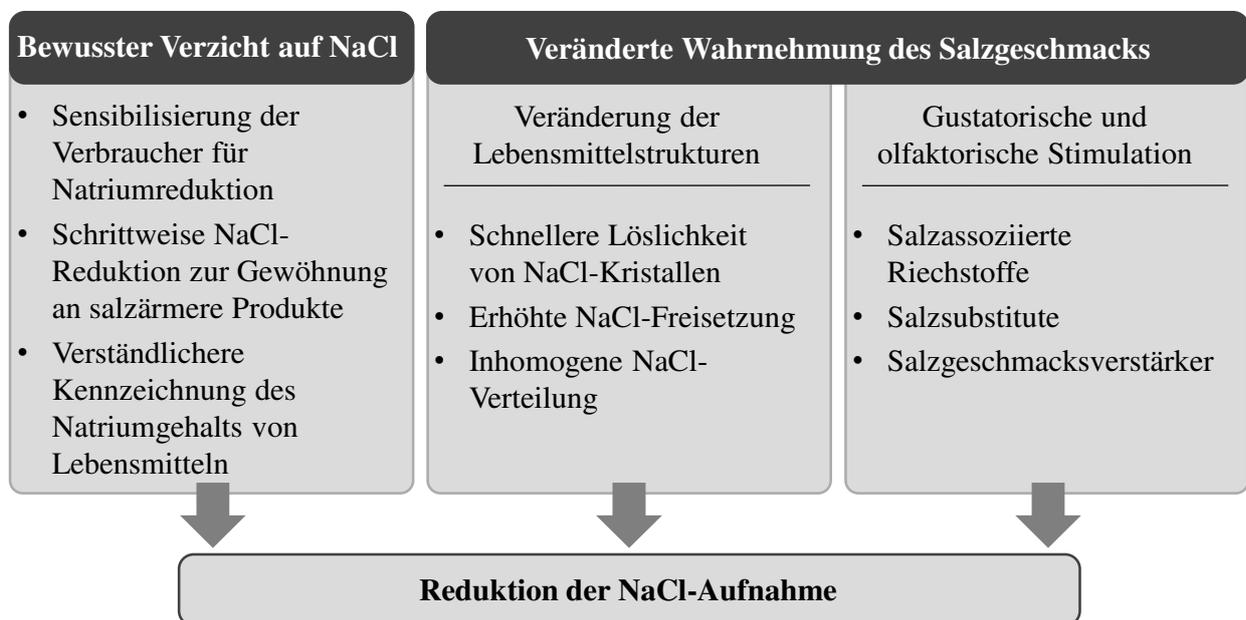


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung der Strategien zur Reduktion der NaCl-Aufnahme.

1.3.1 Veränderung der Lebensmittelstrukturen

Der Salzgeschmack von trockenen Lebensmittels wie Chips und anderen Knabberartikeln ist abhängig von der Größe, Form und Morphologie der Speisesalzkristalle. Werden die Salzkristalle beispielsweise verkleinert, so lösen sie sich rascher und NaCl kann durch die Geschmacksrezeptoren besser wahrgenommen werden (Jensen *et al.*, 2011; Shepherd *et al.*, 1989). Diese Methode beschränkt sich allerdings auf trockene Lebensmittel, in denen das NaCl zunächst ungelöst vorliegt.

Die Textur eines Lebensmittels beeinflusst die Freisetzung und Wahrnehmung des enthaltenen NaCl. Beispielsweise verlangsamt eine hohe Viskosität flüssiger Nahrungsmittel die Freisetzung (Ferry *et al.*, 2004; Koliandris *et al.*, 2010). Auch die variierende Textur eines Käses mit unterschiedlichen Fett-, Protein- und Wassergehalten beeinflusste die Natriumfreisetzung und die wahrgenommene Salzigkeit (Phan *et al.*, 2008). Allerdings ist es oftmals nicht leicht die Konsistenz eines Lebensmittels zu verändern, ohne zugleich die Verbraucherakzeptanz zu beeinflussen.

Eine weitere Strategie zur Senkung des Speisesalzgehalts von Lebensmitteln ist die inhomogene Verteilung des NaCl. Bereits Meiselman und Halpern (1973) zeigten, dass durch den ständigen Wechsel einer NaCl-Lösung und Wasser eine höhere Salzintensität wahrgenommen wurde, als bei der Verkostung von reiner NaCl-Lösung. In Lebensmitteln kann der NaCl-Gehalt insgesamt reduziert werden, indem manche Bereiche höhere und benachbarte Bereiche geringere NaCl-Konzentrationen enthalten (Noort *et al.*, 2010). Es besteht eine Textur-Geschmacks-Interaktion, die eine NaCl-Reduktion bei gleichbleibender Geschmacksqualität erlaubt (Stieger, 2011). Für Brot konnten bis zu 25 % NaCl eingespart werden ohne Verluste in der wahrgenommenen Salzintensität (Konitzer *et al.*, 2013; Stieger *et al.*, 2009a, b). Ein Problem bei der inhomogenen Verteilung von NaCl in Lebensmittels ist allerdings, dass die Natriumionen wandern und den Konzentrationsunterschieden entgegen wirken (Noort *et al.*, 2010). Für Lebensmittel wie reifenden Käse, die nicht zeitnah zur Produktion verzehrt werden und eine Migration der Ionen erlauben, müssen andere Strategien gefunden werden.

1.3.2 Salzassoziierte Riechstoffe

Die Interaktion von gustatorischer und olfaktorischer Wahrnehmung ermöglicht die Speisesalzreduktion. Geschmackslose Riechstoffe, die mit Salz assoziiert werden, intensivierten die wahrgenommene Salzigkeit von wässrigen Lösungen (Djordjevic *et al.*, 2004; Lawrence *et al.*, 2009) und festen Lebensmitteln (Lawrence *et al.*, 2011). Zu solchen Riechstoffen gehören z. B. kommerzielle

Aromen von Speck, Anchovis, Sojasoße und Erdnüssen (Lawrence *et al.*, 2009). Der Einsatz von Riechstoffen kompensiert eine 25 %ige Verringerung des NaCl-Gehalts in wässrigen Lösungen (Nasri *et al.*, 2013). Allerdings ist die Verstärkung des Salzgeschmacks abhängig von dem NaCl-Gehalt. Für Proben mit geringen Konzentrationen (0 bis 20 mM NaCl) wurde der Salzgeschmack durch Riechstoffe gesteigert, während bei höheren Konzentrationen (40 mM NaCl) kein signifikanter Effekt festgestellt wurde (Nasri *et al.*, 2011). Dieser Trend wurde auch von Seo *et al.* (2013) mit einer 16 und 64 mM NaCl-Probe beobachtet. Dadurch werden die Anwendungsmöglichkeiten der geruchsabhängigen Steigerung des Salzgeschmacks auf speisesalzarme Lebensmittel reduziert.

1.3.3 Speisesalzsubstitute

Als Substitute für Natriumchlorid werden häufig Gemische von Salzen eingesetzt, da organische und anorganische Salze wie Kaliumchlorid, Calciumchlorid und Magnesiumsulfat einen salzigen Geschmack zeigen. Oft wird eine Salzmischung aus Natrium- und Kaliumchlorid mit geringen Mengen Magnesiumsulfat, Calciumcarbonat, Zinkoxid und Folsäure verwendet (Ryberg, 2010; Toldra und Barat, 2012). Außerdem gibt es ein Patent für eine Mischung von Natrium- und Kaliumchlorid mit Getreidemehl und Säuerungsmitteln (Chigurupati, 2007). Eine ähnliche Zusammensetzung hat auch das Natrium-arme Salz von Vasquez (2008). Es enthält Kalium-, Calcium- und Magnesiumsalze, organische Säure sowie Reismehl. Als Additive zum Natrium- und Kaliumchlorid verwendeten Zolotov *et al.* (1998) unter anderem ein Nukleosidmonophosphat und einen Zucker.

Der Einsatz der Salzsubstitute wird jedoch durch Fehlgeschmäcke limitiert. So ist Kaliumchlorid bitter und hat einen metallischen Nachgeschmack (van der Klaauw und Smith, 1995; Sinopoli und Lawless, 2012). Daher werden maskierende Zusätze wie Aromen (z. B. durch Zwiebeln, Knoblauch, Chili, Pfeffer, Curry und viele mehr) oder L-Lysin-Hydrochlorid eingesetzt (Berglund und Alizadeh, 1999; Toldra und Barat, 2012). Es existieren noch diverse weitere Patente zur Substitution von Natriumchlorid durch andere Salzmischungen. In den letzten Jahren wuchs die Anzahl an Patenten exponentiell, was das Bestreben widerspiegelt, Natrium-reduzierte Lebensmittel zu entwickeln (Toldra und Barat, 2012). Gleichzeitig zeigt es jedoch, dass bislang kaum praktikable Lösungen für die Lebensmittelindustrie zur Salzsubstitution erzielt wurden.

1.3.4 Salzgeschmacksverstärker

Ein alternativer Ansatz ist die Geschmacksverstärkung. Dabei werden Zusätze gewählt, die typischerweise von sich aus keinen ausgeprägten Geschmack haben und dennoch den Salzgeschmack eines NaCl-haltigen Produkts intensivieren. Der Mechanismus der Geschmacksverstärkung ist meist nicht geklärt, wodurch viele Versuche zum Auffinden neuer Geschmacksverstärker nötig sind (Dötsch *et al.*, 2009). In der Literatur sind verschiedene Systeme beschrieben, die als Salzgeschmacksverstärker fungieren. Dazu gehören das Disaccharid Trehalose (Uchida *et al.*, 2000), Natrium- und Kaliumgluconat (Ise *et al.*, 1996; Takano und Kondou, 2002), Aminosäure-Hydrochloride, Glycinmethylester und -ethylester (Tamura *et al.*, 1989), Citratsalze basischer Aminosäuren (Okai, 2003), Mischungen der Aminosäuren L-Arginin und L-Asparagin (Lee, 1992), das Peptid L-Ornithyltaurin-Hydrochlorid (Nakamura *et al.*, 1996; Tada *et al.*, 1984) sowie enzymatische Hydrolysate von Hühnereiweiß und Gelatine mit Ammoniumsulfat (Guerrero *et al.*, 1998). Für die Produkte der Maillard-Reaktion von Glucose mit L-Alanin bzw. L-Arginin wurde ebenfalls ein salzgeschmacksverstärkender Effekt gezeigt (Ottinger *et al.*, 2003; Soldo *et al.*, 2004). Allerdings wurde nur bei geringen NaCl-Konzentrationen eine Wirkung beobachtet, sodass die Maillard-Produkte wie (S)-Alapyridain für speisesalzreiche Produkte nicht geeignet sind.

Der Geschmacksverstärker Natriumglutamat intensiviert die Geschmacksrichtung umami. In einigen Studien erlaubten geringe Zusätze von Natriumglutamat deutliche Einsparungen von Natriumchlorid. Insgesamt wurde dadurch der Natriumgehalt in Suppen und anderen Lebensmitteln reduziert ohne negative Auswirkungen auf deren Geschmacksqualität (Altug und Demirag, 1993; Leong *et al.*, 2015). Solche Forschungen zeigen, dass das gesamte Geschmacksprofil eines Produktes für die Speisesalzreduktion wichtig ist. In diversen Studien wurde NaCl erfolgreich eingespart, indem komplexe Würzmittel wie Sojasoße, Fischsoße oder getrockneter Bonito (gehört zur Familie der Makrelen und Thunfische) zugesetzt wurden (Goh *et al.*, 2011; Huynh *et al.*, 2015; Kremer *et al.*, 2009; Manabe, 2008).

Die allgemeine Verbesserung des Geschmacks durch zugesetzte Proteinhydrolysate oder Hefeextrakte wurde bereits vielfach beschrieben. Wie oben aufgeführt, wurde ein Hydrolysat mit Ammoniumsulfat speziell als Salzgeschmacksverstärker patentiert (Guerrero *et al.*, 1998). Traditionelle Würzmittel wie Soja- und Fischsoße stellen ebenfalls Proteinhydrolysate dar. Neben dem enthaltenen Glutamat spielen vermutlich weitere Hydrolyseprodukte eine wichtige Rolle in der Geschmacksmodulierung. So wurde ein salzgeschmacksverstärkender Effekt für einige Aminosäuren und Peptide entdeckt, die im Folgenden näher aufgeführt werden.

Die Aminosäuren L-Lysin, L-Arginin (Schindler *et al.*, 2011) und L-Asparaginsäure (Kuramitsu *et al.*, 1996) führten zur verstärkten Wahrnehmung des Salzgeschmacks. In Gouda-Käse war neben Natriumchlorid auch Natriumphosphat für den salzigen Geschmack verantwortlich. Dieser wurde durch freies L-Arginin verstärkt (Toelstede und Hofmann, 2008a). Ein zu hoher Arginin-Gehalt führte jedoch zu einem fischigen Fehl aroma.

Schindler *et al.* (2011) entdeckten den salzgeschmacksverstärkenden Effekt einer Reihe von L-Arginyl-Dipeptiden aus enzymatischen Hydrolysaten von Fisch-Protamin. Die einzelnen L-Arginyl-Dipeptide unterschieden sich in ihrer Wirksamkeit (**Abbildung 1.2**). Viele Peptide verstärkten den Salzgeschmack einer 50 mM NaCl-Lösung bis zu 20 %, während einige inhibierend wirkten. Der Effekt war außerdem abhängig von der Matrix, in der die Peptide verkostet wurden. So verstärkte z. B. das Peptid RP die Salzigkeit von Brühe, aber nicht von reiner NaCl-Lösung. Ein großer Vorteil der L-Arginyl-Dipeptide RA, AR, RG, RS, RV, VR und RM ist, dass sie keinen Fehlgeschmack in wässriger Lösung zeigten (Schindler *et al.*, 2011).

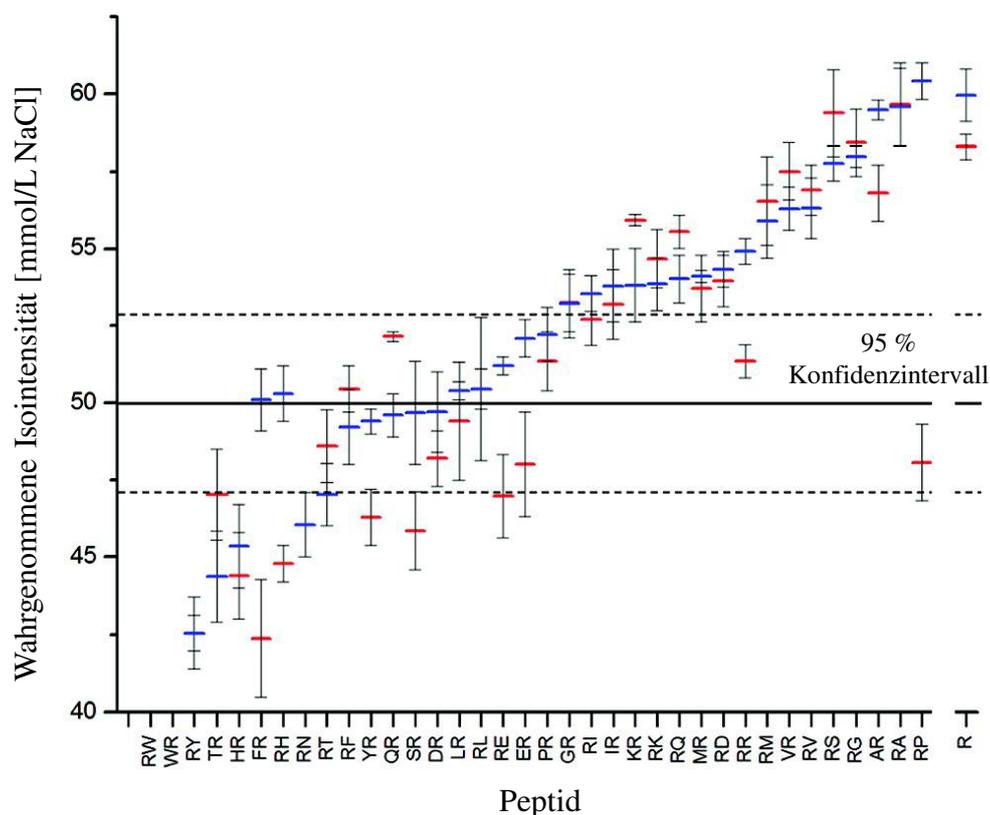


Abbildung 1.2: Salzgeschmacksmodulierende Aktivität der L-Arginyl-Dipeptide (12 mM) in Wasser (rote Striche) bzw. in Brühe (blaue Striche). Die Matrix enthielt insgesamt 50 mM NaCl (schwarze Linie) [Konfidenzintervall $\alpha = 0,05$, gestrichelte Linie]. RW/WR waren stark bitter, sodass der Salzgeschmack nicht bewertet wurde, (modifiziert nach Schindler *et al.*, 2011).

Darüber hinaus wurde ein Salzgeschmack für diverse weitere Di- und Tripeptide beschrieben. Nakata *et al.* (1995) untersuchten ein aus Rindersuppe identifiziertes schmackhaftes Peptid sowie Fragmente davon. Sie bestimmten einen salzigen Geschmack für Di- und Tripeptide, die aus Glutamin- und Asparaginsäure aufgebaut waren. Kuramitsu *et al.* (1996) bestätigten den Salzgeschmack dieser Dipeptide und der Aminosäure Asparaginsäure. Sie schlussfolgerten, dass ionische Gruppen der Peptide wichtig für deren Geschmack sind. Aus enzymatischen Proteinhydrolysaten wurden drei weitere salzige Tripeptide isoliert, die Asparagin- oder Glutaminsäure enthielten (Maehashi *et al.*, 1999). In einer weiteren Studie wurden für ein Screening nach salzgeschmacksverstärkenden Peptiden Dipeptide gezielt mit einer L-Aminosäure-Ligase synthetisiert. Für die Dipeptide LS und MG wurde ein positiver Effekt beschrieben (Kino *et al.*, 2015). Außerdem wurden in einem Patent salzgeschmacksverstärkende Dipeptide beschrieben, die mindestens einen Glutaminsäurerest enthalten. Ihre Gewinnung durch enzymatische Proteinhydrolyse und die anschließende Anreicherung wurden patentiert. Speziell die α -Glutamyl-Dipeptide ET und EE wurden als Salzgeschmacksverstärker benannt (Shimono und Sugiyama, 2013). Die Zusammensetzung der Aminosäuren in den salzigen Peptiden DEKR (Jin-Young Suh *et al.*, 2014) und KGDEE (Nakata *et al.*, 1995) zeigt Ähnlichkeiten zu den zuvor beschriebenen Peptiden, die vor allem basische oder saure Aminosäuren enthalten. Ein von Ohta *et al.* (2005) patentiertes salzgeschmacksverstärkendes Peptid zeichnet sich ebenfalls durch mehr als 20 % saure Aminosäuren aus. Zur besseren Übersichtlichkeit sind die salzigen bzw. salzgeschmacksverstärkenden Peptide mit bekannter Aminosäuresequenz tabellarisch zusammengefasst (**Tabelle 1.2**).

Tabelle 1.2: In der Literatur beschriebene salzgeschmacksverstärkende bzw. salzige Peptide.

Salzgeschmacksverstärkende oder salzige Peptide	Quelle
Arginyl-Dipeptide z. B. RP, RA, AR, RG, RS, RV ¹	Schindler <i>et al.</i> (2011)
LS, MG ¹	Kino <i>et al.</i> (2015)
Glutamyl-Dipeptide, z. B. EE, ET ¹	Shimono und Sugiyama (2013)
DD, DE, ED, EE ²	Kuramitsu <i>et al.</i> (1996), Nakata <i>et al.</i> (1995)
EEE, EED, EDE, DEE, EDE, DED, DDE, EDD, DDD, DES, SPE ²	Maehashi <i>et al.</i> (1999), Nakata <i>et al.</i> (1995)
DEKR ²	Jin-Young Suh <i>et al.</i> (2014)
KGDEE ²	Nakata <i>et al.</i> (1995)

1 – Salzgeschmacksverstärkendes Peptid, 2 – salziges Peptid.

Unter den aufgeführten Salzgeschmacksverstärkern dominieren vor allem Aminosäuren, deren Derivate (z. B. Glycinmethylester und (*S*)-Alapyridain) und Peptide. Der Mechanismus solcher bioaktiven Substanzen ist bislang wenig verstanden. Auffällig ist, dass dabei basische und saure Aminosäuren vermehrt eine Rolle spielen. Dies gilt speziell für Arginin, welches beispielsweise als Ausgangsstoff mit Glucose zu einem salzgeschmacksverstärkenden Maillard-Produkt reagiert. Außerdem zeigte Arginin als freie Aminosäure und in (Di-)Peptiden einen Effekt. Die salzgeschmacksverstärkende Wirkung der Fischsoße und des getrockneten Bonito lassen sich ebenfalls auf das Arginin-reiche Protamin und dessen Hydrolyseprodukte zurückführen. Die Guanidyl-Gruppe scheint eine wichtige Funktion in der Geschmackswahrnehmung zu haben. Dies wurde bereits von Soldo *et al.* (2004) postuliert.

1.4 Gewinnung von Dipeptiden

Dipeptide können verschiedene Bioaktivitäten und -funktionalitäten aufweisen und haben daher Potenzial für die Anwendung in der Lebensmittelindustrie und Pharmazie. Einige Dipeptide wurden als Salzgeschmacksverstärker identifiziert (siehe **Tabelle 1.2**). Allerdings stehen Dipeptide kaum im industriellen Maßstab zur Verfügung, da die kostengünstige Gewinnung bislang schwer realisierbar ist (Yagasaki und Hashimoto, 2008).

Zum einen besteht die Möglichkeit Dipeptide aus natürlichen Ressourcen zu extrahieren. Ein Beispiel dafür ist die Isolierung von Carnosin (β -Ala-L-His) aus dem Muskelgewebe von Säugetieren und Vögeln. Es wird als Nahrungsergänzungsmittel speziell für Sportler eingesetzt (Derave *et al.*, 2010). Außerdem wird die therapeutische Wirkung von Carnosin für eine Reihe von Krankheiten untersucht (Budzen und Rymaszewska, 2013). Ansonsten sind kaum natürliche Quellen für größere Gehalte an Dipeptiden bekannt, die eine rentable Extraktion ermöglichen (Kreherbrink *et al.*, 2014).

Durch die chemische Synthese können eine Vielzahl an Dipeptiden gebildet werden. Die Synthese und Aufarbeitung von Peptiden ist ein mehrstufiger, komplexer und dadurch meist teurer Prozess. Eine umfassende Schutzgruppenchemie und eine Aktivierung der Edukte sind für eine gezielte Synthese nötig (Merrifield, 1963; Nilsson *et al.*, 2005; Noguchi *et al.*, 2012). Nur wenige Dipeptide werden in großen Mengen kommerziell synthetisiert. Der synthetische Süßstoff Aspartam (α -L-Asp-L-Phe-OMe) ist ein Beispiel eines Dipeptid-Esters, der u. a. durch chemische Synthese gewonnen wird (Kreherbrink *et al.*, 2014).

Die chemoenzymatische Synthese nutzt dagegen isolierte Peptidasen zur Knüpfung von Peptidbindungen sowie Schutzgruppen zur Kontrolle der Reaktion. Die herstellbaren Dipeptide werden durch die Spezifität der Peptidase bestimmt (Kumar und Bhalla, 2005). In einem thermodynamisch kontrollierten Prozess erfolgt die reverse Hydrolyse von einzelnen Aminosäuren. Die Dipeptidsynthese ist durch die Entfernung der Produkte (Wasser oder Dipeptide) und kontrollierte Reaktionsbedingungen möglich. In einem kinetisch kontrollierten Prozess ist dagegen nicht das Reaktionsgleichgewicht, sondern der Reaktionsmechanismus entscheidend. Die Aminosäure, welche später im Dipeptid N-terminal vorliegen soll, wird chemisch zu einem Ester oder Amid umgesetzt. Mittels Serin- und Cysteinpeptidasen bildet sich daraus das Aminoacyl-Enzym als Intermediat (Bongers und Heimer, 1994). Dieses wird entweder von einer weiteren Aminosäure oder von Wasser nucleophil angegriffen. Im ersten Fall entsteht ein Dipeptid, während in der Konkurrenzreaktion mit Wasser die Aminosäure frei wird. Durch sorgfältig gewählte Reaktionsbedingungen muss eine anschließende Hydrolyse des synthetisierten Dipeptids verhindert werden. Beispielsweise wurde so L-Ala-L-Gln mit einer Peptidase aus *Empedobacter brevis* synthetisiert (Yokozeki und Hara, 2005). Die Herstellung von Aspartam kann ebenfalls über die chemoenzymatische Synthese erfolgen. Dabei erfolgte die Verknüpfung von Z-L-Asp und D/L-Phe-OMe mittels Thermolysin, einer neutralen Zinkpeptidase (Kühn *et al.*, 2002).

Nicht-ribosomale Peptid-Synthetasen (NRPS) kommen in Bakterien und Pilzen vor. Es handelt sich um große modulare Proteine. Jedes Modul ist verantwortlich für die Addition einer speziellen Aminosäure. In biotechnologischen Ansätzen wurden Module der NRPS gezielt kombiniert und zur Dipeptidsynthese verwendet (Doekel und Marahiel, 2000). Die Ausbeuten waren allerdings gering. Außerdem erfolgt die Verknüpfung von Aminosäuren durch die NRPS ATP-abhängig.

Die L-Aminosäure-Ligase (Lal) aus *Bacillus subtilis* wurde zur Synthese von Dipeptiden genutzt (Tabata *et al.*, 2005). Ihre natürliche Funktion ist die Ligation von L-Ala mit Anticapsin zur Synthese des Antibiotikums Bacilysin (Parker und Walsh, 2013). Unter *in vitro*-Bedingungen wurden viele weitere Aminosäuren verknüpft. Die Aminosäuren Asp, Glu, Arg und Lys wurden jedoch nicht akzeptiert. Dadurch ist die Synthese vieler der in **Tabelle 1.2** aufgeführten salzigen / salzgeschmacksverstärkenden Peptide nicht möglich. Die Synthese mittels Lal ist ebenfalls ATP-abhängig und die Ausbeuten an Dipeptiden waren nur gering (Tabata *et al.*, 2005).

In allgemeinen hydrolytischen Prozessen erfolgt die unspezifische Synthese von Peptiden. Demgegenüber kann durch gezielte Auswahl geeigneter Peptidasen mit limitiertem Substratspektrum (Trypsin spaltet z. B. nur Lys-X und Arg-X) die bevorzugte Bildung spezifischer Produkte erreicht

werden. Durch optimierte Reaktionsparameter wird die Freisetzung von kleinen Peptiden begünstigt. Außerdem beeinflusst die Wahl des Substrats die erzielbaren Produkte (Tavano, 2013). Allerdings handelt es sich stets um ein heterogenes Gemisch von Peptiden, was gegebenenfalls eine Reinigung der Zielpeptide notwendig macht (Yan *et al.*, 2015). Große Vorteile der Proteinhydrolyse mittels Peptidasen oder Peptidasegemischen sind die einfache und kostengünstige Freisetzung von Peptiden.

1.5 Proteinhydrolyse in der Lebensmittelindustrie

Die gezielte Bildung von salzgeschmacksmodulierenden Substanzen kam etwa in den letzten 40 Jahren auf und stellt ein aktuelles Forschungsthema dar. Demgegenüber ist die Hydrolyse von Proteinen gängige Praxis zur Verbesserung des Geschmackprofils von Lebensmitteln. So werden in Asien schon seit vielen Jahrhunderten z. B. Soja- oder Fischsoße durch Fermentation von Pflanzen- und Fischproteinen mit Mikroorganismen wie Ascomyceten der Gattung *Aspergillus* hergestellt (Murooka und Yamshita, 2008). In Europa wurde die Hydrolyse zur Herstellung von Speisewürzen dagegen erst viel später genutzt. Ein bekanntes Beispiel ist die Maggi-Suppenwürze, die aus Soja- und Weizenproteinen hergestellt wird. Im klassischen chemischen Verfahren werden durch harsche Reaktionsbedingungen die Proteine salzsauer hydrolysiert und anschließend mit NaOH neutralisiert. Dadurch ergeben sich im Produkt hohe Salzkonzentrationen von 40 bis 45 % (Chigurupati *et al.*, 2001). Neben den angestrebten geschmacksaktiven Substanzen wie L-Glutaminsäure und kleineren Peptiden entstehen auch gesundheitsschädliche Nebenprodukte. So reagieren die im Gluten enthaltenen Triacylglyceride mit den Chlorid-Ionen zu Chlorpropanolen wie 3-Monochlor-1,2-propandiol und 1,3-Dichlorpropan-2-ol, die in Tierversuchen kanzerogen waren (Hamlet *et al.*, 2002; Wittmann, 1991). Mittlerweile gewinnen die enzymatischen Proteinhydrolysen bzw. fermentative Prozesse an Bedeutung. Sie zeichnen sich durch milde Reaktionsbedingungen aus, die umweltfreundlicher und besser regulierbar sind. Zudem kann durch die selektive Wahl von spezifischen Enzymen die Bildung gewünschter Hydrolyseprodukte gelenkt werden (Tavano, 2013).

Enzymatische Proteinhydrolysate sowie diverse gereinigte Peptide sind von wachsendem Interesse für die Lebensmittelindustrie. Die enzymatische Hydrolyse pflanzlicher und tierischer Proteine (wie der reichlich verfügbaren Milchproteinfraktionen) und die Eigenschaften der Hydrolyseprodukte waren Gegenstand zahlreicher Studien (Luo *et al.*, 2014; Rahulan *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2011). Viele Arbeiten befassten sich mit verbesserten Funktionalitäten, wie der Löslichkeit, den Emulgier- oder Schaumbildungseigenschaften und mit Bioaktivitäten, wie den antimikrobiellen,

antiviralen, antioxidativen, blutdrucksenkenden, antithrombotischen und geschmacksaktiven Eigenschaften (Luo *et al.*, 2014; Rahulan *et al.*, 2012; Schindler *et al.*, 2011; Tavano, 2013; Udenigwe und Aluko, 2012).

Die geschmacksaktiven Eigenschaften von Proteinhydrolysaten lassen sich vor allem auf freie Aminosäuren und kleinere Peptide zurückführen. Sie tragen neben Maillard-Produkten, die beim Pasteurisieren entstehen, maßgeblich zum herzhaften und würzigen Geschmack bei (Aaslyng *et al.*, 1998; Aaslyng *et al.*, 1999). Häufig wird das Hydrolyseprodukt L-Glutaminsäure angestrebt, welches eine Schlüsselrolle als Geschmacksverstärker der Geschmacksrichtung umami spielt (Aaslyng *et al.*, 1998). Diverse γ -Glutamyl-Dipeptide fungieren als Modulatoren des Geschmacks kokumi (Dunkel *et al.*, 2007), während α -Glutamyl- und Arginyl-Dipeptide sowie weitere Di- und Tripeptide (siehe **Tabelle 1.2**) den Salzgeschmack beeinflussen (Schindler *et al.*, 2011; Shimono und Sugiyama, 2013). Sie eröffnen die Möglichkeit zur Salzreduktion in Lebensmitteln und gelten gleichzeitig als physiologisch unbedenklich. Schließlich dienen hydrolysierte Proteine u. a. als hypoallergene Nahrung (El-Agamy, 2007).

Die Herstellung von Milcherzeugnissen wie Käse ist ein klassisches Beispiel für eine Fermentation und Reifung. Es findet eine Glykolyse, Lipolyse und Peptidolyse statt. Letztere erfolgt durch zugesetztes Lab zur Milchdicklegung, Peptidasen wie Plasmin aus der Milch und Enzymen aus den hinzugefügten Starterkulturen (Milchsäurebakterien – *Lactobacillales*). Die Proteinhydrolyse ist entscheidend für die Gewinnung von Geschmacksstoffen und –modulatoren (Fox *et al.*, 2004). In vielen Käsen werden zusätzlich hohe NaCl-Gehalte eingesetzt (siehe **Tabelle 1.1**). Demnach scheinen im Reifeprozess keine ausgeprägten Gehalte an salzgeschmacksverstärkenden Peptiden generiert zu werden. In den Milchsäurebakterien *Lactobacillus casei* und *L. helveticus* finden sich zwar Dipeptidyl-Peptidasen, allerdings nur prolylspezifische (Rawlings *et al.*, 2014; The UniProt Consortium, 2015). Vermutlich haben sie eine ungeeignete Spaltspezifität für die Generierung von Salzgeschmacksverstärkern. Schließlich sind bislang vor allem Glutamyl- und Arginyl-Dipeptide als salzgeschmacksverstärkende Peptide bekannt (siehe Kapitel 1.3.4).

1.6 Peptidasen

Da sich die vorliegende Arbeit mit Peptidasen befasst, sollen im Folgenden einige wichtige Grundlagen zu diesen Enzymen aufgeführt werden. Für detailliertere Informationen gibt es zahlreiche Literaturen (z. B. Rawlings *et al.*, 2014).

Peptidasen machen ca. 60 % des weltweiten Umsatzes an technischen Enzymen aus. Sie kommen in der Natur ubiquitär vor, haben unterschiedliche Funktionen und zeigen daher eine enorme Diversität. In der Enzymnomenklatur (*Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology – NC-IUBMB*) haben Peptidasen der gleichen *Enzyme Commission*-(EC-)Nummer eine vergleichbare Wirksamkeit. **Tabelle 1.3** gibt einen kurzen Überblick dieser Klassifizierung. Die Einteilung von Peptidasen entsprechend ihres aktiven Zentrums und Sequenzhomologien hat sich durch die MEROPS-Datenbank (<http://merops.sanger.ac.uk>) ebenfalls etabliert (Rawlings *et al.*, 2014).

Tabelle 1.3: Klassifizierung wichtiger Peptidasen (nach NC-IUBMB). Spaltstelle: -//-; X, Y und Z stellen Aminosäuren dar.

Benennung	Spaltsequenz	EC-Nummer
Exopeptidasen:		
Aminopeptidasen	NH ₂ -X-//-Peptid	3.4.11
Dipeptidasen	NH ₂ -X-//-Y-COOH	3.4.13
Di- / Tripeptidyl-Peptidasen	NH ₂ -X-Y-(Z-)//-Peptid	3.4.14
Peptidyl-Dipeptidasen	Peptid-//-X-Y-COOH	3.4.25
Carboxypeptidasen	Peptid-//-Y-COOH	3.4.16 – 3.4.18
Endopeptidasen:	Peptid-//-Peptid	3.4.21 – 3.4.25, 3.4.99

Die Interaktionen zwischen einer Peptidase und ihrem Substrat werden durch das Modell von Schechter und Berger (1967) beschrieben. Demnach wechselwirken die Aminosäurereste des Substrats (P_i, ..., P₃, P₂, P₁, P₁' , P₂' , P₃' , ..., P_i') mit denen der Enzymbindungsstelle (S_i, ..., S₃, S₂, S₁, S₁' , S₂' , S₃' , ..., S_i') nach dem Schlüssel-Schloss-Prinzip. Die hydrolytische Spaltung des Substrats erfolgt zwischen den Positionen P₁ und P₁' (siehe **Abbildung 1.3**).

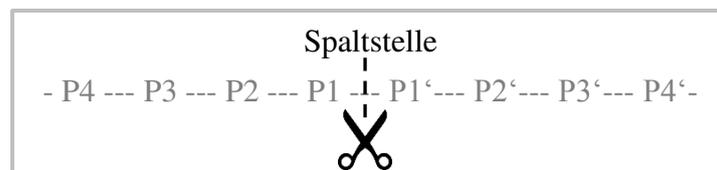


Abbildung 1.3: Schematische Darstellung der Spaltstelle entsprechend der Nomenklatur von Schechter und Berger (1967). P₄ bis P₄' stellen Aminosäuren dar.

1.7 Peptidasen aus Basidiomyceten

Die Abteilung Basidiomycota umfasst ca. 30.000 verschiedene Arten und stellt im Reich der Pilze etwa 30 % aller Arten dar. Zusammen mit der Abteilung Ascomycota bilden sie das Unterreich der Dikarya. Viele beliebte Speisepilze wie der Champignon (*Agaricus bisporus*) oder Seitlinge (*Pleurotus* spp.) gehören zu den Basidiomyceten. Bislang sind nur wenige Arten intensiv erforscht, und die Basidiomyceten spielen in der industriellen Nutzung noch keine große Rolle. Allerdings wird ein großes biotechnologisches Potenzial angenommen. Viele von ihnen haben den GRAS-Status (*generally regarded as safe*), was ihren Einsatz in Lebensmitteln erleichtert. Zudem können die Enzyme aus filamentösen Pilzen relativ kostengünstig, schnell und mit hohen Produktionsraten gewonnen werden (Souza *et al.*, 2015). Durch die Sekretion einer Vielzahl an Enzymen in den extrazellulären Raum wird deren Reinigung erleichtert (Souza *et al.*, 2015).

Unter den von Basidiomyceten sekretierten Enzymen bilden Peptidasen eine der größten Gruppen (Alfaro *et al.*, 2014). Die Peptidasen haben oft eine ungewöhnliche Substratspezifität und Stabilität bei extremen pH-Werten, Temperaturen oder Ionenstärken (Kudriavtseva *et al.*, 2008). In der Natur dienen die extrazellulären Peptidasen zum Substratabbau bzw. Stickstoffversorgung, zur Abwehr von Nahrungskonkurrenten, zur Freisetzung von Peptiden, die für die Pathogenität wichtig sind, sowie zur Regulation anderer Enzymaktivitäten (Alfaro *et al.*, 2014; Palmieri *et al.*, 2001). In der Forschung befassten sich diverse Studien mit Peptidasen aus Basidiomyceten. **Tabelle 1.4** fasst die Anzahl an bekannten und hypothetischen Proteinen von sechs in dieser Arbeit genutzten Basidiomyceten zusammen.

Tabelle 1.4: Anzahl der bekannten und hypothetischen Peptidasen verschiedener Arten von Basidiomyceten (nach Rawlings *et al.*, 2014).

Art	Anzahl bekannter und hypothetischer Peptidasen (nach MEROPS)	Anzahl nichthomologer Peptidasen* (nach MEROPS)
<i>Grifola frondosa</i>	3	0
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	177	57
<i>Pleurotus eryngii</i>	1	0
<i>Pleurotus ostreatus</i>	6	1
<i>Schizophyllum commune</i>	172	28
<i>Trametes versicolor</i>	165	11

*Proteinsequenz, die einer Peptidasefamilie zugeordnet wird, aber der eine / mehrere funktionelle Gruppen fehlen.

Die peptidolytische Diversität von Basidiomyceten wurde beispielsweise in einem Screening von Sabotič *et al.* (2007) dargestellt. Sowohl der Einfluss der Kultivierungsbedingungen auf die Sekretion von Peptidasen, die Isolierung und Charakterisierung einiger Enzyme sowie die Analyse der Gesamtheit an Peptidasen (Degradomik) sind in der Literatur für einzelne Basidiomyceten beschrieben (Ellström *et al.*, 2015; Grimrath, 2011; Kirsch *et al.*, 2011; Mandujano-González *et al.*, 2013; Nishiwaki *et al.*, 2009). Für einige der basidiomycetischen Peptidasen ergaben sich vielversprechende industrielle Anwendungsmöglichkeiten. So konnten beispielsweise Peptidasen aus *Piptoporus soloniensis* und *Termitomyces clypeatus* zur Milchdicklegung genutzt werden (Abd El-Baky *et al.*, 2011b; Majumder *et al.*, 2015). Chen *et al.* (2012) beschrieben eine prolylspezifische Oligopeptidase des *Coprinopsis clastophylla*, welche Anwendung in dem Abbau von Gluten für Zöliakie-Patienten haben könnte. Aus *Schizophyllum commune* wurde eine fibrinolytische Peptidase isoliert, die als antithrombotisches Medikament genutzt werden könnte (Park *et al.*, 2010).

Verglichen mit der Anzahl an Basidiomyceten und ihren vielen Peptidasen liegen insgesamt dennoch nur begrenzte experimentelle Arbeiten zu Peptidasen aus Basidiomyceten vor. Auf Basis von Genomprojekten (Joint Genome Institute (Nordberg *et al.*, 2014)) wurden detaillierte Informationen für bislang 91 Basidiomyceten publiziert (Floudas *et al.*, 2012; Kohler *et al.*, 2015). Diese Daten erlauben die bioinformatische Analyse des Sekretoms (Alfaro *et al.*, 2014) und die gezielte Suche nach speziellen Enzymaktivitäten (Juárez-Montiel *et al.*, 2014).

In der Literatur existieren kaum Studien, die sich mit der Hydrolyse von pflanzlichen oder tierischen Proteinen zur Herstellung bioaktiver und speziell geschmacksaktiver Hydrolysate mittels Basidiomyceten beschäftigen. Mit einem Peptidasegemisch des *Flammulina velutipes* wurde Gluten hydrolysiert und dabei ein würziges Hydrolysat erzielt (Grimrath *et al.*, 2011). Außerdem konnten schmackhafte Feta- und ein Gouda-ähnlicher Käse mit sekretierten Peptidasen von *Wolfiporia cocos* hergestellt werden (Abd El-Baky *et al.*, 2011a).

1.8 Zielsetzung der Arbeit

Wie einleitend dargestellt, existieren bereits einige Ansätze zur Reduktion des Speisesalzgehalts in Lebensmitteln bei gleichbleibender Geschmacksqualität. Bislang begrenzen Fehlgeschmäcke, eine zu geringe Wirksamkeit oder zu hohe Produktionskosten deren Einsatzmöglichkeiten. Speziell für Milchprodukte wie Käse, die hohe NaCl-Gehalte aufweisen, fehlen derzeit noch passende Lösungsansätze. Daher wurde diese Arbeit auf Milchprodukte ausgelegt. Eine Reihe von salzgeschmacksverstärkenden Peptiden wurde bereits identifiziert, sodass die Proteinhydrolyse vielversprechend zur Entwicklung diätetischer, natriumreduzierter Lebensmittel ist. Ziel dieser Arbeit war die Freisetzung von salzgeschmacksverstärkenden Peptiden aus Milch- und Eiklarproteinen mittels Peptidasen aus Basidiomyceten.

Teilziel dieser Arbeit war zunächst das Auffinden von peptidolytisch hochaktiven Basidiomyceten in einem ausgedehnten Screening. Komplexe Gemische von Endo- und Exopeptidasen sollten dann im semi-präparativen Maßstab gewonnen werden.

Milch- und Eiklarproteine, als auf die Milchindustrie ausgelegte Vorläufersubstanzen, sollten durch die Modellsubstrate Casein und Lysozyme repräsentiert werden. Sie sollten mittels der zuvor gewonnenen Peptidasegemische hydrolysiert werden. Die angestrebten Hydrolyseprodukte waren salzgeschmacksverstärkende Verbindungen wie L-Arginyl-Dipeptide als bereits bekannte Salzgeschmacksverstärker, sowie bislang unbekannte salzgeschmacksverstärkende Peptide.

Anschließend sollten in ersten Applikationsstudien die erzeugten Hydrolysate in Käsemodelle eingearbeitet werden. Die salzgeschmacksmodulierende Wirkung der Hydrolysate sollte validiert werden. Außerdem sollte für die Hydrolysate ein Gesamteindruck des Geschmacks gewonnen werden.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien

Alle Chemikalien und Lösungsmittel wurden in der benötigten Reinheit von Sigma-Aldrich (Taufkirchen), Carl Roth (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), VWR International GmbH (Darmstadt), PeptaNova (Sandhausen), AppliChem (Darmstadt), ThermoFisher Scientific (Braunschweig) oder der Bachem AG (Bubendorf, Schweiz) bezogen. **Tabelle 2.1** führt einige der wichtigsten Chemikalien auf. Gluten wurde von Nestlé *Product Technology Centre* (Singen / Hohentwiel) erhalten. Sojaproteine wurden von LSP Sporternährung (Bonn) und Erbsen- sowie Reisproteine von Bioticana (Rendswühren) erworben. Die Soja-, Erbsen- und Reisproteine hatten einen Proteingehalt von mindestens 80 %. Eiklarpulver wurde von Backstars (Bellenberg) und Milchpulver von Carl Roth bezogen. Für die Analytik der Dipeptide mittels LC-MS/MS (Ulrike Krahl, Lebensmittelchemie und molekulare Sensorik, TU München) wurden folgende Peptide als Standards verwendet: RA, RR, RD, ER, RE, RQ, GR, RG, RH, HR, IR, RI, LR, KR, RK, RM, MR, FR, PR, SR, RS (Bachem AG); RN, DR, RC, TR, WR, YR, RY, VR, RV (EZBiolab Inc, Carmel, USA). Für die Verkostungen wurde handelsübliches Speisesalz und Magerquark mit 0,3 % Fett verwendet.

Tabelle 2.1: Chemikalienliste

Chemikalie	Qualität	Hersteller
Ala- <i>p</i> NA	≥ 98 %	PeptaNova
Aminosäurestandard	Analytischer Standard	Sigma-Aldrich
Antipain		Sigma-Aldrich
Arg- <i>p</i> NA	≥ 98 %	Bachem AG
Arg-Pro- <i>p</i> NA	≥ 98 %	Bachem AG
Azocasein		Sigma-Aldrich
Bz-Arg- <i>p</i> NA	≥ 98 %	PeptaNova
Casein (Gemisch von α -, β - und κ -Casein)	≥ 96 %	Carl Roth
Chymostatin		Sigma-Aldrich

Chemikalie	Qualität	Hersteller
EDTA	≥ 99 %	Carl Roth
epoxy-aktivierte Sepharose 6 B		GE Healthcare (München)
Gelatine		Carl Roth
Gly-Arg- <i>p</i> NA	≥ 98 %	Bachem AG
Hefeextrakt, mikro-granuliert		Carl Roth
<i>N</i> ^α -Hippuryl-Arginin	≥ 99 %	PeptaNova
L-Arginin	≥ 98 %	Sigma-Aldrich
L-Asparagin	≥ 99 %	Carl Roth
L-Glutamin	≥ 99,5 %	Sigma-Aldrich
L-Tryptophan	≥ 99 %	Carl Roth
Lysozym (Typ c aus Hühnereiklar)		Fluka / Sigma-Aldrich
<i>N</i> -Suc-Ala-Ala-Pro-Phe- <i>p</i> NA	≥ 98 %	Merck
<i>o</i> -Phenanthrolin	≥ 99 %	Sigma-Aldrich
Pepstatin	≥ 98 %	AppliChem
PMSF	≥ 99 %	ThermoFisher Scientific
Z-Gly-Gly-Leu- <i>p</i> NA	≥ 98 %	Sigma-Aldrich
Z-Gly-Pro- <i>p</i> NA	≥ 98 %	Bachem AG

2.2 Allgemeine Geräte

Tabelle 2.2: Verwendete Laborgeräte

Gerät	Typ	Hersteller
Autoklav	Varioklav 75S	H+P Labortechnik (Oberschleißheim)
<i>Crossflow</i> -Filter	Sartocon Slice PESU Cassette, 10 kDa	Sartorius (Göttingen)
Elektrophorese Stromversorgung (SDS-PAGE / Zymografie)	EV 231 EV 202	Consort (Turnhout, Belgien)

Gerät	Typ	Hersteller
Elektrophorese-Flachbettssystem / horizontale IEF	Multiphor 2 MultiDrive XL	Pharmacia LKB (Uppsala, Schweden)
Elektrophoresekammer (SDS-PAGE / Zymografie)	Mini PROTEAN [®] Tetra System	Bio-Rad (München)
Inkubator	Certomat HK	B. Braun (Melsungen)
Kryostat	Frigomix U-2/Ther- momix [®] BU	B. Braun
Magnetrührer	MR 3001	Heidolph (Kelheim)
pH-Meter	Qph 70	Merck
Fotometer	UV-1650pc	Shimadzu (Duisburg)
Kolbenhubpipetten	Transferpette [®]	Brand (Wertheim)
Schüttler	Multitron	Infors HT (Einsbach)
Sicherheitswerkbank	Clean Air CA/RE 4	Clean Air (Hilden)
Thermoschüttler	Thermomixer comfort	Eppendorf (Hamburg)
Ultrafiltrationseinheiten	Vivaspin 500, 10 kDa Vivaspin 20, 10 kDa	Sartorius
Ultraschallbad	RK 100 H	Bandelin electronic (Berlin)
Ultraturrax	TP-18/10	IKA Labortechnik (Staufen)
Vakuumzentrifuge	Concentrator plus	Eppendorf
Vortex	RS-VA 10	Phoenix Instruments (Garbsen)
Waage	SI-234	Denver Instrument (Göttingen)
Wasseraufbereiter	GenPure UV-TOC/UF	TKA (Niederelbert)
Zentrifuge	Rotina 460R Rotina 380R Mikro 200R Mikro Star 17R	Hettich (Tuttlingen) VWR

2.3 Kultivierung

2.3.1 Basidiomycetenstämme

Die in dieser Arbeit verwendeten Basidiomyceten stammten größtenteils von der Deutschen Stammsammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig) und dem *Centraalbureau voor Schimmelcultures* (CBS, Utrecht, Niederlande). Einer der Pilze wurde von dem Institut für molekulare Holzbiotechnologie (IfmH, Georg-August-Universität Göttingen) erhalten, einer vom *United States Department of Agriculture* (USDA) und einer eigenständig isoliert. In **Tabelle 2.3** sind die genutzten Stämme aufgelistet.

Tabelle 2.3: In dieser Arbeit verwendete Basidiomyceten und deren Bezugsquelle.

Basidiomycet	Abkürzung	Herkunft	Stammnummer
<i>Agaricus bisporus</i>	Abi	DSMZ	3054
<i>Fistulina hepatica</i>	Fhe	DSMZ	4987
<i>Fomitopsis pinicola</i>	Fpi	DSMZ	4957
<i>Gloeophyllum odoratum</i>	God	CBS	444.61
<i>Grifola frondosa</i>	Gfr	CBS	480.63
<i>Hericiium erinaceus</i>	Her	CBS	260.74
<i>Hirneola auricula-judae</i>	Haj	DSMZ	11326
<i>Hypholoma sublateritium</i>	Hsu	DSMZ	8260
<i>Laetiporus sulphureus</i>	Lsu	Eigenisolat	
<i>Lentinula edodes</i>	Led	Keine Angaben	
<i>Lepista nuda</i>	Lnu	DSMZ	3347
<i>Meripilus giganteus</i>	Mgi	DSMZ	8254
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Pch	DSMZ	1547
<i>Pleurotus eryngii</i>	Per	CBS	613.91
<i>Pleurotus ostreatus</i>	Pos	DSMZ	1833
<i>Pleurotus ostreatus</i> var. <i>florida</i>	Posf	IfmH	

Basidiomycet	Abkürzung	Herkunft	Stammnummer
<i>Postia placenta</i>	Ppl	USDA	Mad-698-R
<i>Pycnoporus sanguineus</i>	Psan	CBS	614.73
<i>Schizophyllum commune</i>	Sco	DSMZ	1024
<i>Serpula lacrymans</i>	Sla	CBS	751.79
<i>Trametes versicolor</i>	Tve	DSMZ	11269
<i>Tremella mesenterica</i>	Tme	DSMZ	1557
<i>Ustilago maydis</i>	Uma	DSMZ	17144

2.3.2 Nährmedien

Als Nährmedien wurden die nährstoffreiche Standardnährlösung und das nährstoffreduzierte Minimalmedium verwendet.

2.3.2.1 Standardnährlösung (SNL)

Die Standardnährlösung wurde nach Sprecher (Sprecher, 1959) hergestellt (**Tabelle 2.4**, **Tabelle 2.5**) und mit 1 M NaOH auf pH 6,0 eingestellt. Für festes Nährmedium (SNL-Platten) wurden zusätzlich 15 g L⁻¹ Agar-Agar hinzugefügt. Das Medium wurde bei 121 °C für 20 min autoklaviert.

Tabelle 2.4: Zusammensetzung der Standardnährlösung (SNL).

Komponente	Konzentration
D-(+)-Glucose x H ₂ O	30,0 g L ⁻¹
L-Asparagin x H ₂ O	4,5 g L ⁻¹
Hefeextrakt	3,0 g L ⁻¹
KH ₂ PO ₄	1,5 g L ⁻¹
MgSO ₄	0,5 g L ⁻¹
Spurenelementlösung (s. u.)	1,0 mL L ⁻¹

Tabelle 2.5: Zusammensetzung der Spurenelementlösung.

Komponente	Konzentration
$\text{FeCl}_3 \times 6 \text{H}_2\text{O}$	0,08 g L ⁻¹
$\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	0,09 g L ⁻¹
$\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$	0,03 g L ⁻¹
$\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$	0,005 g L ⁻¹
EDTA	0,4 g L ⁻¹

2.3.2.2 Minimalmedium

Das Minimalmedium (**Tabelle 2.6**) wurde mit 1 M NaOH auf pH 6,0 eingestellt und bei 121 °C für 20 min autoklaviert. Das Medium wurde entweder als solches oder zusammen mit einem Substrat für die Kultivierung verwendet. Als Substrate wurden Casein, Eiklarpulver, Magermilchpulver, Gelatine, Gluten, Erbse-, Reis- oder Sojaproteine eingesetzt. Sie wurden bei 140 °C für 8 h trocken sterilisiert und anschließend mit Minimalmedium versetzt, sodass für die Kultivierung 10 g L⁻¹ vorlagen.

Tabelle 2.6: Zusammensetzung des Minimalmediums.

Komponente	Konzentration
D-(+)-Glucose x H ₂ O	10,0 g L ⁻¹
Hefeextrakt	1,0 g L ⁻¹
KH ₂ PO ₄	1,5 g L ⁻¹
MgSO ₄	0,5 g L ⁻¹
Spurenelementlösung (s. o.)	1,0 mL L ⁻¹

2.3.3 Kulturführung

2.3.3.1 Stammhaltung

Für jeden verwendeten Organismus wurden Stammkulturen auf SNL-Agar in Petrischalen angelegt. Dafür wurde eine Agarplatte (SNL-Agar) mit einem 1 cm² großen, mit Pilzmyzel bewachsenen Agarstück einer Masteragarplatte angeimpft. Es wurde bei 24 °C für ein bis zwei Wochen kultiviert, bis die Agarplatte vollständig bewachsen war. Anschließend wurde die Kultur im Kühlschrank bei 4 °C gelagert.

2.3.3.2 Submerskultur

Zunächst wurde eine Vorkultur in SNL-Medium angesetzt. Ein 1 cm² großes, bewachsenes Agarstück wurde in einen 300-mL-Erlenmeyerkolben, befüllt mit 100 mL Medium, gegeben und mittels Ultraturrax homogenisiert. Nach einer Kultivierung von 5 bis 10 Tagen bei 24 °C und 150 rpm wurde die Kultur bei 4.800 x g und 4 °C für 10 min zentrifugiert und das Myzelpellet noch zweimal mit Wasser gewaschen. Für das Screening wurde das Myzel in einen 500-mL-Erlenmeyerkolben mit 250 mL des jeweiligen Medium überführt. Zur semi-präparativen Gewinnung von Peptidasen wurden ausgewählte Basidiomyceten in 2-L-Erlenmeyerkolben mit 1 L Medium kultiviert. Die Hauptkulturen wurden jeweils mit 10 % (v/v) der Vorkultur inokuliert. In der Hauptkultur wurde SNL-, Minimal- oder Minimal-Medium mit einem Substrat verwendet. Es wurde bei 24 °C und 150 rpm für bis zu 16 Tage kultiviert. Im Screening wurde täglich oder mindestens jeden zweiten Tag 1 mL Kulturüberstand entnommen und die extrazelluläre Azocasein-Aktivität bestimmt.

2.3.3.3 Ernte der Submerskultur

Die Ernte der Hauptkultur erfolgte am Tag der maximalen azocaseinolytischen Aktivität. Dafür wurde der Kulturüberstand bei 9.000 x g und 4 °C für 30 min von dem Myzel abgetrennt. Um störende Polysaccharide zu entfernen, wurden die Proben über Nacht eingefroren. Die dabei unlöslich gewordenen Polysaccharide wurden durch Filtration entfernt. Verbliebene Partikel wurden durch erneute Zentrifugation entfernt (45 min bei 4 °C und 9.000 x g). Die Kulturüberstände wurden durch Querstrom-Ultrafiltration ca. zehnfach konzentriert und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.3.3.4 Zellaufschluss

Für das Screening nach arginylspezifischen Peptidasen wurden ca. 100 bis 250 mg Pilzmyzel mit ca. 400 μL Kaliumphosphatpuffer (0,1 M $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ pH 6) versetzt. Anschließend wurden die Zellen mittels Glasperlen und Homogenisator (Precellys 24-Dual, PeqLab, Erlangen) aufgeschlossen (2800 min^{-1} , 2×15 s mit 10 s Pause). Der Ansatz wurde bei 15.000 x g und 4 °C für 10 min zentrifugiert und der Überstand für die Peptidase-Assays verwendet.

2.4 Proteinchemische Assays

2.4.1 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Proteinbestimmung erfolgte nach Bradford (1976) mit einem kommerziellen Reagenz (Nr. B6916, Sigma-Aldrich). Der Assay wurde in Mikrotiterplatten (96 well) durchgeführt. Dafür wurden 300 μL Bradfordlösung mit 15 μL Probe versetzt, 15 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert und anschließend die Extinktion bei 595 nm gemessen.

2.4.2 Peptidase-Assay mit Azocasein

Der Azocasein-Assay von Iversen und Jørgensen (1995) wurde leicht modifiziert durchgeführt. 100 μL Substratlösung (5 % (w/v) Azocasein in H_2O), 375 μL Puffer (0,1 M $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ pH 6, sofern nicht anders angegeben) und 25 μL Probe wurden vermischt und für 20 min bei 43 °C und 700 rpm (Thermomixer, Eppendorf) inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 3 % (w/v) Trichloressigsäure (TCA) gestoppt. Für den Blindwert wurde die Probe erst nach der TCA-Fällung zugesetzt. Die Proben und die Blindwerte wurden 10 min auf Eis gestellt und dann bei 15.000 x g und 20 °C für 15 min zentrifugiert. Die Extinktion des Überstands wurde bei 366 nm gemessen. Eine *arbitrary* Unit (aU) wurde definiert als die Enzymmenge, die unter den gewählten Bedingungen zu einer Änderung der Extinktion um 0,01 pro h führte.

2.4.3 Peptidase-Assay mit *para*-Nitroanilid-Substraten

Die Peptidaseaktivität wurde gegenüber verschiedenen *para*-Nitroanilid-Substraten (*pNA*-Substrate) getestet: Arg-, Ala-, Arg-Pro-, Gly-Arg-, Z-Gly-Pro-, Bz-Arg- und *N*-Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-*pNA* verwendet. Der Assay wurde in Mikrotiterplatten (96 well) durchgeführt. Der Reaktionsansatz bestand aus 20 μL Probe, 10 μL Substratlösung (2 mM in DMSO) und 120 μL Puffer

(50 mM NaAc pH 4, 50 mM K₂HPO₄/KH₂PO₄ pH 6 oder 50 mM Tris pH 8). Die Änderung der Extinktion wurde bei 37 °C und 405 nm über 60 min gemessen. Der molare Extinktionskoeffizient von *para*-Nitroanilin ist $\epsilon = 4,567 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Giesler *et al.*, 2014). Eine Unit wurde definiert als die Enzymaktivität, die 1 μmol *para*-Nitroanilin pro Minute bildete.

2.4.4 Peptidase-Assay mit Hippuryl-Arginin

Für diesen Peptidase-Assay wurde die Substratlösung stets frisch angesetzt. Dafür wurden 100 mM Hippuryl-Arginin in EtOH gelöst und 1:100 mit dem Puffer verdünnt. Als Puffer wurde 50 mM NaAc pH 4, 50 mM K₂HPO₄/KH₂PO₄ pH 6 oder 50 mM Tris pH 7,5 verwendet. Der Assay wurde in UV-Mikrotiterplatten (96 well) durchgeführt. Der Reaktionsansatz bestand aus 290 μL Substratlösung und 10 μL Probe. Die Änderung der Extinktion wurde bei 25 °C und 254 nm über 30 min gemessen. Der molare Extinktionskoeffizient von Hippursäure war $\epsilon = 0,36 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Eine Unit wurde definiert als die Enzymmenge, die 1 μmol Hippursäure pro Minute freisetzte.

2.4.5 Untersuchung der Peptidaseaktivität in Abhängigkeit des pH-Werts

Der Azocasein-Assay wurde zur Bestimmung des pH-Optimums sowohl der Peptidasemischungen (Gfr, Pch, Per, Posf, Sco und Tve) als auch der gereinigten Peptidasen verwendet. Dafür wurde der Britton-Robinson-Puffer im Bereich von pH 2 bis 9 genutzt (Britton und Robinson, 1931). Der universelle Puffer bestand aus 40 mM H₃BO₃, 40 mM H₃PO₄, 40 mM CH₃COOH und der jeweilige pH-Wert wurde mit 0,2 M NaOH eingestellt. Der pH-Wert wurde nach Zugabe der Probe überprüft. Für alle Peptidasemischungen wurden relative Aktivitäten bei verschiedenen pH-Werten bestimmt. Die relative Enzymaktivität wurde definiert als der Prozentsatz der detektierten Aktivität bezogen auf die maximale Aktivität in dem Experiment.

2.4.6 Untersuchung der Peptidasestabilität in Abhängigkeit des pH-Werts

Der Effekt des pH-Werts auf die Stabilität der extrazellulären Peptidasen von Tve wurde im pH-Bereich 3,8 bis 8,3 in verschiedenen Puffersystemen bestimmt (40 mM Milchsäure/60 mM β -Alanin pH 3,8; 80 mM Milchsäure/160 mM β -Alanin pH 4,4; 60 mM MES/60 mM Histidin pH 6,1; 70 mM HEPES/86 mM Imidazol pH 7,4; 50 mM Glycin/172 mM Tris pH 8,3). Es wurde ca. 30fach konzentrierter Kulturüberstand 1:2 mit dem jeweiligen Puffer versetzt und für 20 h bei 4 °C inkubiert. Davon wurden 4 μL als Probe mit 246 μL Puffer (0,1 M K₂HPO₄/KH₂PO₄ pH 6) im Azocasein-Assay eingesetzt. Ansonsten wurde wie zuvor beschrieben verfahren. Der pH-Wert

wurde vor der 20-stündigen Inkubation und vor dem Aktivitäts-Assay überprüft. Die relative Enzymaktivität wurde definiert als der Prozentsatz der detektierten Aktivität bezogen auf die maximale Aktivität in dem Experiment.

2.4.7 Inhibierungsstudien

Um den katalytischen Typ der affinitätschromatografisch gereinigten Peptidasen (des Gfr und Pch) zu bestimmen, wurden Inhibierungsstudien durchgeführt. Dafür wurden die Proben zunächst mit verschiedenen Inhibitoren versetzt (**Tabelle 2.7**) und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde der Azocasein-Assay mit Zusatz der Inhibitoren durchgeführt. Bei der Vorinkubation und dem Assay wurden die verschiedenen Inhibitoren in effektiven Endkonzentrationen eingesetzt (**Tabelle 2.7**). Die relative Enzymaktivität wurde definiert als der Prozentsatz der detektierten Aktivität bezogen auf die Aktivität ohne Inhibitor.

Tabelle 2.7: Verwendete Peptidaseinhibitoren und deren Konzentration im Ansatz.

Inhibitor	Inhibierte Peptidasen	Endkonzentration im Ansatz
Antipain	Manche Serin- und Cysteinpeptidasen, Peptidasen mit Ähnlichkeit zu Trypsin	1,65 mM
Chymostatin	Cysteinpeptidasen	0,2 mM
EDTA	Metallopeptidasen	20 mM
Pepstatin	Aspartatpeptidasen	1 μ M
<i>o</i> -Phenanthrolin	Metallopeptidasen	10 mM
PMSF	Serinpeptidasen	10 mM

2.5 Gelelektrophoretische Verfahren

2.5.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die in der SDS-PAGE verwendeten Lösungen sind **Tabelle 2.8** zu entnehmen. Die Gele wurden entsprechend der **Tabelle 2.9** präpariert. Die diskontinuierliche SDS-PAGE wurde nach Laemmli (1970) semi-nativ oder denaturierend durchgeführt. Die Proben wurden 1:2 mit dem nativen bzw.

denaturierenden Probenpuffer versetzt. Bei denaturierenden SDS-PAGE-Analysen wurden die Proben vor der Auftragung für 10 min bei 95 °C inkubiert. Je nach Probe wurden 5 bis 35 μL pro Geltasche aufgetragen und die Trennung erfolgte bei 15 mA pro Gel. Im Anschluss wurden die Proteinbanden mit Instant Blue (Expedeon, Cambridgeshire, Großbritannien) angefärbt. Zur Bestimmung der molekularen Proteinmassen wurde der Marker *Precision Plus Protein Standard*TM (Bio-Rad) verwendet. Die Bestimmung der molekularen Massen wurde über den linearen Zusammenhang der relativen Wanderstrecke (R_f -Wert) zur logarithmierten molekularen Masse ($\log(\text{MW})$) berechnet.

Tabelle 2.8: In der SDS-PAGE verwendeten Lösungen.

Lösung	Komponente	Konzentration
APS-Lösung	Ammoniumperoxodisulfat	0,4 g L ⁻¹ (1,75 mM)
Lagerung bei -20 °C		
Elektrophorese-Laufpuffer	Tris	3,02 g L ⁻¹ (25 mM)
	Glycin	14,42 g L ⁻¹ (192 mM)
	SDS	1,0 g L ⁻¹ (3,5 mM)
Probenpuffer (nativ bzw. denaturierend, 2fach konzentriert)	Tris-HCl pH 6,8	23,64 g L ⁻¹ (150 mM)
	Dithiothreitol (im denaturierenden Puffer)	30,85 g L ⁻¹ (200 mM)
	Glycerol	20 % (v/v)
	SDS	40 g L ⁻¹ (139 mM)
	Bromphenolblau	25 mg L ⁻¹
Lagerung bei -20 °C		

Tabelle 2.9: Zusammensetzung eines diskontinuierlichen Gels mit 12 bzw. 18 %* Acrylamid.

Komponente	Trenngel	Sammelgel
ddH ₂ O	2,15 bzw. 1,4* mL	1,45 mL
Acrylamid / Bisacrylamid (37,5:1)	1,5 bzw. 2,25* mL	243,5 μ L
1,5 M Tris pH 8,8	1,25 mL	
1,5 M Tris pH 6,8		250 μ L
10 % (w/v) SDS	50 μ L	20 μ L
APS-Lösung	13 μ L	10 μ L
TEMED	4 μ L	4 μ L

2.5.2 Zymografie

Die in der Zymografie verwendeten Lösungen sind **Tabelle 2.8** und **Tabelle 2.10** zu entnehmen. Bei der Zymografie wurden kontinuierliche Gele (Yim *et al.*, 2002) verwendet, jedoch mit einpolymerisiertem Substrat. Die Gele wurden entsprechend der **Tabelle 2.11** hergestellt. Die Proben wurden 1:2 mit nativem Probenpuffer versetzt und auf vorgekühlte Gele aufgetragen. Die Trennung erfolgte bei 4 °C mit gekühltem Laufpuffer bei 10 mA pro Gel. Nach dem Gellauf wurde das Gel mit 2,5 % (w/v) Triton X-100 und dreimal mit dH₂O gewaschen. Das Gel wurde in 100 mM K₂HPO₄/KH₂PO₄ pH 6 über Nacht bei RT inkubiert. Anschließend wurde es dreimal mit dH₂O bei ca. 60 °C gewaschen und mit Coomassie Brilliant Blue-Färbelösung (CBB) für mindestens 1 h angefärbt. Es handelte sich um eine Negativ-Färbung, bei der helle Bereiche Peptidasen repräsentierten und der Hintergrund angefärbt wurde. Zur Verstärkung des Kontrastes wurde das Gel über Nacht in dH₂O gelagert.

Tabelle 2.10: In der Zymografie verwendete Lösungen.

Lösung	Komponente	Konzentration
Gel-Puffer (2fach konzentriert)	Tris	18,42 g L ⁻¹ (76 mM)
	Serin	21,02 g L ⁻¹ (100 mM)
	Glycin	15,02 g L ⁻¹ (100 mM)
	Asparagin	30,02 g L ⁻¹ (100 mM)

Der Puffer wurde mit HCl auf pH 7,4 eingestellt, sterilfiltriert (0,22 μm) und bei 4 °C gelagert. Das Substrat Casein bzw. Lysozym wurde vor dem Gießen der Gele im Gel-Puffer gelöst (2 mg mL⁻¹).

CBB-Färbelösung	Coomassie Brilliant Blue G 250	80 mg L ⁻¹
	HCl	≤ 35 mM

CBB wurde mit dH₂O 2-3 h bei Raumtemperatur gerührt und dann mit HCl versetzt.

Tabelle 2.11: Zusammensetzung eines Zymografiegeles mit 12 % Acrylamid.

Komponente	Volumen
ddH ₂ O	1,4 mL
Gel-Puffer (mit 2 mg mL ⁻¹ Substrat)	3,5 mL
Acrylamid / Bisacrylamid (37,5:1)	2,1 mL
APS-Lösung	8 μL
TEMED	5 μL

2.5.3 Analytische isoelektrische Fokussierung (IEF)

Für die IEF wurden vorgefertigte Gele (Servalyte Precotes pH 3 bis 10, 300 μm , 125 mm x 125 mm, Serva, Heidelberg), ein Proteinstandard im Bereich pI 3 bis 10 (IEF-Markerns 3 bis 10 Liquid Mix, Serva) und Anoden- sowie Kathodenlösung (pH 3 und 10, Serva) verwendet.

Die Durchführung erfolgt gemäß den Herstellerangaben. Es wurden 10 bis 20 μL der Probe mithilfe von Applikatorstreifen auf das Gel aufgetragen. Die Fokussierung erfolgte mit einem LKB Multiphor II (Pharmacia, Freiburg) bei 4 °C, 6 mA, max. 2.000 V und 12 W für 3.500 Vh. Es wurde darauf geachtet, dass die Anfangsspannung über 200 V lag. Die Gele wurden zur Visualisierung der Proteine anschließend direkt mit Coomassie G gefärbt (**Tabelle 2.12**) oder zur Detektion von Peptidasen genutzt. Um Peptidaseaktivität nachzuweisen, wurde das IEF-Gel mit einem Substratgel (1 mg mL⁻¹ Casein, 1 % (w/v) Agarose, 100 mM K₂HPO₄/KH₂PO₄ pH 6) überschichtet, dieses wurde 2 h bei 37 °C inkubiert und anschließend mit Coomassie R (**Tabelle 2.12**) gefärbt. Wie bei der Zymografie handelte es sich um eine Negativ-Färbung, für die der Hintergrund mit Coomassie angefärbt wurde.

Tabelle 2.12: Zusammensetzung der Coomassie R- bzw. G-Färbelösung.

Komponente	Konzentration
EtOH	250 mL L ⁻¹
CH ₃ COOH	100 mL L ⁻¹
Coomassie Brilliant Blue R- bzw. G-250	500 mg L ⁻¹

2.6 Flüssigchromatografische Methoden (FPLC) zur Proteinreinigung

Zur Reinigung der Peptidasen aus den verschiedenen Kulturüberständen wurde eine BioLogic DuoFlow oder eine NGC Quest Anlage (Bio-Rad) gekoppelt mit einem Fraktionssammler Modell 2128 genutzt. Die Durchführung erfolgte bei 4 °C und die Proteine wurden bei 280 nm detektiert. Die Datenerfassung und -auswertung fand mit der BioLogic DuoFlow Software bzw. ChromLab (Bio-Rad) statt.

2.6.1 Affinitätschromatografie (AC)

2.6.1.1 Herstellung der Affinitätsmatrix

Um die Affinitätssäule herzustellen, wurde L-Arginin an epoxy-aktivierte Sepharose 6B gekoppelt. Dafür wurde die gefriergetrocknete Sepharose in ddH₂O suspendiert (200 mL g⁻¹) und für 1 h auf einem gesinterten Glasfilter gewaschen. Pro Gramm Sepharose wurden 1400 μmol L-Arginin in

ddH₂O gelöst, mit 50 % NaOH auf pH 11,4 eingestellt und auf 17,5 mL aufgefüllt. Die aktivierte Sepharose wurde mit der Ligand-Lösung versetzt und die Kopplung erfolgte über Nacht im Rotationsschüttler (Thermomixer, Eppendorf) bei 200 rpm und 45 °C. Die Sepharose wurde mit 50 mL g⁻¹ ddH₂O gewaschen. Die restlichen aktiven Gruppen wurden mit 1 M Ethanolamin (pH 8) über Nacht im Rotationsschüttler (Thermomixer, Eppendorf) bei 200 rpm und RT blockiert. Erneut wurde gewaschen, zunächst mit 50 mL g⁻¹ ddH₂O und dann in drei Zyklen mit jeweils 10 mL g⁻¹ alternierenden Puffern (0,1 M NaAc, 0,5 M NaCl, pH 4; 0,1 M Tris, 0,5 M NaCl, pH 8). Die Arginin-Sepharose wurde in eine Econo-Pac Chromatographiesäule (Bio-Rad) gegossen, mit ddH₂O bis zur Druckkonstanz gespült und in 20 % (v/v) EtOH gelagert.

2.6.1.2 Durchführung der Affinitätschromatografie

Die Chromatografie wurde mit 100 mM K₂HPO₄/KH₂PO₄ pH 6 als Laufpuffer durchgeführt. Der Elutionspuffer enthielt zusätzlich 400 mM L-Arginin. Die Säule hatte ein Volumen von 5 mL. Es wurden 5 bis 20 mL der ca. 6fach konzentrierten Kulturüberstände mit doppelt konzentriertem Laufpuffer versetzt und als Probe injiziert. Es wurde mit drei Säulenvolumina an Laufpuffer gewaschen und die Stufenelution erfolgte mit 5, 10, 20 und 100 % des Elutionspuffers (10 mL pro Stufe). Es wurde ein Fluss von 1 mL min⁻¹ verwendet und 2-mL-Fractionen gesammelt.

2.6.2 Größenausschlusschromatografie (SEC)

Um in der Größenausschlusschromatografie (*Size Exclusion Chromatography* – SEC) eine bessere Auftrennung zu erzielen, wurden zwei Säulen (Superdex 75 10/300, GE Healthcare) miteinander gekoppelt. Als Chromatografiepuffer wurden 50 mM K₂HPO₄/KH₂PO₄ pH 6 mit 100 mM NaCl verwendet. Die Proben wurden 30- bis 60fach konzentriert (MWCO 10 kDa) und maximal 50 µL pro Lauf injiziert. Es wurde ein Fluss von 0,5 mL min⁻¹ verwendet und 0,4-mL-Fractionen gesammelt.

2.6.3 Ionenaustauschchromatografie (IEX)

Für die Ionenaustauschchromatografie (*Ion Exchange Chromatography*) wurde der starke Anionenaustauscher HiTrap Q XL (GE Healthcare) verwendet. Als Laufpuffer wurde 20 mM Tris pH 7,5 genutzt und der Elutionspuffer enthielt zusätzlich 1 M NaCl. Die Kulturüberstände (3 bis 5 mL, ca. 6fach konzentriert) wurden mit 40 bis 100 mL Laufpuffer versetzt, sodass die Proben auf pH 7,5 eingestellt wurden. Nach der Probeninjektion wurde mit 50 mL Laufpuffer gewaschen

und mit einem linearen Gradienten (20 mL) eluiert. Die Flussrate betrug 1 mL min^{-1} und es wurden 1-mL-Fractionen gesammelt. Die Startlösung, der Durchbruch und die einzelnen Elutionsfraktionen wurden ca. zehnfach konzentriert sowie entsalzt (MWCO 10 kDa) und weiter analysiert.

2.7 Hydrolyseexperimente

Als Substrate dienten vorwiegend Casein und Lysozym, daneben wurden aber auch Gelatine, Erbsen-, Reis- und Sojaproteine verwendet. Sie wurden mit Peptidase-mischungen der sechs Basidiomyceten Gfr, Pch, Per, Posf, Sco und Tve hydrolysiert. Die Reaktionsansätze enthielten 10 mg mL^{-1} Substrat, eine Azocasein-Aktivität von 400 aU mg^{-1} Substrat in 50 mM Acetat-Puffer pH 6. Die Hydrolysen von Casein und Lysozym erfolgten in einem Endvolumen von 50 mL für die humansensorische Verkostung in Käsematrix und die Quantifizierung der L-Arginyl-Dipeptide, 4 mL für die Messung der Löslichkeit des Caseins oder 1 mL für die Analyse mittels SDS-PAGE und die Quantifizierung der L-Aminosäuren. Zur Bestimmung der L-Arginyl-Dipeptide in Hydrolysaten anderer Substrate wurde ein Endvolumen von 1 mL gewählt. Die Hydrolysen für die humansensorische Verkostung in Magerquark erfolgten mit 20 mg mL^{-1} Lysozym, 400 aU mg^{-1} und einem Volumen von 25 bis 50 mL . Sie wurden zu Beginn der Hydrolyse mit 100 mM KHCO_3 auf pH 6 eingestellt. Negativkontrollen wurden mit Hitze-inaktivierten Enzymen und ohne Enzyme durchgeführt. Nach einer Inkubation von $0, 1, 3, 5,$ und 24 h bei 37 °C im Rotationsschüttler (Thermomixer, Eppendorf) bei 600 rpm wurde durch Hitze inaktiviert (99 °C für 30 min). Die Proben wurden bei -20 °C gelagert. Für die Quantifizierung der L-Arginyl-Dipeptide und die humansensorischen Verkostungen wurden die Proben gefriergetrocknet und bei -20 °C gelagert.

2.8 Untersuchung der zunehmenden Löslichkeit des Caseins

Um die zunehmende Löslichkeit des Caseins während der Hydrolyse zu bestimmen, wurde der Hydrolyseansatz zentrifugiert ($5.000 \times g$ für 30 min) und das pufferunlösliche Casein in 100 mM NaOH gelöst. Dann wurde die Proteinkonzentration nach Bradford bestimmt (Kapitel 2.4.1). Als Kalibrationsstandard wurde Casein ($0,05$ bis 1 mg mL^{-1}) in 100 mM NaOH verwendet.

2.9 Bestimmung der Aminosäuren und des Hydrolysegrades

Die freien L-Aminosäuren wurden mittels *o*-Phthalaldehyd-(*o*PA-)Vorsäulenderivatisierung, Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigkeitschromatografie (RP-HPLC) und Fluoreszenz-Detektion

($\lambda_{\text{Exzitation}} = 330 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{Emission}} = 460 \text{ nm}$) quantifiziert. Die verwendete HPLC-Anlage ist in **Tabelle 2.13** beschrieben. Für die Derivatisierung wurden $100 \mu\text{L}$ $0,5 \text{ M}$ Borat-Puffer pH 10, $20 \mu\text{L}$ *o*PA-Reagenz (100 mg *o*PA, 1 mL Borat-Puffer, 9 mL MeOH und $100 \mu\text{L}$ 3-Mercaptopropionsäure) und $10 \mu\text{L}$ verdünnte Probe vermischt. Nach 2 min wurde die Reaktion mit $50 \mu\text{L}$ 1 M CH_3COOH gestoppt. Davon wurden $20 \mu\text{L}$ injiziert und die Analyten wurden auf einer Nucleodur C18 Pyramid-Säule ($250 \text{ mm} \times 4 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$, Macherey-Nagel, Düren) bei $40 \text{ }^\circ\text{C}$ separiert. Es wurde ein Fluss von 1 mL min^{-1} und der folgende Gradient aus Eluent A (MeOH) und Eluent B ($0,1 \text{ M}$ NaAc, $0,044 \%$ (v/v) Triethylamin, mit Eisessig eingestellt auf pH 6,5) genutzt: 0-5 min 10 % A, 5-8 min 15 % A, 8-40 min 60 % A, 40-50 min 100 % A, 50-55 min 10 % A und 55-60 min 10 % A. Die Messungen wurden als Doppelbestimmungen durchgeführt und die Quantifizierung der L-Aminosäuren wurde mittels einer Fünf- oder Sechs-Punkt-Kalibrierung (5 bis $100 \mu\text{M}$) für jede einzelne Aminosäure durchgeführt. Die Aminosäuren L-Prolin, Hydroxyprolin und L-Cystein waren mit dieser Methode nicht zu detektieren.

Der Hydrolysegrad (engl.: *Degree of Hydrolysis*, DH in %) wurde nach Nielsen *et al.* (2001) berechnet (Gleichung 1).

$$\text{DH} [\%] = h/h_{\text{tot}} \cdot 100 \% \quad (1)$$

h – Konzentration der enzymatisch freigesetzten L-Aminosäuren pro Gramm Substrat

h_{tot} – Konzentration der L-Aminosäuren pro Gramm Substrat nach der salzsauren Hydrolyse (6 M HCl bei $100 \text{ }^\circ\text{C}$ für 24 h)

Vor und nach der Hydrolyse wurden die freien Aminosäuren bestimmt. Es wurde die Differenz der Aminosäurekonzentrationen gebildet, um die freigesetzten Aminosäuren zu bestimmen.

Tabelle 2.13: Bauteile der HPLC-Anlage für die Bestimmung der Aminosäuren.

Gerät	Typ und Hersteller
Fluoreszenzdetektor	RF-10AXL (Shimadzu)
Pumpe	PU 980 (Jasco)
Degaser	DG-980-50 3-Line Degaser (Jasco)
Gradienten System	LG-980-02 (Jasco)
Autosampler	Optimas (Spark Holland)

2.10 Bestimmung der L-Arginyl-Dipeptide¹

Die gefriergetrockneten Hydrolysate wurden in ddH₂O gelöst, 10 min bei 15.000 x g und 4 °C zentrifugiert und die enthaltenen L-Arginyl-Dipeptide bestimmt. Dafür wurden zwei verschiedene Chromatografien verwendet (**Tabelle 2.14**). Die Dipeptide RA, AR, RG, GR, RS, SR, RD, DR, RQ, QR, RK, KR, RE, ER, RF, FR, RT, TR, RN, NR, RW und WR wurden mit dem Chromatographiesystem I und die Dipeptide RP, PR, RV, VR, RM, MR, RR, IR, RI, RL, LR, RY und YR mit dem Chromatographiesystem II analysiert. **Tabelle 2.15** beschreibt die verwendeten Bedingungen der MS. Die Bestimmung der L-Arginyl-Dipeptide basierte auf Arbeiten von Schindler *et al.* (2011). Die Quantifizierung erfolgte mit externen Standards (50 mg L⁻¹) in verschiedenen Verdünnungen (1:1000 bis 1:10).

Tabelle 2.14: HPLC-Messsysteme I + II zur Bestimmung der L-Arginyl-Dipeptide.

HPLC	UltiMate 3000 series (Dionex, Idstein)
Stationäre Phase I	TSKgel Amide-80 (Tosoh Bioscience, Stuttgart); 2 mm x 150 mm, 3 μm
Mobile Phase I	Eluent A: ACN/5 mM Ammoniumacetatpuffer pH 3,5 (95/5 (v/v)) Eluent B: 5 mM Ammoniumacetatpuffer pH 3,5
Gradient I	0-6 min 5 % B, 25 min 30 % B, 40 min 100 % B, 45-60 min 5 % B
Stationäre Phase II	Luna PFP (Phenomenex, Aschaffenburg); 2 mm x 150 mm, 3 μm
Mobile Phase II	Eluent A: ACN + 1 % (v/v) Ameisensäure Eluent B: ddH ₂ O + 1 % (v/v) Ameisensäure
Gradient II	0-6 min 100 % B, 10 min 90 % B, 14-19 min 0 % B, 21-30 min 100 % B
Fluss	0,2 mL min ⁻¹
Injektionsvolumen	2 μL

¹ Die L-Arginyl-Dipeptide wurden von Ulrike Krahl (Lehrstuhl für Lebensmittelchemie und molekulare Sensorik, Technische Universität München) bestimmt.

Tabelle 2.15: MS-Bedingungen zur Bestimmung der L-Arginyl-Dipeptide.

MS	API 4000 QTRAP (AB Sciex, Darmstadt)
Ionisation	<i>Turbo Spray Electrospray Ionisation (ESI⁺)</i> , positive Ionisierung
Scan Modus	MRM (<i>Multiple Reaction Monitoring</i>)
<i>Curtain Gas</i>	Stickstoff (1,72 bar)
Zerstäubergas	<i>Zero grade air</i> (3,1 bar)
Software	Analyst 1.5 (AB Sciex)

2.11 Herstellung einer Käsematrix

Das angestrebte Anwendungsgebiet dieser Arbeit waren Milchprodukte wie Käse. Im Hinblick darauf wurde eine synthetische Käsematrix² hergestellt. Dieses Modelllebensmittel diente der humansensorischen Evaluierung der erzeugten Hydrolysate. Die Käsematrix wurde auf Basis der Arbeit von Toelstede und Hofmann (2008a) hergestellt, in der das Sensometabolom von vier Wochen gereiftem Gouda identifiziert wurde. Es wurden die Aminosäuren L-Lysin (742,8 mg L⁻¹), Mononatrium-L-Glutamat x H₂O (572,0 mg L⁻¹), L-Leucin (505,6 mg L⁻¹), L-Phenylalanin (255,2 mg L⁻¹), L-Tyrosin (180,8 mg L⁻¹), L-Isoleucin (166,4 mg L⁻¹), L-Valin (132,9 mg L⁻¹), L-Methionin (81,1 mg L⁻¹), L-Alanine (77,3 mg L⁻¹), Mononatrium-L-Aspartat x H₂O (62,4 mg L⁻¹), L-Tryptophan (38,3 mg L⁻¹), sowie die Mineralien NaCl (2460,0 mg L⁻¹), KH₂PO₄ (569,3 mg L⁻¹), Milchsäure (1480,5 mg L⁻¹), Ca(CH₃COO)₂ (372,0 mg L⁻¹) und MgCl₂ (582,5 mg L⁻¹) in Wasser (Evian, Danone, Wiesbaden) gelöst. Der pH-Wert wurde mit Ca(OH)₂ auf 5,7 eingestellt.

2.12 Humansensorische Experimente

Ausgewählte Lysozymhydrolysate (Gfr, Pch, Per, Posf, Sco und Tve nach 24-stündiger Hydrolyse) wurden in humansensorischen Experimenten eingesetzt. Es wurde eine Profilsensorik der

² Die Käsematrix wurde am Lehrstuhl für Lebensmittelchemie und molekulare Sensorik der Technischen Universität München zur Verkostung der in dieser Arbeit erzeugten Hydrolysate genutzt.

Hydrolysate in Wasser durchgeführt, um den Eigengeschmack der Hydrolysate zu bewerten. Außerdem wurde der salzmodulierende Effekt der Hydrolysate in einer Käsematrix und in Magerquark evaluiert. Die Profilsensorik und die Verkostungen in der Käsematrix wurden mit einem geschulten Panel durchgeführt³. Die Verkostungen in Magerquark wurden mit einem ungeschulten Panel durchgeführt. Beide Panels bestanden aus gesunden Probanden, die angegeben haben keine bekannten Störungen in der Geschmacks- und Geruchswahrnehmung zu haben.

Das geschulte Panel bestand aus 16 Probanden. Sie wurden zuvor mindestens ein Jahr lang in der sensorischen Bewertung von Grundgeschmacksrichtungen (süß, sauer, salzig, umami und bitter) ausgebildet. Um zu überprüfen, ob das Panel in der Lage war verschiedene NaCl-Gehalte in der Käsematrix zu unterscheiden, wurde jeder Proband gebeten Proben nach der wahrgenommenen Salzigkeit zu ordnen. Dabei lag die NaCl-Konzentration zwischen 40 bis 60 mM jeweils in 10; 5 und 2,5 mM-Schritten. Die Codierung der Proben erfolgte mit dreistelligen Zufallszahlen. Für jede Testperson wurde ein sogenannter Friedman-Wert bestimmt. Das ungeschulte Panel bestand aus 12 bzw. 18 Probanden.

Die Profilsensorik der Lysozymhydrolysate fand in Wasser (0,4 % (w/v)) statt. Die Intensitäten der Grundgeschmacksrichtungen sowie der Adstringenz wurden auf einer Skala von 0 (nicht wahrnehmbar) bis 5 (stark wahrnehmbar) bewertet.

Um die Salzgeschmacksverstärkung der Proteinhydrolysate in der Käsematrix zu bewerten, wurde ein paarweiser (2AFC – *Two-Alternative Forced Choice*) Test durchgeführt. Dafür wurde die Käsematrix mit bzw. ohne Hydrolysat (0,5 % (w/v)) verkostet. Die Ansätze wurden auf 50 mM NaCl eingestellt. Die Lösung mit der höheren Salzintensität sollte bestimmt werden.

Außerdem wurde der salzmodulierende Effekt der Hydrolysate in Magerquark (0,3 % Fett) bestimmt. Dafür wurde Magerquark mit dH₂O verdünnt (je Gramm Quark wurde 1 mL H₂O zugesetzt). Der verdünnte Quark wurde mit 50 mM NaCl und 0,1; 0,5 bzw. 2,5 % (w/v) Hydrolysat versetzt. Die Referenz enthielt statt Hydrolysat weiteres H₂O. Es wurde eine paarweise Vergleichsprüfung von Referenz und Probe durchgeführt (2AFC-Test). Es handelte sich um einen zweiseitigen Test, in dem der Quark mit dem intensiveren Salzgeschmack bestimmt werden sollte.

³ Die Hydrolysate wurden von einem geschulten Panel des Lehrstuhls für Lebensmittelchemie und molekulare Sensorik an der Technischen Universität München evaluiert.

2.13 Proteinsequenzierung mittels ESI-MS/MS

Nach der IEX und der SDS-PAGE wurden Proteinbanden aus dem Gel ausgeschnitten. Sie wurden mit 30 % EtOH bei 60 °C für 20 min entfärbt, tryptisch hydrolysiert und die resultierenden Peptide extrahiert und gereinigt gemäß den Standardprotokollen. Die Sequenzierung erfolgte anschließend mittels Nano-LC-QTOF MS/MS gemäß **Tabelle 2.16** und **Tabelle 2.17** (Linke *et al.*, 2013).

Tabelle 2.16: Messsystem zur Proteinsequenzierung der tryptischen Peptide.

Geräteaufbau	Typ und Hersteller
Gerät	EASY nLC II mit Autosampler (Bruker Daltronik, Bremen)
MS	maXis impact QTOF MS (Bruker Daltronik)
Vorsäule	C18-A1 3PCS (Thermo Fisher Scientific, Bremen)
Säule	CP3-61271-00 0,1 mm × 150 mm Magic C18AQ 3 μ 200 Å (Michrom Bioresources, Inc., Auburn, CA)
Datenaufnahme	QTOF Control 1.5 (Bruker Daltronik)
Datenauswertung	DataAnalysis 4,1; ProteinScape 3.0 (Bruker Daltronik)
Peptiddatenbanksuche	Mascot Software Server (Mascot 2.4.0 search engine, Matrix Science), NCBI-Proteindatenbank*

* Folgenden Parameter wurden in der Datenbanksuche gewählt: globale Modifikationen, Carbamidomethylierung (variabel); Oxidation (M, Variable), bis zu eine fehlende Spaltung erlaubt; Vorläuferionenmassentoleranz, 10 ppm; Fragmentionenmassentoleranz, 0,05 Da; Peptid-Ladung, 1⁺, 2⁺, 3⁺; Instrument, ESI QUAD TOF; Mindestpeptidlänge, 4; Mascot Score > 30.

Tabelle 2.17: Methodenparameter der ESI-MS/MS zur Proteinsequenzierung der tryptischen Peptide.

Methodenparameter	
Mobile Phase	Eluent A: ddH ₂ O + 0,1 % (v/v) Ameisensäure Eluent B: ACN + 0,1 % (v/v) Ameisensäure
Gradient	0 min 95 % A, 25 min 5 % A, 40 min 5 % A
Fließgeschwindigkeit	500 nL min ⁻¹
Säulentemperatur	22 °C (Raumtemperatur)
Injektionsvolumen	2 bis 5 µL
Ionenquelle	ESI ⁺
Massenbereich	<i>m/z</i> 400 bis 1400

Die Ionisierung erfolgte im ESI⁺-Modus. Für *Collision-induced Dissociation*-Experimente wurden mehrfach geladene Ausgangsmoleküle (*parent ions*) selektiv (mittels massenselektivem Quadrupol) in die Kollisionszelle (21-50 eV) geführt. Die dort entstandenen Tochterionen wurden mittels eines orthogonalen Flugzeitmassenspektrometers (TOF-MS) getrennt. Die Massenauflösung betrug etwa 25.000 bis 30.000.

3 Ergebnisse

3.1 Screening nach Peptidasen aus Basidiomyceten

Für die Generierung salzgeschmacksverstärkender Peptide sollten Peptidasen aus Basidiomyceten verwendet werden. Zunächst wurde ein Screening nach peptidolytisch aktiven Basidiomyceten durchgeführt. Dabei war allgemeine und arginylspezifische Peptidaseaktivität von Interesse.

3.1.1 Allgemeine Peptidaseaktivität

Das Screening nach allgemeiner Peptidaseaktivität basierte auf dem Substrat Azocasein, welches durch eine Vielzahl von Peptidasen gespalten werden kann.

3.1.1.1 Kultivierungen mit dem Substrat Gluten

Im ersten Schritt wurden 22 Basidiomycetenstämme auf extrazelluläre Peptidaseaktivität gescreent. Die kultivierten Pilze gehörten zu 3 Klassen, 8 Ordnungen und 15 unterschiedlichen Familien. Zahlreiche von ihnen waren Speisepilze oder zumindest essbare Pilze. Die Auswahl der Arten basierte außerdem auf Literatur- und sequenzbasierten Recherchen in Protein-Datenbanken. Es wurde nach Dipeptidyl-Peptidasen (setzen Dipeptide frei, **Tabelle 1.3**) und nach arginylspezifischen Peptidasen (enthalten Arginin in der Spaltstelle) gesucht. Diese Auswahlkriterien basierten darauf, dass Arginyl-Dipeptide bekannte Salzgeschmacksverstärker sind (Schindler *et al.*, 2011).

Für das Screening wurden die Pilze submers in Minimalmedium mit dem Substrat Gluten bis zu 16 Tage kultiviert. Gluten stellte die Hauptquelle für Kohlenstoff und Stickstoff dar und wurde verwendet, da es in vorangegangenen Arbeiten (Abd El-Baky *et al.*, 2011a; Grimrath *et al.*, 2011) erfolgreich zur Gewinnung hoher Peptidaseaktivitäten eingesetzt wurde. Die Bildungskinetiken der Peptidasen wurde für jeden Pilz aufgezeichnet. Die maximalen extrazellulären Azocasein-Aktivitäten erstreckten sich von unter $0,2 \text{ kaU mL}^{-1}$ bis $6,3 \text{ kaU mL}^{-1}$ (**Tabelle 3.1**). Die höchsten Aktivitäten wurden für *P. chrysosporium* und *T. versicolor* mit mehr als $5,7 \text{ kaU mL}^{-1}$ erzielt. Die Hälfte der Basidiomyceten erreichte deutliche Peptidaseaktivitäten ($> 1 \text{ kaU mL}^{-1}$). Die maximalen Aktivitäten wurden zwischen dem 6. bis 11. Tag der Kultivierung erreicht. Innerhalb der deutlich aktiven ($> 1 \text{ kaU mL}^{-1}$) Basidiomyceten wurde lediglich für *P. ostreatus* eine relativ konstante

Peptidaseaktivität gemessen. **Abbildung 3.1** stellt den Kulturverlauf des *P. chrysosporium* und *P. ostreatus* beispielhaft dar.

Tabelle 3.1: Übersicht über die maximalen extrazellulären Azocasein-Aktivitäten und die Kultivierungszeitpunkte der maximalen Aktivitäten. Die Basidiomyceten wurden submers in Minimalmedium mit Gluten kultiviert.

Basidiomycet	Abkürzung	Aktivität [aU mL ⁻¹]	Tag der max. Aktivität
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Pch	6294 ± 127	7
<i>Trametes versicolor</i>	Tve	5766 ± 76	9
<i>Pleurotus ostreatus</i> var. <i>florida</i>	Posf	5460 ± 170	10
<i>Schizophyllum commune</i>	Sco	4014 ± 59	8
<i>Grifola frondosa</i>	Gfr	3654 ± 110	7
<i>Pleurotus eryngii</i>	Per	3276 ± 119	7
<i>Pleurotus ostreatus</i>	Pos	2910 ± 25	8
<i>Tremella mesenterica</i>	Tme	1860 ± 170	10
<i>Ustilago maydis</i>	Uma	1716 ± 51	8
<i>Fomitopsis pinicola</i>	Fpi	1578 ± 8	10
<i>Meripilus giganteus</i>	Mgi	1482 ± 178	10
<i>Hirneola auricula-judae</i>	Haj	966 ± 76	11
<i>Lepista nuda</i>	Lnu	792 ± 51	6
<i>Hericiium erinaceus</i>	Her	654 ± 59	6
<i>Hypholoma sublateritium</i>	Hsu	396 ± 38	7
<i>Laetiporus sulphureus</i>	Lsu	336 ± 12	8
<i>Serpula lacrymans</i>	Sla	216 ± 17	8
<i>Fistulina hepatica</i>	Fhe	< 200	–
<i>Gloeophyllum odoratum</i>	God	< 200	–
<i>Agaricus bisporus</i>	Abi	< 200	–
<i>Lentinula edodes</i>	Led	< 200	–
<i>Postia placenta</i>	Ppl	< 200	–

Die Daten sind Mittelwerte von Doppelbestimmungen ± Standardabweichungen.

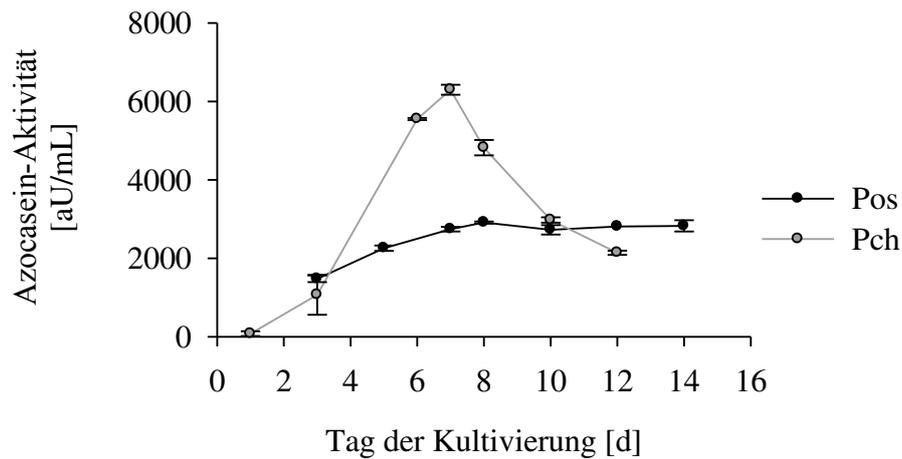


Abbildung 3.1: Bildungskinetiken extrazellulärer Peptidasen im Verlauf der Kultivierung des *P. chrysosporium* (Pch) und *P. ostreatus* (Pos). Die Basidiomyceten wurden submers in Minimalmedium mit Gluten kultiviert. Die Aktivität der Peptidasen wurde mittels Azocasein-Assay bestimmt. Die Daten sind Mittelwerte von Doppelbestimmungen \pm Standardabweichungen (Fehlerbalken).

Zusätzlich wurden die Peptidasen des Screenings mittels Casein-Zymografie visualisiert. Dafür wurden jeweils Proben vom Tag der maximalen azocaseinolytischen Aktivität verwendet. In **Abbildung 3.2** sind diverse Überstände in der Zymografie gezeigt. Für jeden Pilz wurden mindestens eine (Uma) Peptidase detektiert. Fast alle Basidiomyceten sekretierten mehrere Peptidasen unterschiedlicher molekularer Massen (ca. 10 bis 250 kDa im semi-nativen Gel). Für Per, Pos, Posf und Pch wurden jeweils mindestens vier Peptidasen detektiert.

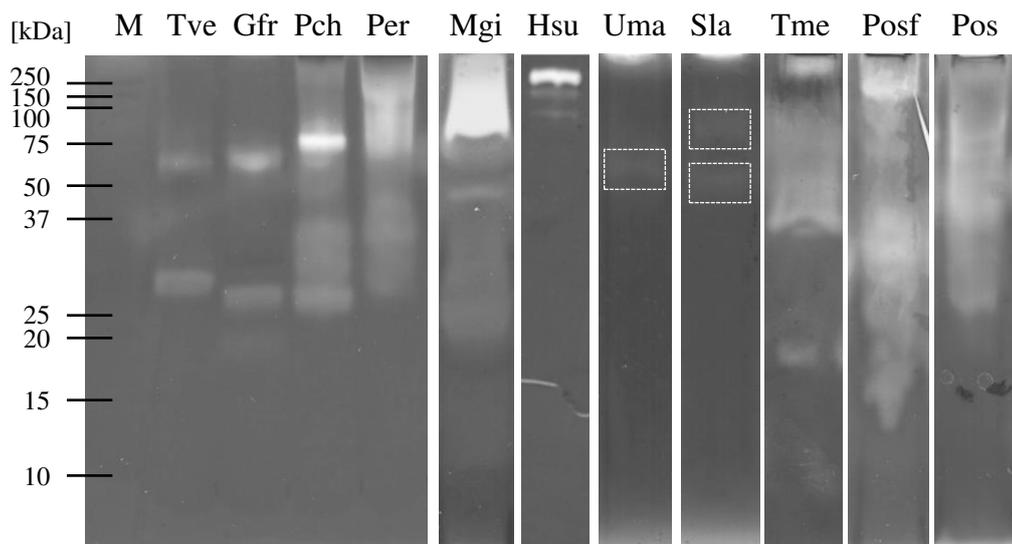


Abbildung 3.2: Casein-Zymografie verschiedener Kulturüberstände am Tag ihrer maximalen Azocasein-Aktivität. Alle Pilze wurden submers in Minimalmedium mit Gluten kultiviert. Weiße Banden repräsentieren extrazelluläre Peptidasen. Banden mit geringer Intensität wurden eingerahmt; Marker (M).

3.1.1.2 Kultivierungen mit variierenden Proteinsubstraten

Nach dem ersten Screening mit dem Substrat Gluten wurden die sechs aktivsten Basidiomyceten mit mehr als 3 kaU mL⁻¹ für weiterführende Studien ausgewählt: *G. frondosa* (Gfr), *P. chrysosporium* (Pch), *P. eryngii* (Per), *P. ostreatus* var. *florida* (Posf), *S. commune* (Sco) und *T. versicolor* (Tve). Diese Basidiomyceten wurden mit variierenden Proteinen (Gelatine, Erbsen, Reis und Soja) kultiviert. Verglichen mit dem Weizenprotein Gluten enthalten die gewählten Substrate höhere Gehalte an Arginin (Tabelle 3.2). Es wurde beabsichtigt, arginylspezifische Peptidasen zu induzieren, da sie als besonders zielführend zur Freisetzung salzgeschmacksverstärkender Peptide erachtet wurden. In der Zymografie wurden trotz variierender Substrate kaum Unterschiede im Peptidasmuster (Anzahl der Banden und deren native molekulare Massen) beobachtet. Die Unterschiede beschränkten sich vorwiegend auf die Signalintensitäten (**Abbildung 3.3** und **Abbildung 3.4**).

Tabelle 3.2: Prozentualer Anteil des Arginins in den verwendeten Proteinen. Aus Weizen, Soja, Reis und Erbsen wurden die extrahierten Proteine als Substrate mit vermuteter Induktorwirkung eingesetzt.

	Anteil Arginin [%]*
Casein	3,7
Weizen, ganzes Korn	4,5
Soja, trockene Samen	6,8
Reis, unpoliert	7,1
Gelatine	7,6
Lysozym	12,1
Erbsen, trockene Samen	14,3

*Anteil des Arginins bezogen auf alle enthaltenen Aminosäuren. Die Berechnungen erfolgten anhand der Aminosäuregehalte in mg g⁻¹ nach Souci *et al.* (2008).

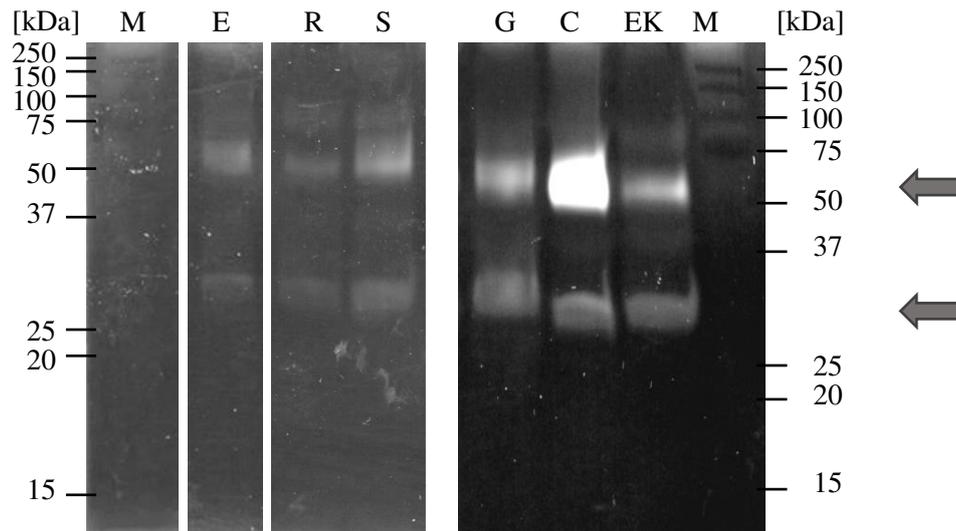


Abbildung 3.3: Casein-Zymografie der Kulturüberstände von Tve bei variierenden Substraten. Es wurden 20 μL Kulturüberstand vom Kulturtag der maximalen Azocasein-Aktivität eingesetzt. Kultivierung in Minimalmedium mit Erbsen- (E), Reis- (R), Sojaproteinen (S), Gluten (G), Casein (C) oder Eiklarproteinen (EK); Marker (M). Die Pfeile markieren die jeweiligen Hauptbanden.

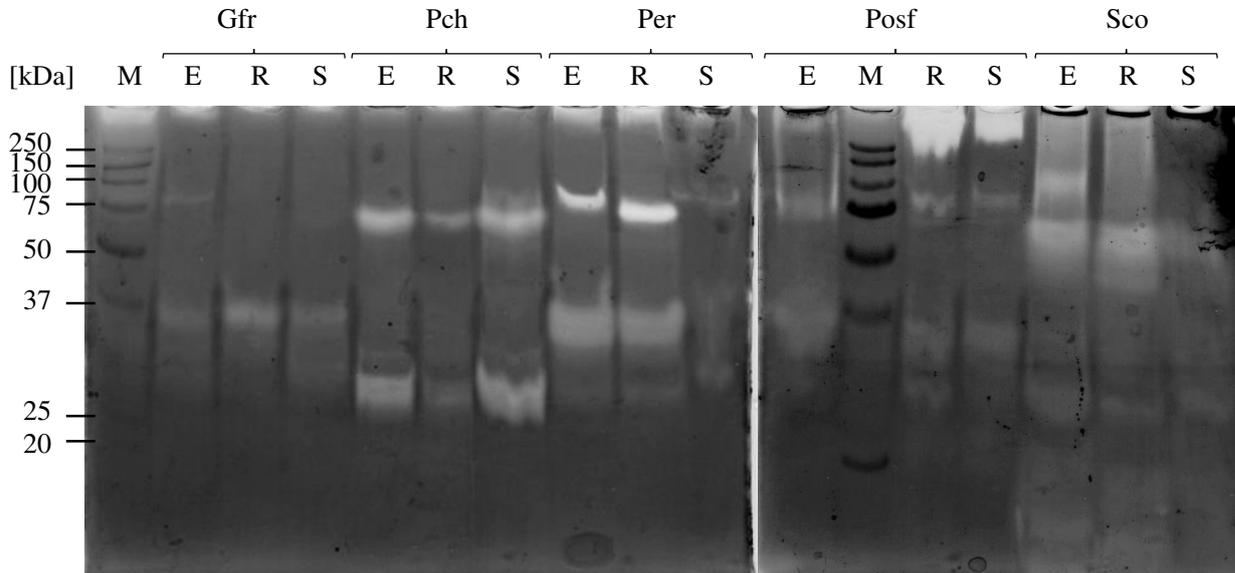


Abbildung 3.4: Casein-Zymografie der Kulturüberstände von Gfr, Pch, Per, Posf und Sco bei variierenden Substraten. Es wurden 20 μL Kulturüberstand vom Kulturtag der maximalen Azocasein-Aktivität eingesetzt. M – Marker. Kultivierung in Minimalmedium mit Erbsen- (E), Reis- (R) oder Sojaproteinen (S).

Tabelle 3.3: Extrazelluläre Azocasein-Aktivität und Kulturtag der maximalen Aktivität im Screening. Die Basidiomyceten wurden submers in Minimalmedium mit verschiedenen Proteinen kultiviert.

Basidiomycet	Abkürzung	Protein	Aktivität [aU mL ⁻¹]	Tag der max. Aktivität
<i>Grifola frondosa</i>	Gfr	Gluten	3654 ± 110	7
		Erbsenproteine	< 200	–
		Reisproteine	1776 ± 153	8
		Sojaproteine	420 ± 136	8
		Gelatine	234 ± 93	8
		Ohne	258 ± 8	9
		SNL*	396 ± 17	12
		<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Pch	Gluten
Erbsenproteine	13200 ± 339			8
Reisproteine	3462 ± 25			8
Sojaproteine	6648 ± 356			8
<i>Pleurotus eryngii</i>	Per	Gluten	3276 ± 119	7
		Erbsenproteine	4368 ± 288	6
		Reisproteine	5118 ± 552	6
		Sojaproteine	1830 ± 212	8
		Gelatine	< 200	–
<i>Pleurotus ostreatus</i> var. <i>florida</i>	Posf	Gluten	5460 ± 170	10
		Erbsenproteine	2484 ± 356	11
		Reisproteine	4212 ± 119	6
		Sojaproteine	2364 ± 305	6
		Gelatine	444 ± 17	9
		Ohne	< 200	–
<i>Schizophyllum commune</i>	Sco	Gluten	4014 ± 59	8
		Erbsenproteine	7908 ± 238	8
		Reisproteine	9132 ± 221	8
		Sojaproteine	1986 ± 178	8
<i>Trametes versicolor</i>	Tve	Gluten	5766 ± 76	9
		Erbsenproteine	15060 ± 1137	8
		Reisproteine	2184 ± 356	4
		Sojaproteine	8898 ± 144	8
		Gelatine	324 ± 136	7
		Ohne	< 200	–
		SNL*	< 200	–
		Milchpulver	864 ± 34	4
		Casein	6282 ± 76	16
Eiklarpulver	3510 ± 110	16		

Für jeden Basidiomyceten wurde das effektivste Substrat fett hervorgehoben. Die Daten sind Mittelwerte von Doppelbestimmungen ± Standardabweichung. * Es wurde SNL statt Minimalmedium ohne Zusatz eines Proteins genutzt.

Trotz der nahezu unveränderten Peptidasemuster variierten die gemessenen extrazellulären Azocasein-Aktivitäten in Abhängigkeit vom Proteinsubstrat. Die Aktivität von Tve wurde beispielsweise von $5,8 \text{ kaU mL}^{-1}$ auf 15 kaU mL^{-1} erhöht, wenn Erbsenproteine anstatt Gluten verwendet wurden. Die maximalen Peptidaseaktivitäten sind in **Tabelle 3.3** zusammengefasst. Tve und Pch stellten sich als die peptidolytisch aktivsten Basidiomyceten dieser Arbeit heraus mit $> 15 \text{ kaU mL}^{-1}$ bzw. $> 13 \text{ kaU mL}^{-1}$ (**Tabelle 3.3**). Innerhalb eines Pilzes variierte die maximale Aktivität abhängig vom Substrat (Gluten, Gelatine, Erbsen-, Reis- und Sojaproteine) um den Faktor 4 (Pch) bis hin zu 47 (Tve). Die höchsten Peptidaseaktivitäten wurde für Per und Sco durch Reisproteine, für Pch und Tve durch Erbsenproteine und für Gfr und Posf durch das anfänglich genutzte Gluten erzielt. In vielen Fällen führten die verschiedenen Proteine (Gluten, Gelatine, Erbsen, Reis und Soja) innerhalb eines Basidiomyceten zu vergleichbaren Kurvenverläufen der Enzyymbildungskinetiken. So ähnelten sich beispielsweise die Bildungskinetiken für Kultivierungen des Tve mit Gluten, Erbsen- und Sojaproteinen (**Abbildung 3.5**). Dieser Trend zeigte sich auch durch die vergleichbaren Tage der maximalen Aktivität innerhalb eines Pilzes (z. B. Pch, Per und Sco, **Tabelle 3.3**).

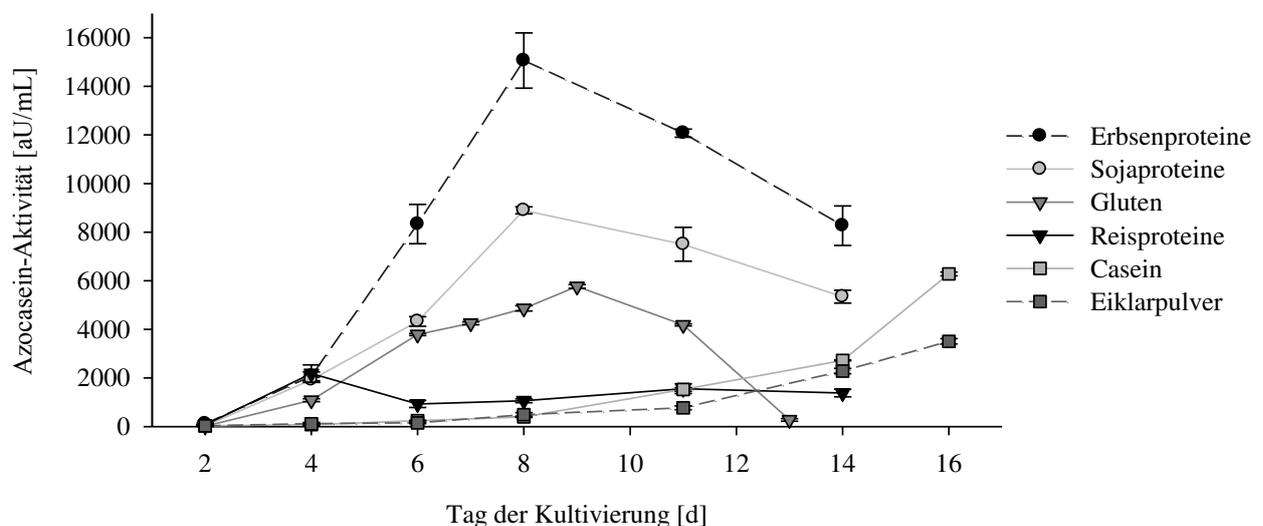


Abbildung 3.5: Bildungskinetiken der extrazellulären Peptidasen von Tve in Minimalmedium mit variierenden Substraten. Die Legende listet die verwendeten Proteinsubstrate auf. Die Daten sind Mittelwerte von Doppelbestimmungen \pm Standardabweichungen (Fehlerbalken).

In dieser Arbeit stellten Milch- und Eiklarproteine die beabsichtigten Ausgangsstoffe zur Generierung von salzgeschmacksverstärkenden Peptiden für die Milchindustrie dar. Daher wurden Casein, Eiklarpulver und Milchpulver als Substrate in der Kultivierung des peptidasereichen Tve

analysiert. Mit diesen Substraten waren das sichtbare Myzelwachstum, sowie die azocaseinolytische Aktivität zunächst gering. Erst am Ende der Kultivierungen führten Casein und Eiklarpulver zu ansteigenden Aktivitäten (**Tabelle 3.3, Abbildung 3.5**). Die bisherigen Proteinsubstrate wurden wegen der kürzeren Kultivierung und der höheren Aktivitäten als effizienter erachtet, insbesondere da die Peptidasmuster (Anzahl der Banden und deren native molekulare Massen) in der Zymografie unverändert blieben (**Abbildung 3.3**).

Die extrazellulären Proteine der sechs aktivsten Pilze (Gfr, Pch, Per, Posf, Sco und Tve) wurden mittels SDS-PAGE visualisiert (**Abbildung 3.6**). Alle Kulturüberstände stellten komplexe Proben dar, mit einer Vielzahl von Proteinen unterschiedlicher molekularer Massen. Um die Anzahl der sekretierten Proteine zu reduzieren und damit eine anschließende Reinigung der Peptidasen zu erleichtern, wurden einfachere Medien ohne Proteinsubstrat erprobt: Minimalmedium (führt zu raschem Nährstoffmangel) und SNL-Medium (ausreichend Kohlenstoff- und Stickstoffquellen). Die Basidiomyceten Gfr, Posf und Tve wurden in Minimalmedium kultiviert. Gfr und Tve wurden zusätzlich in SNL-Medium kultiviert. Die Aktivitäten aller Kulturen blieben mit $< 0,4 \text{ kaU mL}^{-1}$ gering (**Tabelle 3.3**). Zur Gewinnung von Peptidasen wurden daher weiterhin Proteinsubstrate eingesetzt.

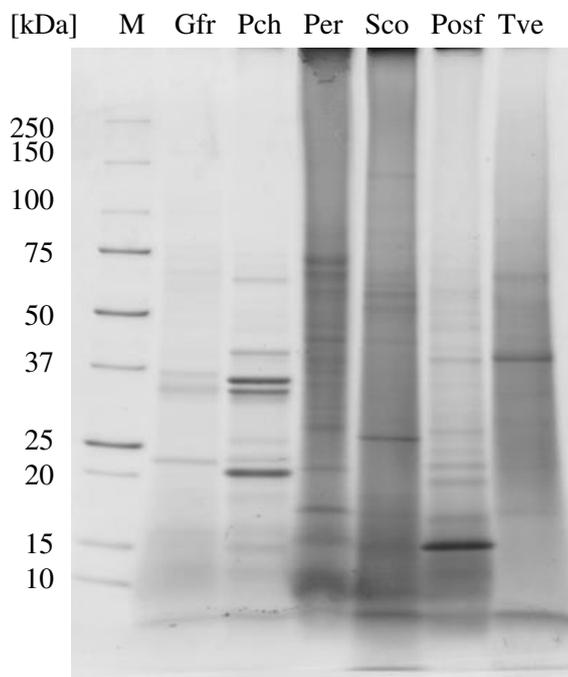


Abbildung 3.6: Denaturierende SDS-PAGE der Kulturüberstände des Gfr, Pch, Per, Posf, Sco und Tve submers kultiviert in Minimalmedium mit Proteinsubstraten. Es wurden jeweils $26 \mu\text{L}$ des Kulturüberstands zum Zeitpunkt der maximalen Azocasein-Aktivität eingesetzt.

3.1.2 Arginylspezifische Peptidaseaktivität

Das Screening nach arginylspezifischen Peptidasen basierte auf der Arginin-Affinitätschromatografie sowie auf synthetischen Arginyl-Substraten.

3.1.2.1 Arginin-Affinitätschromatografie

Die Affinitätsmatrix Arginin-Agarose (**Abbildung 3.7**) diente in der Literatur bereits der Reinigung arginylspezifischer Peptidasen, beispielsweise des Trypsins (Chamrád *et al.*, 2011). Daher wurde die Arginin-Affinitätschromatografie (Arg-AC) gewählt, um arginylspezifische Peptidasen aufzufinden und direkt zu gewinnen.

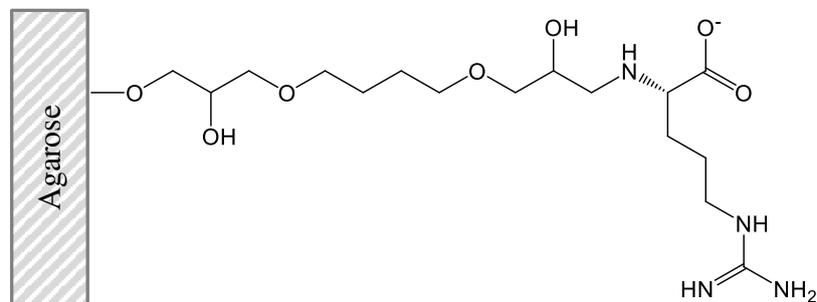


Abbildung 3.7: Schematische Darstellung der genutzten Affinitätsmatrix Arginin-Agarose. Sie wurde aus L-Arginin und epoxy-aktivierter Sepharose 6B (GE Healthcare) hergestellt. Es lag ein hydrophiler Spacer mit einer Länge von 12 Atomen vor.

Zu diesem Zweck wurden die konzentrierten Kulturüberstände der sechs peptidolytisch aktivsten Basidiomyceten (Gfr, Pch, Per, Posf, Sco und Tve, **Tabelle 3.1**) auf die Arginin-Säule appliziert. Zusätzlich wurde der peptidolytisch aktive Kulturüberstand des Psan verwendet ($> 8 \text{ kaU mL}^{-1}$, vorangehende Arbeiten am Institut für Lebensmittelchemie). Die Elutionsfraktionen des Gfr, Pch und Psan enthielten jeweils ein 36 kDa-Protein in der semi-nativen PAGE. Alle drei Proteine zeigten in der Casein-Zymografie peptidolytische Aktivität. Zur Isolierung (*Polishing*) der 36 kDa-Peptidasen folgte eine Größenausschlusschromatografie (PAGE der Reinigungen im Anhang: **Abbildung 7.1**). Diese Peptidasen wurden biochemisch charakterisiert und die Ergebnisse sind in **Tabelle 3.4** zusammengefasst. Das beschriebene Vorgehen ist in **Abbildung 3.8** dargestellt.

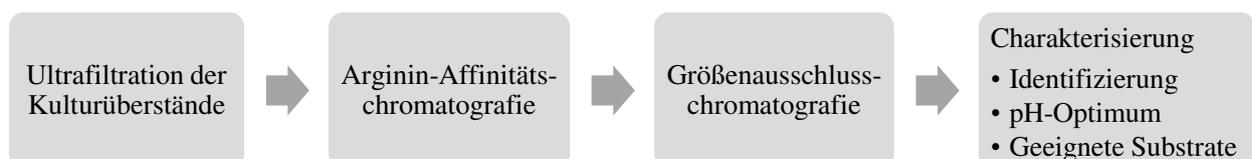


Abbildung 3.8: Affinitätsbasierte Reinigung und Analyse einer 36 kDa-Peptidase des Gfr, Pch und Psan.

Durch tryptische Hydrolyse und Peptidsequenzierung wurden die drei Peptidasen als Aspartatpeptidase der Familie A01 identifiziert. (Nähere Informationen zu den identifizierten Peptidasen wie *Accession numbers*, gefundene Peptide, etc. sind im Anhang der **Tabelle 7.1** zu entnehmen.) Gemäß der MEROPS-Datenbank ist für diese Peptidasen eine breite Spaltspezifität mit Präferenz für große hydrophobe Aminosäuren zu erwarten (Rawlings *et al.*, 2014). In der Analyse der Spaltspezifität zeigte keine der Peptidasen Aktivität gegenüber den Arginyl-Substraten Bz-Gly-Arg, Arg-*p*NA, Gly-Arg-*p*NA, Arg-Pro-*p*NA und Bz-Arg-*p*NA. Die Gfr-Peptidase wurden dennoch zur Hydrolyse der Modellsubstrate Casein und Lysozym verwendet und die freigesetzten L-Arginyl-Dipeptide bestimmt. Die Summe aller L-Arginyl-Dipeptide war mit $< 2,5 \mu\text{mol g}^{-1}$ Substrat gering.

Tabelle 3.4: Charakterisierung der affinitätschromatografisch isolierten Peptidasen von Gfr, Pch und Psan.

	<i>G. frondosa</i>	<i>P. chrysosporium</i>	<i>P. sanguineus</i>
Molekulare Masse: semi-nativ	36 kDa	36 kDa	36 kDa
denaturiert	36 kDa	n. b.	36 kDa
Identifizierung	A01 Peptidase ¹	A01 Peptidase ¹	A01 Peptidase ¹
Inhibierung [%]: Antipain ²	47 %	39 %	n. b.
Pepstatin ³	85 %	86 %	n. b.
pH-Optimum	pH 4	pH 5	pH 4 bis 5
pI	3,5	n. b.	n. b.

¹ A01 – Aspartatpeptidase der Pepsin-Familie; ² Antipain inhibiert manche Serin- und Cysteinpeptidasen, oft arginylspezifische Peptidasen; ³ Pepstatin inhibiert Aspartatpeptidasen; n. b. – nicht bestimmt.

3.1.2.2 Synthetische Arginyl-Substrate

Um arginylspezifische Peptidasen aufzufinden, wurden die synthetischen Arginyl-Substrate Bz-Arg-*p*NA und Gly-Arg-*p*NA eingesetzt. Bz-Arg-*p*NA wird von Endopeptidasen gespalten, während Gly-Arg-*p*NA von Endo- und Dipeptidyl-Peptidasen gespalten wird. Von besonderem Interesse war Aktivität gegenüber Gly-Arg-*p*NA, da das Hydrolyseprodukt Gly-Arg einen starken salzgeschmacksverstärkenden Effekt hat (Schindler *et al.*, 2011).

Von den anfänglich in Minimalmedium mit Gluten kultivierten Basidiomyceten (Kapitel 3.1.1) wurden zwölf ausgewählt: Abi, Fhe, Her, Led, Pch, Pos, Ppl, Sco, Sla, Tme, Tve und Uma. Die

Auswahl dieser Pilze basierte auf Literatur- und Sequenz-Datenbankrecherchen zu arginylspezifischen Peptidasen.

Mindestens an jedem zweiten Tag der Kultivierung wurden die Kulturüberstände auf Aktivität gegenüber den Arginyl-Substraten getestet. Das Screening wurde im Sauren und leicht Alkalischen durchgeführt (pH 4, 6 und 8), um arginylspezifische Peptidasen unabhängig von ihrem Aktivitätsbereich aufzufinden. Dennoch wurde keine extrazelluläre Aktivität gegenüber Bz-Arg-pNA und Gly-Arg-pNA beobachtet.

Zusätzlich wurden die zwölf Basidiomyceten auf intrazelluläre arginylspezifische Peptidasen untersucht. Dafür wurden die Pilze auf SNL-Agar kultiviert und das Myzel aufgeschlossen. In den Zellaufschlüssen wurde ebenfalls keine Aktivität gegenüber Bz-Arg-pNA weder bei pH 4, 6 oder 8 detektiert. Dagegen wurde das Substrat Gly-Arg-pNA durch eine intrazelluläre Peptidase des Her hydrolysiert. Dieses Ergebnis wurde erst zu einem späten Zeitpunkt dieser Arbeit erzielt, so dass keine weiteren Studien zu der arginylspezifischen Peptidase des Her durchgeführt wurden.

3.2 Gewinnung und Charakterisierung komplexer Peptidasegemische

Konzentrierte Kulturüberstände sollten als komplexe Gemische von (Exo- und Endo-)Peptidasen eingesetzt werden, um die Substrate effizient und weitgehend zu hydrolysieren und die bioaktiven Zielmoleküle freizusetzen. Die sechs azocaseinolytisch aktivsten Basidiomyceten (Gfr, Pch, Per, Posf, Sco und Tve) wurden für die Hydrolyseexperimente ausgewählt.

Um ausreichende Peptidaseaktivitäten für Hydrolyseexperimente zu gewinnen, wurden die Kultivierungen in einem größeren Kulturvolumen durchgeführt (*up-scaling* des Kulturvolumens von 250 mL auf 1 L). Die Kultivierungsbedingungen waren ohne Verluste in der Aktivität übertragbar und die maximalen Aktivitäten wurden etwa zeitgleich wie zuvor erreicht.

3.2.1 Visualisierung von Peptidasen mittels Zymografie

Die generelle Eignung der ausgewählten Kulturüberstände zur Hydrolyse der Modellsubstrate wurde zunächst mittels entsprechender Zymografie analysiert. Die Casein- und Lysozym-Zymografie sind vergleichend in **Abbildung 3.9** dargestellt. Die peptidolytische Aktivität aller Basidiomyceten setzte sich aus mehreren (Endo-)Peptidasen zusammen. Es lagen wenigstens zwei (Sco) und bis zu sechs (Pch) deutliche Banden vor. Die Aktivitäten reichten von geringen bis zu sehr hohen molekularen Massen im aktivitätsgefärbten Gel (ca. 15 bis 250 kDa, verglichen mit einem

denaturierten Marker). Die einpolymerisierten Substrate Casein und Lysozym führten zu alternierenden Banden und Bandenintensitäten. Der Kulturüberstand des Sco ergab in beiden Zymografien zwei Banden. Für die anderen Basidiomyceten wurden mit dem Substrat Casein mehr Peptidasen visualisiert als mit Lysozym.

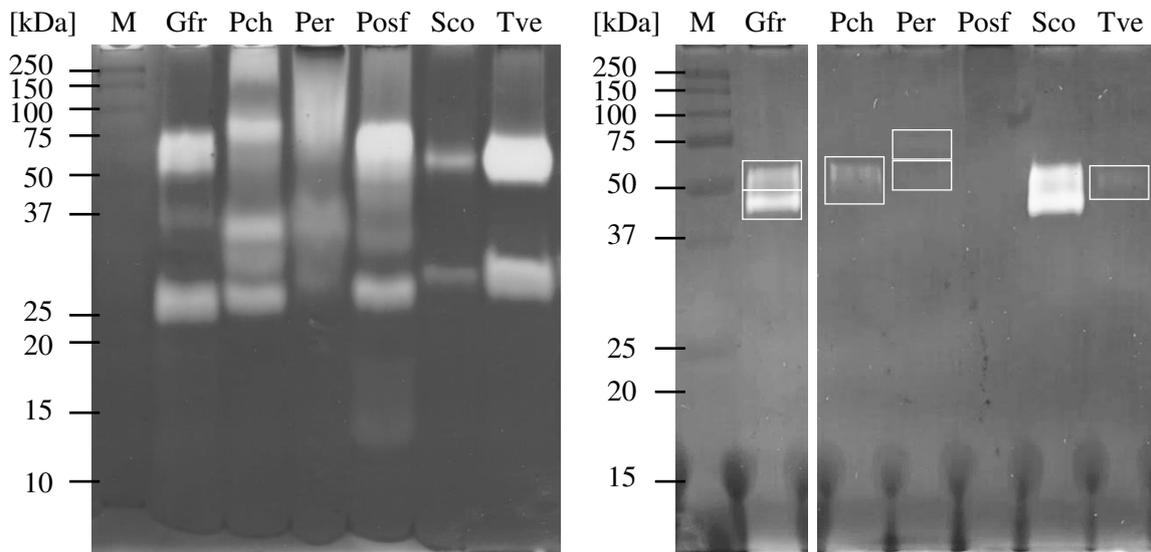


Abbildung 3.9: Casein-Zymografie (links) und Lysozym-Zymografie (rechts) der konzentrierten Kulturüberstände des Gfr, Pch, Per, Posf, Sco und Tve. Es wurden Azocasein-Aktivitäten von 75 aU pro Spur aufgetragen.

3.2.2 Einfluss des pH-Werts auf die Peptidasegemische

Die Aktivität der extrazellulären Peptidasen von Gfr, Pch, Per, Posf, Sco und Tve wurde in Abhängigkeit des pH-Werts bestimmt (**Abbildung 3.10**). Per und Posf zeigten maximale Aktivitäten bei pH 6, während für Gfr, Pch, Sco und Tve die höchsten Aktivitäten bei pH 5 detektiert wurden. Die Peptidasegemische von Pch, Per und Posf zeigten in einem besonders breiten Bereich von mindestens 4 pH-Einheiten über 50 % ihrer maximalen Aktivität. Alle Basidiomyceten waren in einem breiten und leicht sauren pH-Bereich aktiv.

Tve hatte die höchsten Peptidaseaktivitäten in dieser Arbeit (**Tabelle 3.3**). Für diese Peptidasen wurde zusätzlich der Effekt des pH-Werts auf die Enzymstabilität bestimmt (**Abbildung 3.11**). Es wurden verschiedene Puffersysteme im pH-Bereich 3,8 bis 8,3 verwendet. Bei pH 4,4 und 6,1 wurden die maximalen Aktivitäten erhalten (jeweils 100 % relative Aktivität). Bei pH 3,8 verblieb mit über 90 % ebenfalls hohe Aktivität. Im Alkalischen nahm die Aktivität dagegen deutlich ab (bei pH 8,3 < 5 % relative Aktivität).

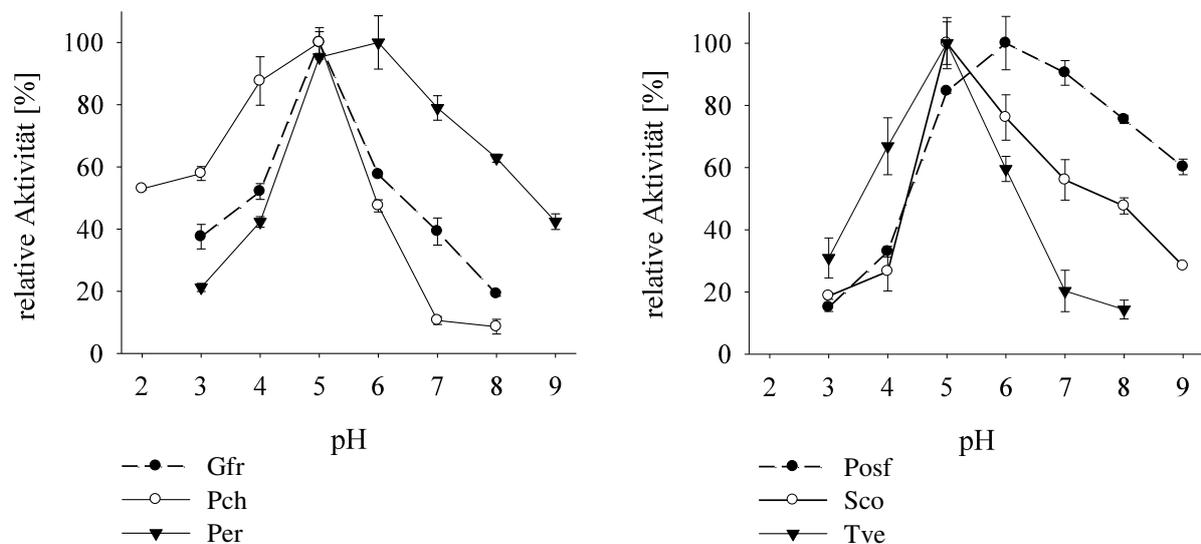


Abbildung 3.10: Effekt des pH-Werts auf die Peptidaseaktivität der Basidiomyceten. Die pH-Optima wurden mit dem universellen Britton-Robinson-Puffer (pH 2 bis 9) und dem Azocasein-Assay bestimmt. Der pH-Wert im Assay wurde überprüft. Für jeden einzelnen Basidiomyceten wurde die relative Enzymaktivität definiert als der Prozentsatz der detektierten Aktivität bezogen auf die maximale Aktivität im Experiment. Die Werte sind Mittelwerte von Dreifachbestimmungen \pm Standardabweichungen (Fehlerbalken).

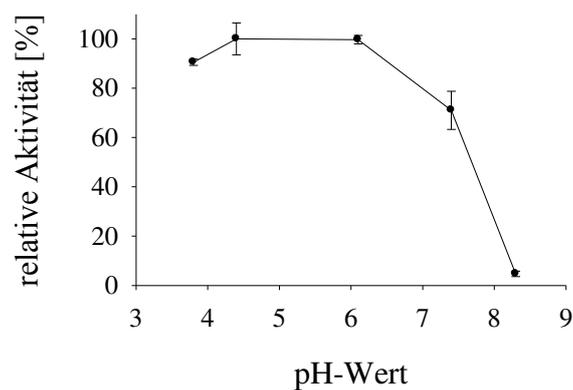


Abbildung 3.11: Effekt des pH-Werts auf die Stabilität der extrazellulären Peptidasen von Tve. Die Proben wurden zunächst 20 h bei 4 °C in verschiedenen Puffersystemen inkubiert (20 mM Milchsäure/30 mM β -Alanin pH 3,8; 40 mM Milchsäure/80 mM β -Alanin pH 4,4; 30 mM MES/30 mM Histidin pH 6,1; 35 mM HEPES/43 mM Imidazol pH 7,4; 25 mM Glycin/86 mM Tris pH 8,3). Die verbliebene Aktivität wurde in 100 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ pH 6 bestimmt. Der pH-Wert wurde in der Vorinkubation und dem Assay überprüft. Die relative Aktivität wurde definiert als der Prozentsatz der detektierten bezogen auf die maximale Aktivität im Experiment. Die Werte sind Mittelwerte von Doppelbestimmungen \pm Standardabweichungen (Fehlerbalken).

3.2.3 Analyse der Substratspezifität

Die Substrat- und Spaltspezifitäten der Peptidasen (von Gfr, Pch, Per, Posf, Sco und Tve) wurden mithilfe von synthetischen Substraten analysiert. Dafür wurden die Arginyl-Substrate Bz-Gly-Arg, Arg-*p*NA, Gly-Arg-*p*NA, Arg-Pro-*p*NA und Bz-Arg-*p*NA und als weitere Substrate Ala-*p*NA, Z-Gly-Pro-*p*NA, Z-Gly-Gly-Leu-*p*NA und *N*-Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-*p*NA verwendet. **Tabelle 3.5** gibt eine Übersicht über die Substrate und die damit zu detektierenden Peptidasen.

Wie in Kapitel 3.2.2 aufgeführt, lagen die pH-Optima der Peptidasegemische bei pH 5 bis 6. Dementsprechend wurde die Analyse der Substratspezifität bei pH 6 durchgeführt, sodass nur Peptidasen mit Aktivität im leicht Sauren detektiert werden konnten. Da arginylspezifische Endo- und Dipeptidyl-Peptidasen von besonderem Interesse waren, wurden die Aktivitätstests gegenüber den Substraten Bz-Arg-*p*NA und Gly-Arg-*p*NA zusätzlich bei pH 4 und 8 durchgeführt. Für alle Substrate wurden kommerzielle Peptidasen als Positivkontrollen mitgeführt.

Das Substrat Bz-Gly-Arg war nicht geeignet, um Peptidasen aus den Kulturüberständen zu detektieren. Das Absorptionsmaximum der im Assay peptidolytisch freigesetzten Hippursäure (bei 254 nm) überlagerte sich mit der hohen Eigenabsorption der Kulturüberstände. Daher war keine Signalzunahme messbar.

In **Tabelle 3.5** sind die Aktivitäten der sechs Basidiomyceten gegenüber den *p*NA-Substraten zusammengefasst. Die Arginyl-Substrate Arg-*p*NA, Gly-Arg-*p*NA und Bz-Arg-*p*NA wurden von keiner Probe hydrolysiert. Lediglich Arg-Pro-*p*NA wurde durch Peptidasen von Gfr, Per und Tve hydrolysiert. Die Spaltung dieses Substrats erfolgte C-terminal des Prolins und ist typisch für Prolyl-Dipeptidyl-Peptidasen (Exoaktivität). Peptidasen von Gfr und Tve hydrolysierten zusätzlich das Substrat Z-Gly-Pro-*p*NA, dessen Spaltung charakteristisch für Prolyl-Endopeptidasen ist. Die Proben von Posf, Sco und Tve zeigten Aktivität gegenüber *N*-Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-*p*NA, was auf Endopeptidasen der Chymotrypsin-Familie hindeutet. Des Weiteren wurde für Per und Posf mit dem Substrat Z-Gly-Gly-Leu-*p*NA Subtilisin-Aktivität nachgewiesen. Für Gfr, Pch, Posf und Tve deutet Aktivität gegenüber Ala-*p*NA auf eine Alanyl-Aminopeptidase hin.

Tabelle 3.5: Spaltung von *p*NA-Substraten mit den konzentrierten Peptidasegemischen von Gfr, Pch, Per, Posf, Sco und Tve. Aktivitäts-Assays bei 37 °C, über 60 min in 50 mM K₂HPO₄/KH₂PO₄ pH 6; Assays mit Bz-Arg- und Gly-Arg-*p*NA zusätzlich in 50 mM NaAc pH 4 und 50 mM Tris pH 8.

<i>p</i> NA-Substrat	Peptidasen, die das Substrat spalten			Aktive Proben	
	Peptidase	Familie	Präferierte Spaltstelle		
Ala- <i>p</i> NA	Exopeptidase	Alanyl-Aminopeptidase	M01	Ala in P1	Gfr, Pch, Posf, Tve
Arg- <i>p</i> NA		Aminopeptidase B Aminopeptidase N	M01 M01	Arg, Lys in P1 Ala, Arg, Lys in P1	–
Gly-Arg- <i>p</i> NA	Dipeptidyl- Peptidase	Dipeptidyl-Peptidase I Dipeptidyl-Peptidase II	C01 S28	Pro nicht in P1 oder P1', Arg nicht N-terminal Ala, Pro in P1	–
Arg-Pro- <i>p</i> NA		Dipeptidyl-Peptidase IV Dipeptidyl-Peptidase II	S09, S15 S28	Ala, Pro in P1, Pro nicht in P1' Ala, Pro in P1	Gfr, Per, Tve
Z-Gly-Pro- <i>p</i> NA	Endopeptidase	Prolyl-Endopeptidase	S06, S08, S28	Pro in P1	Gfr, Tve
Bz-Arg- <i>p</i> NA		Endopeptidasen der Trypsin-Familie	S01	Arg, Lys in P1	–
Z-Gly-Gly-Leu- <i>p</i> NA		Subtilisin, Neutrale Endopeptidase	S08	Hydrophobe AS in P1, Hydrophobe AS in P1'	Per, Posf
<i>N</i> -Suc-Ala-Ala-Pro-Phe- <i>p</i> NA		Chymotrypsin- oder Subtilisin-Endopeptidase	S01, S08	Hydrophobe AS in P1	Posf, Sco, Tve

Angaben nach der MEROPS-Datenbank (Rawlings *et al.*, 2014); Nomenklatur der Spaltstelle nach Schechter und Berger (1967), siehe auch **Abbildung 1.3**; AS – Aminosäure.

3.3 Hydrolyseexperimente zur Freisetzung salzgeschmacksverstärkender Peptide

Es erfolgten Hydrolyseexperimente mit dem Ziel der Freisetzung salzgeschmacksverstärkender Peptide. Die Kulturüberstände des Gfr, Pch, Per, Posf, Sco und Tve wurden als komplexe Gemische von Peptidasen eingesetzt. Folgende Hydrolyseversuche wurden aktivitätsnormiert (gleiche Azocasein-Aktivitäten) durchgeführt, sofern nicht anders vermerkt ist. Milch- und Eiklarproteine stellen auf die Milchindustrie ausgelegte Präkursor-Proteine zur Generierung von salzgeschmacksverstärkenden Peptiden dar. Daher wurden in den folgenden Hydrolyseexperimenten Casein und Lysozym als Modellsubstrate verwendet.

3.3.1 Gelelektrophoretische Analysen der Hydrolysate

Casein und Lysozym wurden mit den Peptidasegemischen von Gfr, Pch, Per, Posf, Sco und Tve hydrolysiert. Nach unterschiedlicher Inkubationszeit wurden die Casein- und Lysozymhydrolysate mittels SDS-PAGE analysiert. Dies ist beispielhaft für die Peptidasen von Tve in **Abbildung 3.12** dargestellt. Die Proteinmuster der Caseinhydrolysate glichen sich für alle sechs Basidiomyceten. Für alle Proben wurden nach einer Stunde Inkubation mit den basidiomycetischen Peptidasegemischen keine Caseinbanden mehr detektiert. Allerdings wurde weiterhin unlösliches Casein als Pellet beobachtet (vgl. Kapitel 3.3.2). Bei der Hydrolyse von Lysozym entstanden durch die verschiedenen Peptidasegemische unterschiedliche Peptidmuster. Im Fall von Pch, Sco und Tve lag nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden noch intaktes Lysozym vor, während die entsprechende Bande (14 kDa) für Gfr, Per und Posf nicht mehr auftrat.

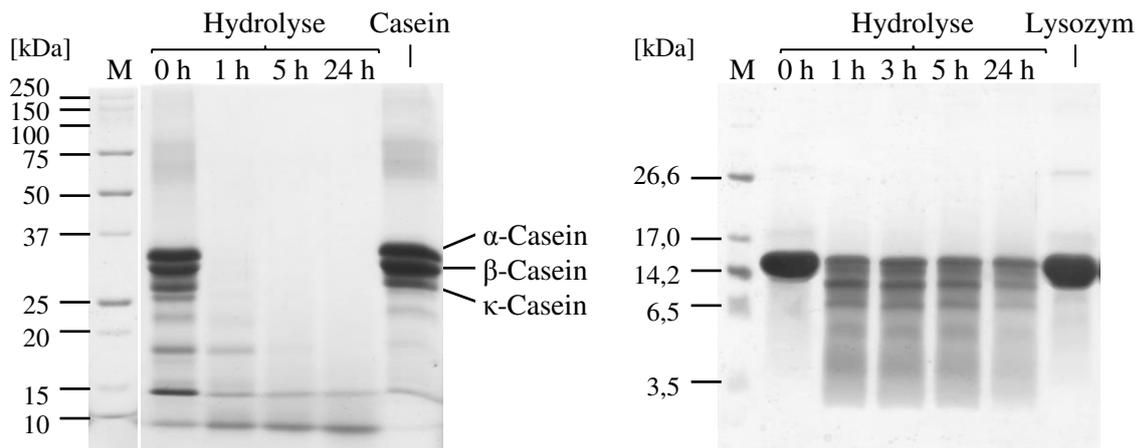


Abbildung 3.12: SDS-PAGE der Hydrolysate von Casein (links) und Lysozym (rechts). Inkubation der Substrate mit Peptidasen von Tve für 0, 1, 3, 5 und 24 h bei 37 °C in 50 mM NaAc pH 6.

3.3.2 Effekt der Peptidolyse auf die Löslichkeit des Caseins

Die Hydrolyseexperimente wurden bei pH 6 durchgeführt, wo Casein eine geringe Löslichkeit aufweist. Mit steigender Inkubationszeit nahm das unlösliche Substratpellet ab. Dies war nach dem Zentrifugieren der Hydrolyseansätze bereits visuell erkennbar (**Abbildung 3.13**). Die zunehmende Löslichkeit wurde außerdem mittels Proteinbestimmung dokumentiert. Nach 24 Stunden der Hydrolyse waren für alle sechs Basidiomyceten 88 bis 97 % der anfänglichen Pellets in Lösung gebracht (**Abbildung 3.14**). Für Pch, Per, Posf, Sco und Tve stieg die Löslichkeit nach 5 Stunden um mehr als 50 %. Nur in der Peptidolyse mit Peptidasen von Gfr nahm die Löslichkeit des Caseins vergleichsweise langsam zu. Nach 5 Stunden blieben noch über 90 % des ursprünglichen Pellets unlöslich.

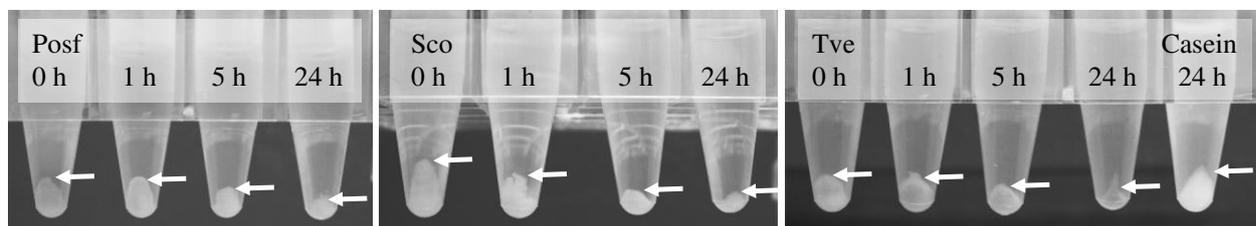


Abbildung 3.13: Abnahme des unlöslichen Caseins im Verlauf der Hydrolyse am Beispiel der Hydrolyseansätze des Posf, Sco und Tve. Die Hydrolyse des Caseins fand in 50 mM NaAc pH 6 für 0, 1, 5 und 24 h statt. Es wurde ein Kontrollansatz ohne Enzymzusatz mitgeführt (rechts).

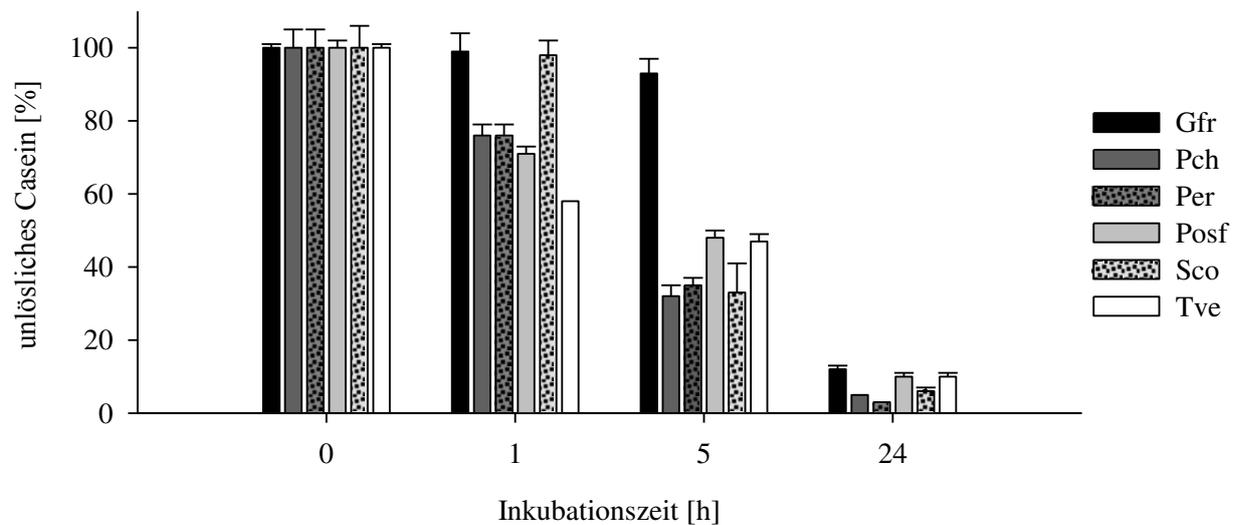


Abbildung 3.14: Effekt der Hydrolyse auf die Löslichkeit des Caseins. Das unlösliche Casein wurde als Prozentsatz des zu Beginn der Hydrolyse unlöslichen Caseins dargestellt. Die Hydrolyse des Caseins fand in 50 mM NaAc pH 6 für 0, 1, 5 und 24 h statt. Die Werte sind Mittelwerte von Dreifachbestimmungen \pm Standardabweichungen (Fehlerbalken).

3.3.3 Hydrolysegrade der Casein- und Lysozymhydrolyse

Der Hydrolysegrad (DH) ein gängiger Indikator für den Fortschritt der Hydrolyse, wurde nach 1; 5 und 24 Stunden der enzymatischen Hydrolyse von Casein und Lysozym bestimmt. Der DH nahm mit zunehmender Inkubationszeit signifikant zu und erreichte nach 24 Stunden 14 bis 29 % (**Tabelle 3.6**). In dieser Arbeit repräsentiert ein hoher Hydrolysegrad hohe Konzentrationen freier L-Aminosäuren. Für die beiden Substrate Casein und Lysozym wurden jeweils ähnliche DH nach 24 Stunden der Inkubation mit Gfr (16 %), Sco (21 bis 22 %) und Tve (18 %) erreicht. Im Gegensatz dazu führten Peptidasen von Pch, Per und Posf in der Caseinhydrolyse zu einem um 5 bis 10 Prozentpunkte höheren DH.

Tabelle 3.6: Hydrolysegrad (DH in %) der Casein- und Lysozymhydrolysate nach 0, 1, 5 und 24 h Inkubation mit Peptidasen von Gfr, Pch, Per, Posf, Sco und Tve. Die Werte sind Mittelwerte von Doppelbestimmungen \pm Standardabweichungen.

Substrat Zeit [h]		DH [%]					
		Gfr	Pch	Per	Posf	Sco	Tve
Casein	0	0 \pm 0,3	0 \pm 0,3	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0,4	0 \pm 0,2
	1	1,4 \pm 0,2	3,9 \pm 0,3	1,5 \pm 0	2,3 \pm 0,2	2,9 \pm 0,6	2,0 \pm 0,2
	5	7,5 \pm 0,7	12,5 \pm 0,4	4,9 \pm 0,4	6,6 \pm 0,1	9,9 \pm 0,5	6,0 \pm 0,1
	24	15,9 \pm 0,4	29,1 \pm 0,3	18,8 \pm 0,9	21,8 \pm 0,7	21,0 \pm 0,3	17,9 \pm 0,7
Lysozym	0	0 \pm 0,2	0 \pm 0,1	0 \pm 0,1	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0,1
	1	2,3 \pm 0,2	0,6 \pm 0,2	0,7 \pm 0,1	0,3 \pm 0,1	1,7 \pm 0,2	0,8 \pm 0,2
	5	5,6 \pm 0,5	2,3 \pm 0,1	5,8 \pm 0,1	2,2 \pm 0,1	10,9 \pm 0,4	5,7 \pm 0,2
	24	15,8 \pm 2,1	16,0 \pm 0,2	14,3 \pm 0,4	12,3 \pm 1,9	22,0 \pm 0,6	17,6 \pm 0,1

3.3.4 Freisetzung von L-Aminosäuren

Um Rückschlüsse auf die Art der Peptidasen und ihre Spaltspezifitäten zu erhalten, wurden die L-Aminosäuren der Hydrolysate quantifiziert. Ganz allgemein wurde für die sechs Basidiomyceten (Gfr, Pch, Per, Posf, Sco und Tve) eine Freisetzung von L-Aminosäuren gezeigt. Der Gehalt aller detektierten Aminosäuren stieg mit zunehmender Inkubationszeit in dem analysierten Zeitraum (0, 1, 5, und 24 Stunden). Nach 24 Stunden der Hydrolyse lagen die aufsummierten Konzentrationen aller L-Aminosäuren bei 1,1 bis 2,0 mmol g⁻¹ Casein und 1,0 bis 1,8 mmol g⁻¹ Lysozym. Für Gfr, Pch, Per, Posf und Sco waren die hauptsächlich freigesetzten Aminosäuren in der Caseinhydrolyse L-Lysin, L-Leucin und L-Glutaminsäure jeweils mit 117 bis 257 μ mol g⁻¹ Substrat. Diese Aminosäuren stellen die drei häufigsten Bausteine des Caseins dar. In den Lysozymhydrolysaten des Gfr, Per, Posf, Sco und Tve wurden besonders L-Arginin, L-Lysin, L-Leucin und L-Alanin detektiert, jeweils mit 85 bis 258 μ mol g⁻¹ Substrat. Abgesehen von L-Lysin stellen diese Aminosäuren die Hauptbestandteile des Lysozyms dar. Außerdem wurde bevorzugt L-Phenylalanin aus Casein mittels Tve und L-Glutaminsäure aus Lysozym mittels Pch freigesetzt.

3.3.5 Freisetzung von L-Arginyl-Dipeptiden

L-Arginyl-Dipeptide sind bereits bekannte Salzgeschmacksverstärker in Proteinhydrolysaten. Ihr Gehalt wurde in den erzeugten Hydrolysaten mittels hochauflösender LC-MS/MS bestimmt. In der Analytik wurde die Position des Arginins im Dipeptid (N- oder C-terminal) nicht für alle Peptide bestimmt. Die Dipeptide RX und XR, wobei X eine beliebige Aminosäure und R die Aminosäure Arginin repräsentiert, wurden in manchen Fällen also nicht voneinander unterschieden. Daher wurden in dieser Arbeit alle Arginyl-Dipeptide paarweise (RX/XR) dargestellt. Schindler *et al.* (2011) beschrieben L-Arginyl-Dipeptide mit verstärkendem oder inhibierendem Effekt auf den Salzgeschmack. Außerdem variierten die L-Arginyl-Dipeptide in ihrer Wirkungsstärke (vgl. **Abbildung 1.2**). Beispielsweise war der aktivierende Effekt von RA deutlich höher als der von RK (Schindler *et al.*, 2011). Daher wurden in den folgenden Tabellen und Abbildungen die L-Arginyl-Dipeptide entsprechend ihrer Aktivität angeordnet. Es ist zu beachten, dass innerhalb eines Paares von Arginyl-Dipeptiden (RX/XR) die Bioaktivität ebenfalls etwas variieren kann (vgl. **Abbildung 1.2**).

3.3.5.1 Berechnung der maximalen Freisetzungen von L-Arginyl-Dipeptiden

Für die beiden Modellsubstrate Casein und Lysozym wurden die maximalen Ausbeuten aller L-Arginyl-Dipeptide kalkuliert. Mithilfe der Aminosäuresequenzen wurde ermittelt, welche Aminosäuren N- bzw. C-terminal der Argininreste vorkommen. Somit wurden die möglichen L-Arginyl-Dipeptide und ihre maximalen Stoffmengen pro Gramm Substrat bestimmt. Die Aminosäuresequenzen der Substrate und die Rechnung sind im Anhang (Kapitel 7.2.1) detaillierter aufgeführt. **Abbildung 3.15** verdeutlicht, dass die maximalen Ausbeuten der Zielmoleküle für Lysozym insgesamt höher sind als für Casein. Das erklärt sich durch den höheren Gehalt an L-Arginin im Lysozym verglichen mit Casein (vgl. **Tabelle 3.2**). Aus Casein kann demgegenüber eine größere Anzahl verschiedener L-Arginyl-Dipeptide gebildet werden.

Diese theoretische Betrachtung wurde für die Modellsubstrate Casein und Lysozym durchgeführt, nicht aber für die alternativ verwendeten Substrate (Gelatine, Erbsen-, Reis- und Sojaproteine). Die alternativen Substrate stellen sehr komplexe Proteingemische dar, deren exakte Zusammensetzung nicht bekannt war.

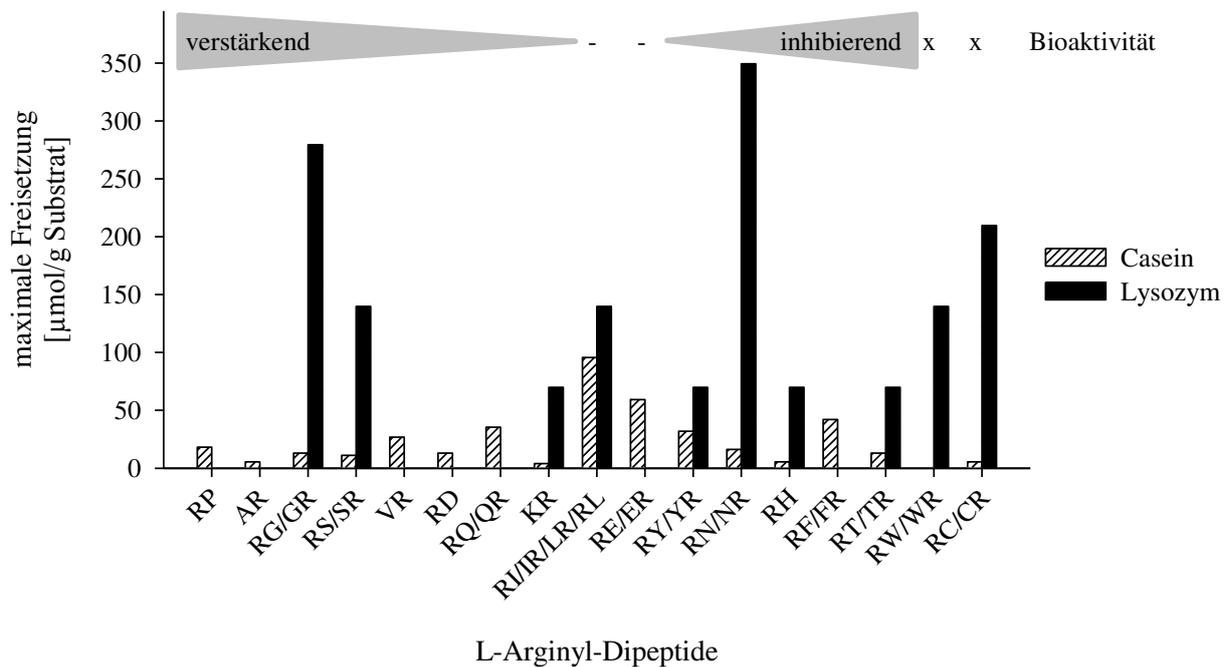


Abbildung 3.15: Berechnete maximale Ausbeuten an L-Arginyl-Dipeptiden aus den Substraten Casein und Lysozym. Effekt der L-Arginyl-Dipeptide auf den Salzgeschmack nach Schindler *et al.* (2011): verstärkend, inhibierend, keine Veränderung (-), Effekt nicht bestimmt (x).

3.3.5.2 Enzymatische Freisetzung von L-Arginyl-Dipeptiden

In grundlegenden Versuchen sollte zunächst untersucht werden, ob Peptidasen aus Basidiomyceen salzgeschmacksverstärkende L-Arginyl-Dipeptide aus den Milch- und Eiklarproteinen freisetzen. Dafür wurden mit den peptidasereichen Stämme Posf und Tve 24-stündige Hydrolysen durchgeführt. Die Peptidasegemische von Posf und Tve wurden nicht aktivitätsnormiert zueinander eingesetzt.

Mit den Peptidasen von Posf und Tve wurden die Substrate Casein, Molkenproteine und Lysozym hydrolysiert. In allen Hydrolysen wurden L-Arginyl-Dipeptide bestimmt. Aus Lysozym wurden insgesamt die höchsten Gehalte an L-Arginyl-Dipeptiden freigesetzt und aus Casein die geringsten. Auf das Profil der mittels Tve freigesetzten L-Arginyl-Dipeptide wird weiter hinten (**Tabelle 3.7** und **Tabelle 3.8**) eingegangen. Die Peptidasen des Posf wurden aufgrund ihres Freisetzungsprofils als ungeeignet erachtet. So wurden in der Lysozymhydrolyse zwar L-Arginyl-Dipeptide frei, jedoch waren rund 70 % der L-Arginyl-Dipeptide RN/NR und RH/HR, die einen inhibierenden Effekt auf den Salzgeschmack haben (**Abbildung 3.16**).

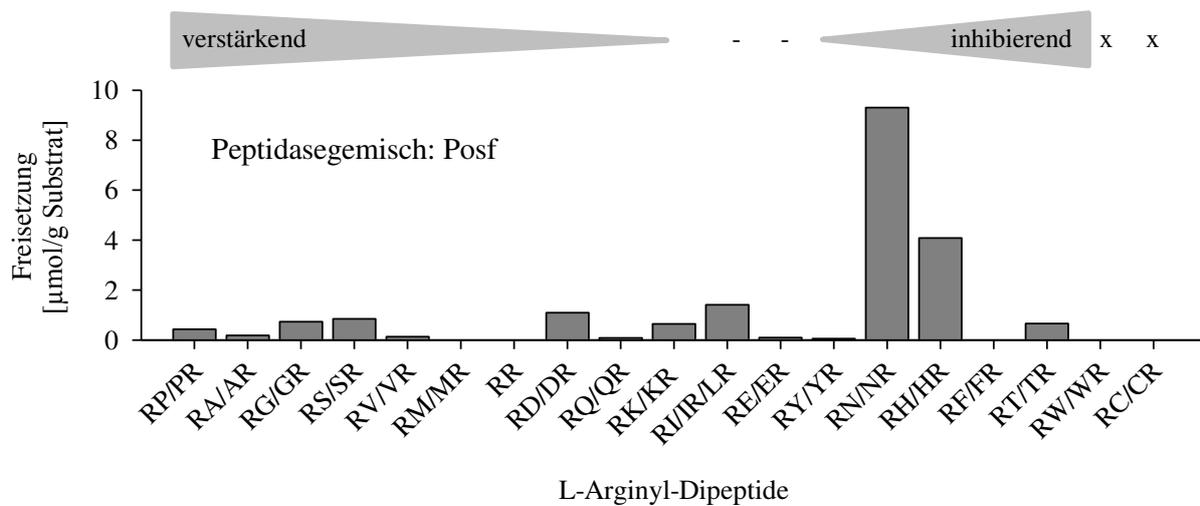


Abbildung 3.16: Gehalt an L-Arginyl-Dipeptiden in Lysozymhydrolysaten des Posf. Effekt auf den Salzgeschmack nach Schindler *et al.* (2011): verstärkend, inhibierend, keine Veränderung (-), Effekt nicht bestimmt (x). 24-stündige Hydrolysen; die Werte sind Mittelwerte von Doppelbestimmungen.

Es folgten umfassende Analysen für die Basidiomyceten Gfr, Pch, Per, Sco und Tve. Mit ihnen wurden 24-stündige Hydrolysen der Modellsubstrate Casein und Lysozym sowie alternativer Substrate (Gelatine, Erbsen-, Reis- und Sojaproteine) durchgeführt. Im Hinblick auf die angestrebte Anwendung in Milchprodukten waren die Modellsubstrate von besonderem Interesse. Dennoch sollten auch andere *food-grade* Proteine, die verglichen mit Casein höhere Gehalte an Arginin haben (siehe **Tabelle 3.2**), analysiert werden. Um die Versuche möglichst vergleichbar zu gestalten und Aussagen zur Dipeptidfreisetzung aus verschiedenen Substraten sowie mittels verschiedener Peptidasegemische machen zu können, wurden alle Ansätze aktivitätsnormiert (Azocasein-Aktivität) durchgeführt. Um die Daten vereinfacht zu vergleichen, wurden die freigesetzten L-Arginyl-Dipeptide für jeden Ansatz aufsummiert (**Abbildung 3.17**). In allen Hydrolyseexperimenten wurden L-Arginyl-Dipeptide freigesetzt.

Die Summe aller freigesetzten L-Arginyl-Dipeptide unterschied sich insbesondere in Abhängigkeit des gewählten Substrats. Aus Lysozym wurden für alle Basidiomyceten die höchsten Stoffmengen von 43 bis 75 $\mu\text{mol g}^{-1}$ freigesetzt. Die anderen Substrate (Casein, Gelatine, Erbsen-, Reis- und Sojaproteine) ergaben maximal 13 $\mu\text{mol g}^{-1}$. Für Erbsen-, Reis- und Sojaproteine ähnelten sich die Freisetzungen (4 bis 13 $\mu\text{mol g}^{-1}$). Besonders wenige L-Arginyl-Dipeptide wurden aus Gelatine (2 bis 6 $\mu\text{mol g}^{-1}$) und Casein (max. 3,5 $\mu\text{mol g}^{-1}$) gebildet. Aus dem Modellsubstrat Lysozym wurden somit mindestens um den Faktor 20 mehr L-Arginyl-Dipeptide freigesetzt als aus Casein.

Die enzymatische Hydrolyse des Caseins ergab weniger als 2 % der berechneten maximalen Ausbeuten (Kapitel 3.3.5.1), während es für Lysozym 6 bis 10 % waren (**Abbildung 3.17**).

Außerdem variierten die Produktausbeuten in Abhängigkeit vom eingesetzten Peptidasegemisch. Für alle Substrate führten die Peptidasegemische von Gfr und Sco zu den geringsten Freisetzungen von L-Arginyl-Dipeptiden. Mit Peptidasen von Tve wurden für die meisten Substrate die höchsten Ausbeuten erzielt. Prinzipiell nahmen die freigesetzten L-Arginyl-Dipeptide für die meisten Substrate in der Reihe Gfr, Sco, Per, Pch und Tve zu (**Abbildung 3.17**). Die Stoffmengen der insgesamt freigesetzten L-Arginyl-Dipeptide unterschieden sich in Abhängigkeit der Peptidasen maximal um den Faktor 4,6. Die insgesamt höchsten Stoffmengen an L-Arginyl-Dipeptiden wurden in den Lysozymhydrolysaten des Tve und Pch beobachtet; beide ergaben Ausbeuten von rund 10 %.

In allen Hydrolysaten wurden salzgeschmacksverstärkende sowie inhibierende Peptide detektiert. Bislang ist für 14 der L-Arginyl-Dipeptide eine Salzgeschmacksverstärkung in NaCl-Lösung beschrieben (Schindler *et al.*, 2011). Dies waren RP, RA, AR, RG, RS, RV, VR, RM, RR, RD, MR, RQ, RK und KR. Der Gehalt an salzgeschmacksverstärkenden Arginyl-Dipeptiden wurde daher als Summe der folgenden Dipeptid-Paare näherungsweise kalkuliert: RP/PR, RA/AR, RG/GR, RS/SR, RV/VR, RM/MR, RR, RD/DR, RQ/QR und RK/KR. Diese Summe war in allen Hydrolysaten unter $1 \mu\text{mol g}^{-1}$ Casein bzw. zwischen 19 und $48 \mu\text{mol g}^{-1}$ Lysozym (**Abbildung 3.17**).

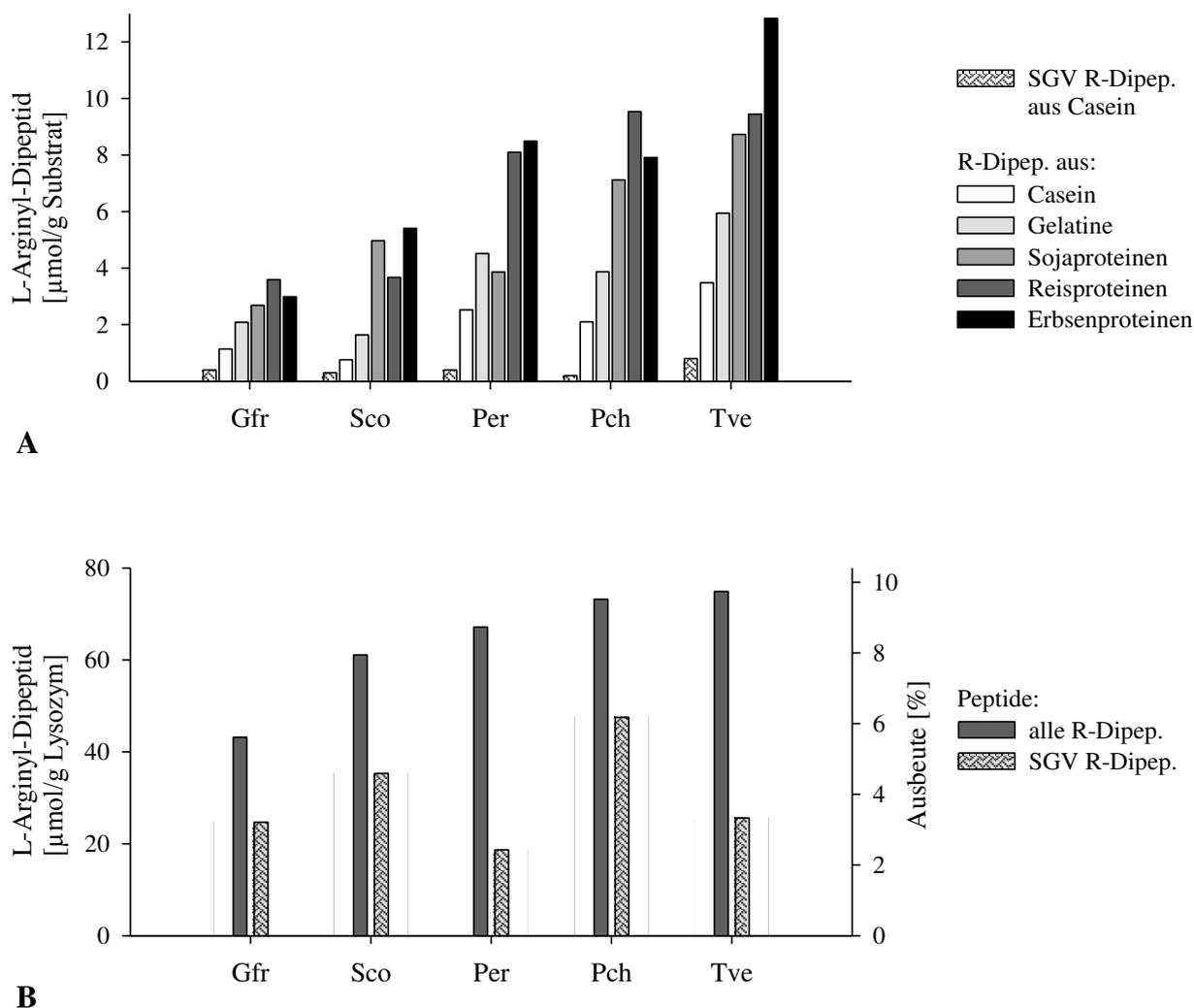


Abbildung 3.17: Summe der freigesetzten L-Arginyl-Dipeptide. Hydrolysate nach 24-stündiger Inkubation mit Peptidasen von Gfr, Pch, Per, Sco und Tve. **A:** Summen aller L-Arginyl-Dipeptide (R-Dipep.) aus Casein, Gelatine, Soja-, Reis- und Erbsenproteinen sowie Summen der salzgeschmacksverstärkenden L-Arginyl-Dipeptide (SGV R-Dipep.) aus Casein. **B:** Summen aller bzw. der salzgeschmacksverstärkenden L-Arginyl-Dipeptide (R-Dipep. bzw. SGV R-Dipep.) aus Lysozym. Darstellung der Stoffmengen und der prozentualen Anteile an der berechneten maximalen Ausbeute (Kapitel 3.3.5.1).

Detailliertere Darstellungen der quantifizierten L-Arginyl-Dipeptide sind **Tabelle 3.7** (Casein), **Tabelle 3.8** (Lysozym) und dem Anhang (Kapitel 7.2.2, Gelatine, Erbsen-, Reis- und Sojaproteine) zu entnehmen. Innerhalb der aktivitätsnormierten Proben ähnelten sich die Muster der freigesetzten L-Arginyl-Dipeptide für alle Basidiomyceten, sofern die gleichen Substrate hydrolysiert wurden. Für Casein waren die hauptsächlich freigesetzten L-Arginyl-Dipeptide RL/RI/IR oder RE/ER (bis zu $1,4 \mu\text{mol g}^{-1}$), die keinen signifikanten Einfluss auf den Salzgeschmack haben. Aus Lysozym wurden besonders die Salzgeschmacksverstärker RG/GR mit 7 bis $23 \mu\text{mol g}^{-1}$ und

RS/SR mit 1 bis 5 $\mu\text{mol g}^{-1}$ gebildet. Andererseits wurden in allen Lysozymhydrolysaten auch einige L-Arginyl-Dipeptide mit inhibierendem Effekt auf den Salzgeschmack detektiert. Dies waren für Pch, Per, Sco und Tve hauptsächlich RH/HR mit 9-36 $\mu\text{mol g}^{-1}$. Für Per und Tve ergaben sich außerdem erhöhte Gehalte (8 $\mu\text{mol g}^{-1}$) RW/WR, welche stark bitter sind (Schindler *et al.*, 2011).

Tabelle 3.7: Freisetzung einzelner L-Arginyl-Dipeptide aus Casein nach 24-stündiger Hydrolyse mit Peptidasen von Gfr, Pch, Per, Sco und Tve. Effekt auf den Salzgeschmack nach Schindler *et al.* (2011): verstärkend, inhibierend, keine Wirkung (-), Effekt nicht bestimmt (x). Die höchsten Konzentrationen der Salzgeschmacksverstärker sind fett hervorgehoben.

Aktivität	Dipeptide	Freisetzung [$\mu\text{mol g}^{-1}$ Casein]*				
		Gfr	Pch	Per	Sco	Tve
verstärkend	RP/PR	0,232	0,221	0,321	0,048	0,394
	RA/AR	0,003	0,002	0,001	0,002	0,007
	RG/GR	0,012	0,009	0,006	0,011	0,004
	RS/SR	0,100	0,056	0,023	0,086	0,031
	RV/VR	0,190	0,024	0,174	0,165	0,416
	RM/MR	< 0,001	0,012	0,002	0,003	0,006
	RR	< 0,001	< 0,001	< 0,001	0,002	< 0,001
	RD/DR	0,029	0,040	0,153	0,013	0,192
	RQ/QR	0,051	0,035	0,100	0,032	0,122
	RK/KR	< 0,001	0,011	< 0,001	< 0,001	0,004
-	RL/RI/IR	< 0,001	1,422	1,300	0,085	1,379
-	RE/ER	0,316	0,072	0,082	0,188	0,616
inhibierend	RY/YR	< 0,001	< 0,001	0,011	< 0,001	< 0,001
	RF/FR	0,032	0,102	0,278	0,009	0,101
	RN/NR	< 0,001	0,047	< 0,001	< 0,001	0,023
	RH/HR	< 0,001	0,016	0,053	< 0,001	0,168
	RT/TR	0,175	0,028	0,020	0,115	0,023
x	RW/WR	0,001	< 0,001	0,001	0,001	< 0,001
x	RC/CR	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001

* Freisetzung = Differenz der Werte nach 0 und 24 Stunden der Hydrolyse. Es wurden Doppelbestimmungen durchgeführt.

Tabelle 3.8: Freisetzung einzelner L-Arginyl-Dipeptide aus Lysozym nach 24-stündiger Hydrolyse mit Peptidasen von Gfr, Pch, Per, Sco und Tve. Effekt auf den Salzgeschmack nach Schindler *et al.* (2011): verstärkend, inhibierend, keine Wirkung (-), Effekt nicht bestimmt (x). Die Konzentrationen besonders effektiver Salzgeschmacksverstärker sind fett hervorgehoben.

Aktivität	Dipeptide	Freisetzung [$\mu\text{mol g}^{-1}$ Lysozym]*				
		Gfr	Pch	Per	Sco	Tve
verstärkend	RP/PR	0,367	0,171	0,199	0,344	0,097
	RA/AR	0,309	0,372	0,468	0,515	0,364
	RG/GR	12,317	22,573	7,330	16,497	12,734
	RS/SR	2,763	4,547	1,233	4,019	3,403
	RV/VR	0,249	1,229	0,579	0,522	0,534
	RM/MR	0,491	0,428	0,058	0,480	0,317
	RR	0,641	1,259	0,365	0,408	0,499
	RD/DR	7,820	16,541	8,690	12,443	7,453
	RQ/QR	0,203	0,502	0,283	0,363	0,393
	RK/KR	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001
-	RL/RI/IR	7,728	2,139	2,105	5,714	7,192
-	RE/ER	0,289	0,688	0,292	0,370	0,372
inhibierend	RY/YR	1,657	2,813	0,461	2,114	0,529
	RF/FR	0,036	0,078	0,042	0,135	0,180
	RN/NR	2,499	0,806	0,675	2,827	1,051
	RH/HR	2,039	16,471	35,612	9,156	30,255
	RT/TR	0,612	0,726	0,331	0,897	0,542
x	RW/WR	2,564	1,017	7,986	3,401	8,255
x	RC/CR	0,590	0,849	0,451	0,901	0,737

* Freisetzung = Differenz der Werte nach 0 und 24 Stunden der Hydrolyse. Es wurden Doppelbestimmungen durchgeführt.

Das Freisetzungsmuster der L-Arginyl-Dipeptide aus den alternativen Substraten soll nur kurz erwähnt werden, da insgesamt geringe Mengen frei wurden. In Hydrolysaten von Erbsen-, Reis- und Sojaproteinen ähnelten sich die L-Arginyl-Dipeptide und es überwogen: RA/AR, RG/GR, RS/SR, RL/LR/RI/IR und RE/ER. Somit wurden besonders Peptide mit verstärkender bzw. ohne Wirkung auf den Salzgeschmack gebildet. Für Gelatinehydrolysate überwogen die salzgeschmacksverstärkenden Peptide RA/AR, RG/GR und RQ/QR (Anhang: **Abbildung 7.2**).

Die Hydrolyseexperimente zur Freisetzung von L-Arginyl-Dipeptiden wurden standardmäßig mit einer Inkubationszeit von 24 Stunden durchgeführt. Um nun den Einfluss der Inkubationsdauer auf den Gehalt der Zielmoleküle zu bestimmen, wurden zeitlich gestufte Hydrolysen durchgeführt. Dafür wurden Peptidasen von Tve und das Substrat Lysozym verwendet, mit denen zuvor die höchsten Gehalte an L-Arginyl-Dipeptiden insgesamt erreicht wurden. Innerhalb von 18 Stunden (neun analysierte Zeitpunkte) nahm mit steigender Inkubationszeit die Summe aller L-Arginyl-Dipeptide kontinuierlich zu (**Abbildung 3.18**). Im gewählten Zeitraum wurden somit nach 18 Stunden maximale Freisetzungen von $55 \mu\text{mol g}^{-1}$ erreicht. Innerhalb der ersten 140 min (fünf Datenpunkte) verlief der Anstieg der L-Arginyl-Dipeptide linear (Bestimmtheitsmaß $> 0,97$) und flachte dann etwas ab. Die Hydrolysate unterschieden sich kaum qualitativ, da nahezu alle der einzelnen L-Arginyl-Dipeptide mit der Zeit zunahmen (Daten nicht gezeigt).

Es wurden Substrat-Blindwerte (ohne Enzym) und Enzym-Blindwerte (ohne Substrat) mitgeführt. In den Substrat-Blindwerten blieb die Konzentration an L-Arginyl-Dipeptiden unverändert niedrig ($0,1 \mu\text{mol g}^{-1}$). Die reinen Enzymproben setzten geringe Mengen ($< 4,5 \mu\text{mol g}^{-1}$) an L-Arginyl-Dipeptiden frei. Die Werte stiegen bis 100 min an und blieben dann nahezu konstant.

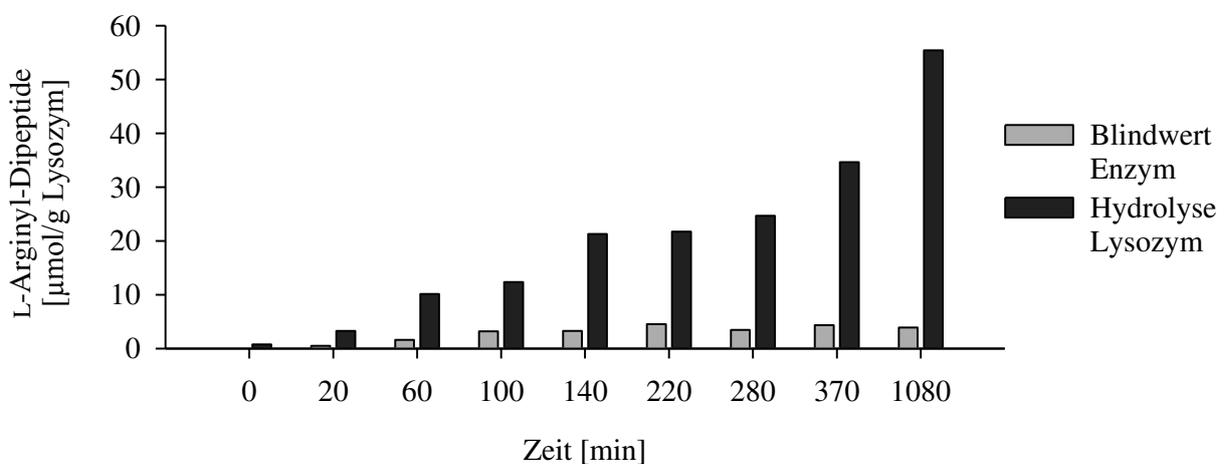


Abbildung 3.18: Summe aller L-Arginyl-Dipeptide im Verlauf der Hydrolyse mittels Peptidase des Tve. Freisetzung der Peptide aus Lysozym (schwarz) bzw. aus der Enzymlösung (Enzym-Blindwert ohne Substrat, grau).

3.3.6 Humansensorische Untersuchungen der Lysozymhydrolysate

Die höchsten Gehalte an Arginyl-Dipeptiden waren in den Lysozymhydrolysaten enthalten. Sie wurden als Proben in den Sensorikversuchen eingesetzt. Dabei wurde für alle Lysozymhydrolysate zunächst eine Profilsensorik durchgeführt, um deren Grundgeschmack in Wasser zu bewerten. Keine der Proben war salzig (**Tabelle 3.9, Abbildung 3.19**). Für die Proben von Gfr, Pch und Sco

wurde ein stark bitterer Geschmack wahrgenommen, während Per und Tve nur eine leichte Bitterkeit aufwiesen. Lediglich für Gfr wurde die Geschmacksrichtung umami festgestellt. Hydrolysate von Per, Sco und Tve waren außerdem süß. Zudem wirkten alle Hydrolysate außer dem von Pch adstringierend (**Abbildung 3.19**).

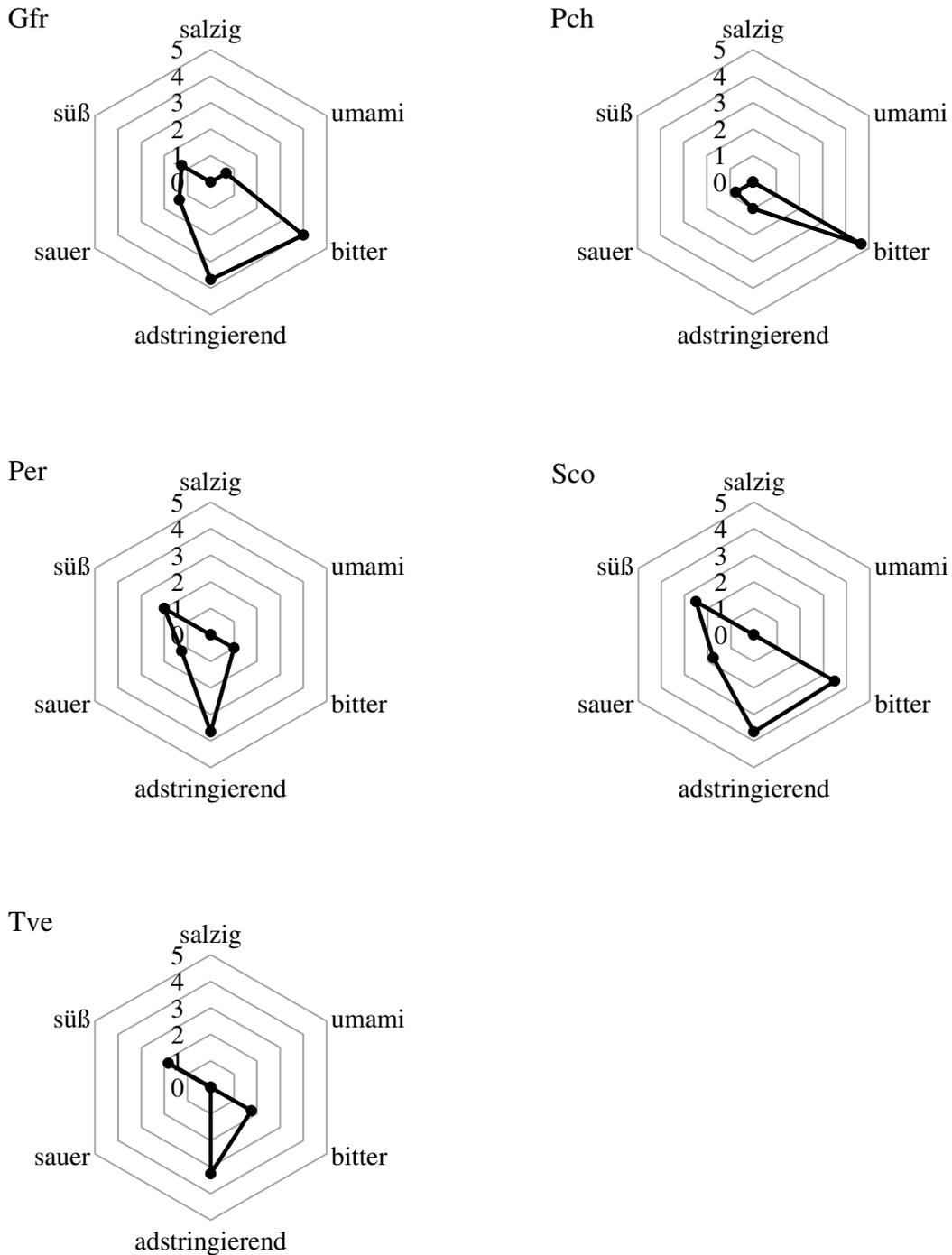


Abbildung 3.19: Beurteilung der Grundgeschmäcke und Adstringenz der Lysozymhydrolysate in Wasser auf einer Skala von 0 (nicht vorhanden) bis 5 (stark ausgeprägt). Es wurden Hydrolysate nach 24-stündiger Inkubation mit Peptidasegemischen von Gfr, Pch, Per, Sco und Tve verkostet.

Um zu bestimmen, ob die Hydrolysate den Salzgeschmack verstärken können, wurden sie in salzhaltigen (50 mM NaCl) Matrices verkostet. Die Hydrolysate wurden in einer synthetischen Käsematrix, welche die geschmacksaktiven Schlüsselkomponenten von Gouda enthielt, sowie in einer Matrix aus verdünntem Magerquark evaluiert. Die Grundgeschmäcke aller Hydrolysate waren in den Verkostungsmatrices weniger wahrnehmbar als in der Profilsensorik. Die starke Adstringenz der Proben wurde ebenfalls weniger intensiv wahrgenommen.

Die Hydrolysate wurden zunächst in einer Käsematrix verkostet (0,5 % (w/v)). Das Hydrolysat des Tve zeigte eine signifikante salzgeschmacksverstärkende Wirkung ($\alpha < 0,05$), während die anderen Hydrolysate keinen signifikanten Einfluss auf den Salzgeschmack hatten.

Außerdem wurden die Lysozymhydrolysate in einer Quarkmatrix evaluiert (0,5 % (w/v)). In dieser Verkostungsmatrix ergab sich ein salzgeschmacksverstärkender Effekt für die Hydrolysate des Gfr ($\alpha < 0,02$) und des Tve ($\alpha < 0,16$). Fünf der 18 Probanden gaben an, dass das Hydrolysat des Tve den Salzgeschmack effektiver verstärkte als das des Gfr. Alle Ergebnisse der Verkostungen hinsichtlich des Salzgeschmacks sind in **Tabelle 3.9** zusammengefasst.

Tabelle 3.9: Beurteilung der Salzigkeit verschiedener Lysozymhydrolysate. Die Hydrolysate wurden in Wasser, Käsematrix mit 50 mM NaCl bzw. Quark mit 50 mM NaCl verkostet. Es wurde ein paarweiser Vergleichstest einer Referenz (ohne Zusatz von Hydrolysat) mit einer Probe (mit Zusatz von Hydrolysat) durchgeführt. – Proben waren nicht salziger als die Referenz, + Proben waren salziger als die Referenz.

Probe	Wahrnehmung einer stärkeren Salzigkeit		
	in Wasser	in salzhaltiger Käsematrix	in salzhaltigem Quark
Gfr	–	–	+
Pch	–	–	–
Per	–	–	–
Posf	–	Keine Angabe	–
Sco	–	–	–
Tve	–	+	+

Zusätzlich wurde für Tve in erneuten Seorikexperimenten der salzmodulierende Effekt des Lysozymhydrolysats in Abhängigkeit von dessen Konzentration im Magerquark analysiert (12 Probanden). Bei erhöhten Gehalten (2,5 % (w/v)) dominierte der süße Eigengeschmack des Hydrolysats. Es wurde keine signifikante salzgeschmacksverstärkende Wirkung wahrgenommen. Bei 0,5 und 0,1 % (w/v) wurde dagegen der Salzgeschmack verstärkt. Mit abnehmender Konzentration nahm die Irrtumswahrscheinlichkeit ab. Sie lag für 0,5 % bei $\alpha < 0,1$ und für 0,1 % bei $\alpha < 0,05$ (**Abbildung 3.20**).

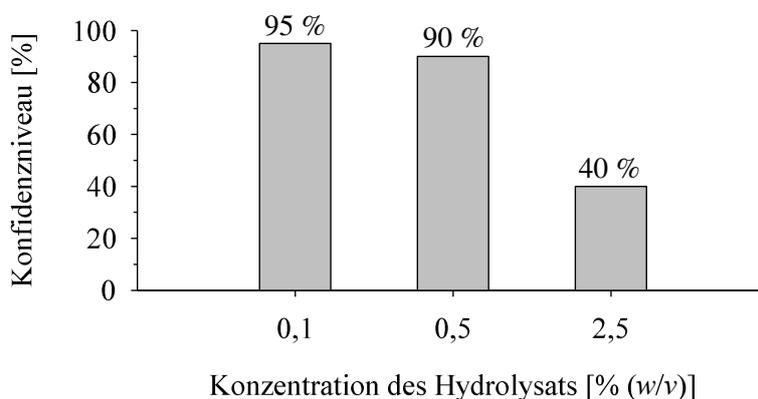


Abbildung 3.20: Abhängigkeit des Konfidenzniveaus ($> 1-\alpha$) von der Konzentration des Hydrolysats in der Verkostung. Evaluierung des salzgeschmacksverstärkenden Effekts bei verschiedenen Konzentrationen des Lysozymhydrolysats in Magerquark. Lysozymhydrolysat nach 24-stündiger Hydrolyse mittels Peptidasen von Tve.

3.4 Identifizierung der Peptidasen

In den Hydrolyseexperimenten wurden konzentrierte Kulturüberstände als Peptidasegemische verwendet. Um mehr Informationen über die enthaltenen Peptidasen zu erlangen, sollten diese zur Identifizierung sequenziert werden. Es waren speziell diejenigen Peptidasen von Interesse, welche für die Freisetzung von L-Arginyl-Dipeptiden bedeutend sind. Für die Identifizierung wurden Peptidasen der sechs Basidiomyceten (Gfr, Pch, Per, Posf, Sco und Tve) mittels Anionenaustauschchromatografie teilgereinigt. Speziell die Peptidasen von Tve sollten umfassend identifiziert werden, schließlich führten sie zu salzgeschmacksverstärkenden Hydrolysaten. Die Peptidasen von Tve wurden daher zusätzlich in einer analytischen isoelektrischen Fokussierung getrennt.

3.4.1 Partielle Reinigung der Peptidasegemische

Für die Identifizierungen wurden die Peptidasen aller Basidiomyceten partiell gereinigt (Anionenaustauschchromatografie bei pH 7,5). Dies war eine wichtige Voraussetzung, da die Kulturüberstände komplexe Proteingemische waren (**Abbildung 3.6**). Die teilgereinigten Proben wurden vergleichend in einer Zymografie und einer semi-nativen SDS-PAGE eingesetzt. Den hellen Aktivitätsbanden der Zymografie wurden Coomassie-gefärbte Proteinbanden der PAGE zugeordnet und zur Identifizierung verwendet. Nach nur einem chromatografischen Reinigungsschritt lagen keine isolierten Banden in der PAGE vor, sodass meist mehrere Proteine pro Probe identifiziert wurden. In dieser Arbeit werden nur die identifizierten Peptidasen dargestellt. Es wurde ein Mascot Score von mindestens 100 vorausgesetzt. Der Score basiert auf einer Wahrscheinlichkeitsrechnung und drückt aus, wie signifikant ein erzieltetes Ergebnis ist. Je höher der Score, desto signifikanter ist die Identifizierung.

Nach der IEX wurden insgesamt 29 Peptidasen identifiziert, über die **Tabelle 3.10** einen Überblick gibt (zusätzliche Informationen zu den gefundenen Peptiden und den *gene identifiers* im Anhang, Kapitel 7.3). Sie gehörten zu den Serin-, Metallo- und Aspartatpeptidasen. Die Peptidasen mit Serin im aktiven Zentrum überwogen und gehörten zu verschiedenen Clans (SB, SC, SK) und Familien. Alle identifizierten Metallopeptidasen (Clan MA und MH) waren zinkabhängige Enzyme. Unter den Aspartatpeptidasen waren nur Peptidasen der Familie A01.

Tabelle 3.10: Identifizierte Peptidasen der genutzten Peptidasegemische von Gfr, Pch, Per, Posf, Sco und Tve nach der IEX.

Probe		Mascot	Identifizierung				
Basidiomycet	MW [kDa]*	Score	Homologie zu	Einteilung	AC No.* ¹	Basidiomycet	MW [kDa]
Gfr	30-35	427	Aspartatpeptidase A01	Endopeptidase	EJF61236	<i>Dichomitus squalens</i>	44
	36	181	Aspartatpeptidase A01	Endopeptidase	EJF59364	<i>Dichomitus squalens</i>	40
	80	270	Serinpeptidase S10	Carboxypeptidase	KII83375	<i>Plicaturopsis crispa</i>	57
	36	150	Serinpeptidase S10	Carboxypeptidase	EIN08494	<i>Punctularia strigo- sozonata</i>	53
	30	338	Serinpeptidase S53, hypothetisches Protein	Endo-/ Tripeptidyl-Peptidase	CDO69591	<i>Trametes cinnabarina</i>	66
Pch	35	1621	Aspartatpeptidase A01	Endopeptidase	ABB73030	<i>P. chrysosporium</i>	42
	35	1984	Serinpeptidase S53	Endo-/ Tripeptidyl-Peptidase	ABB73029	<i>P. chrysosporium</i>	58
Per	32	517	Aspartatpeptidase A01, hypothetisches Protein	Endopeptidase	KDQ31153	<i>P. ostreatus</i>	43
	27	170	Peptidyl-Lys Metallopeptidase M35, PoMEP	Endopeptidase	P81055	<i>P. ostreatus</i>	18
	36	249	Fungalysin Metallopeptidase M36, hypothetisches Protein	Endopeptidase	KDQ24160	<i>P. ostreatus</i>	62
	36	110	Metallopeptidase, hypothetisches Protein	keine Angabe	KDQ30770	<i>P. ostreatus</i>	39
	75	194	Serinpeptidase S08, PoS1	Endopeptidase	CAG25549	<i>P. ostreatus</i>	93
	100-150	370	Serinpeptidase S10	Carboxypeptidase	KDQ26706	<i>P. ostreatus</i>	72
	32	309	Serinpeptidase S53, hypothetisches Protein	Endo-/ Tripeptidyl-Peptidase	KDQ26836	<i>P. ostreatus</i>	63

* Molekulare Massen in der semi-nativen PAGE, verglichen mit einem denaturierten Marker. Die Angaben entsprechen nicht zwingend den tatsächlichen molekularen Massen der Proteine. *¹ *Accession number*.

Probe		Mascot	Identifizierung				
Basidiomycet	MW [kDa]*	Score	Homologie zu	Einteilung	AC No.* ¹	Basidiomycet	MW [kDa]
Posf	60	120	Peptidyl-Lys Metallopeptidase M35, PoMEP	Endopeptidase	P81055	<i>P. ostreatus</i>	18
	60	1061	Serinpeptidase S08, POP1	Endopeptidase	ACR25273	<i>P. ostreatus</i>	39
Sco	18	282	Peptidyl-Lys Metallopeptidase M35, hypothetisches Protein	Endopeptidase	XP_003037751	<i>S. commune</i>	36
	30-32	201	Peptidyl-Lys Metallopeptidase M35, hypothetisches Protein	Endopeptidase	XP_003035465	<i>S. commune</i>	37
	30-32	106	Metallopeptidase MH, hypothetisches Protein	Amino- / Carboxy- / Di- / Tripeptidase	XP_003032752	<i>S. commune</i>	42
Tve	25-30	496	Aspartatpeptidase A01	Endopeptidase	EIW62808	<i>T. versicolor</i>	44
	50-75	109	Aspartatpeptidase A01	Endopeptidase	EIW63301	<i>T. versicolor</i>	41
	25-30	621	Peptidyl-Lys Metallopeptidase M35	Endopeptidase	XP_008032702	<i>T. versicolor</i>	37
	30-45	170	Metallopeptidase M36, hypothetisches Protein	Endopeptidase	EIW51569	<i>T. versicolor</i>	64
	50-75	452	Serinpeptidase S28	Endopeptidase	EIW65216	<i>T. versicolor</i>	58
	50-75	266	Serinpeptidase S28	Endopeptidase	EIW61562	<i>T. versicolor</i>	58
	75	1784	Serinpeptidase S41, hypothetisches Protein	Endopeptidase	XP_008043737	<i>T. versicolor</i>	72
	25-30	110	Tripeptidyl-Peptidase A S53	Tripeptidyl-Peptidase	EIW61376	<i>T. versicolor</i>	66
	25-30	865	Serinpeptidase S53	Endo-/ Tripeptidyl-Peptidase	EIW61051	<i>T. versicolor</i>	58
	30-40	822	Serinpeptidase S53	Endo-/ Tripeptidyl-Peptidase	EIW59803	<i>T. versicolor</i>	63

* Molekulare Massen in der semi-nativen PAGE, verglichen mit einem denaturierten Marker. Die Angaben entsprechen nicht zwingend den tatsächlichen molekularen Massen der Proteine. *¹ Accession number.

3.4.2 Isoelektrische Fokussierung der Peptidasen von *T. versicolor*

Die extrazellulären Proteine des Tve wurden in einer analytischen isoelektrischen Fokussierung (IEF) getrennt. Die enthaltenen Peptidasen wurden mit einem übergeschichteten Gel aus Casein und Agarose detektiert (**Abbildung 3.21**). Helle Aktivitätsbereiche des übergeschichteten Gels wurden mit den Coomassie-gefärbten Proteinbanden verglichen und Peptidasen zur Identifizierung ausgeschnitten. Die Peptidasen stimmten mit zuvor identifizierten überein (vgl. **Tabelle 3.10**). Somit wurde einigen Peptidasen von Tve eine native molekulare Masse und ein isoelektrischer Punkt (pI) zugeordnet (**Abbildung 3.21**). Durch die IEF wurde außerdem eine zusätzliche Peptidase der Familie M35 identifiziert. (Detailliertere Informationen wie gefundene Peptide und Mascot Scores sind **Tabelle 7.3** im Anhang zu entnehmen, Kapitel 7.3.)

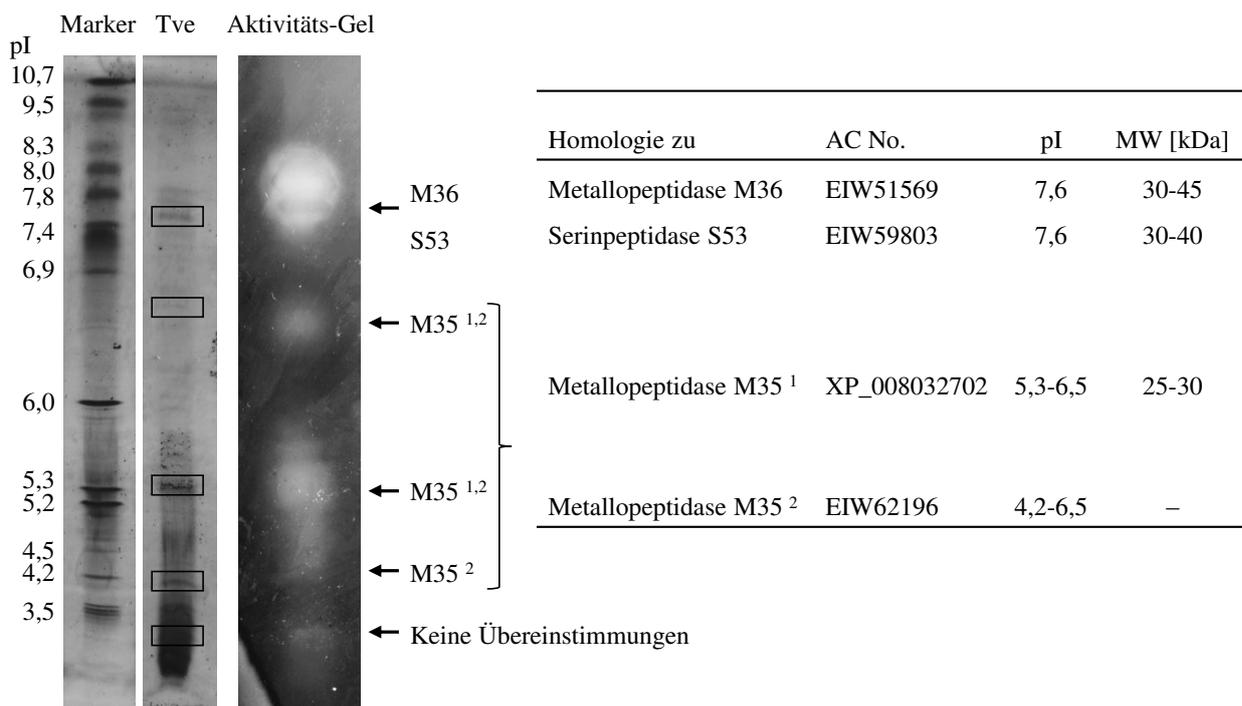


Abbildung 3.21: IEF-Gel der extrazellulären Proteine des Tve und die daraus identifizierten Peptidasen. Links: Coomassie-gefärbte IEF und Detektion der Peptidasen im überschichteten Caseingel. IEF im pH-Bereich 3 bis 10. Rechts: identifizierte Peptidasen und ihre zugeordneten nativen molekularen Massen (durch Abgleich mit Tabelle 3.10). AC No. – Accession number, MW – native molekulare Masse. ^{1,2} Kennzeichnung der Positionen, an denen die jeweilige M35 Peptidase vorgefunden wurde.

3.4.3 Klassifizierung der identifizierten Peptidasen

Innerhalb der identifizierten Peptidasen dominierten Endoaktivitäten (A01, M35, M36, S08, S41). Es wurden jedoch auch Exopeptidasen bestimmt (MH, S10), insbesondere C-terminale. **Tabelle 3.11** gibt einen Überblick über die gefundenen Peptidaseklassen und deren Spaltspezifitäten beruhend auf der MEROPS-Datenbank (Rawlings *et al.*, 2014). In der Datenbank sind die Peptidasen nach Struktur, Sequenzhomologie und katalytischem Typ in Clans und Familien eingeteilt (siehe **Tabelle 3.11**).

Für Gfr, Pch, Per und Tve wurden S53 Peptidasen identifiziert. Die Familie S53 enthält Endopeptidasen und eine Tripeptidyl-Peptidase. Die identifizierten S53 Peptidasen wurden mittels multiplem Sequenzalignment mit weiteren S53 Endopeptidasen sowie S53 Tripeptidyl-Peptidasen aus Basidiomyceten verglichen. Dennoch konnten die gefundenen Peptidasen nicht in Endo- oder Exoenzyme eingeteilt werden, da große Sequenzhomologien innerhalb der Familie S53 bestehen. Lediglich für Tve wurde eine der S53 Peptidasen bereits als Tripeptidyl-Peptidase annotiert. Sie stellt die einzige identifizierte N-terminal agierende Peptidase in dieser Arbeit dar.

Außerdem wurden vermehrt Peptidasen der Familie A01 detektiert. A01 Peptidasen sind Endoenzyme und haben eine breite Spaltspezifität. Dabei präferieren sie große hydrophobe Aminosäuren auf beiden Seiten der Spaltstelle.

Peptidasen der häufig vertretenen Familien S53 und A01 sowie der ebenfalls vorgefundenen Familie S10 haben meist ein pH-Optimum im Sauren. Somit überwiegen die im Sauren aktiven Peptidasen. Nur für Peptidasen der vorgefundenen Familie S08 sind optimale Aktivitäten im Neutralen bis leicht Basischen beschrieben.

Peptidyl-Dipeptidasen, welche Dipeptide am C-Terminus freisetzen, gehören zu den Familien M02, M03 oder M09, welche in dieser Arbeit nicht gefunden wurden. Dipeptidyl-Peptidasen, die vom N-Terminus aus Dipeptide freisetzen, kommen in diversen Familien vor (z. B. C01, C09, S09, S15, M49). Eine davon ist Familie S28, die prolylspezifische Carboxy-, Dipeptidyl- und Endopeptidasen umfasst. Aus Tve wurden zwei Peptidasen dieser Familie identifiziert. Es wurde allerdings keine Peptidase identifiziert, die explizit als Dipeptidyl-Peptidase annotiert ist.

Unter den identifizierten Peptidasen waren einige, welche basische Aminosäuren in der Spaltstelle präferieren. So waren in Per, Posf, Sco und Tve Metalloendopeptidasen der Familie M35.004. Sie benötigen zwingend Lysin in der P1'-Position (Terminologie nach Schechter und Berger, siehe

Abbildung 1.3). Außerdem wurde eine S41 Endopeptidase in Tve detektiert, die Arginin in der P1'-Position bevorzugt, sofern in der P2'-Position eine aliphatische Aminosäure vorliegt.

Tabelle 3.11: Klassifizierung und Informationen zur Spaltspezifität und Aktivität der identifizierten Peptidasen nach MEROPS (Rawlings *et al.*, 2014).

Clan*	Familie*	Informationen zur Spaltspezifität / Aktivität	gefunden in
AA	A01	Endopeptidasen, oft breite Spaltspezifität mit Präferenz für große hydrophobe Aminosäuren in der Schnittstelle, z. T. beschränkte Spezifität, aktiv im Sauren	Gfr, Pch, Per, Tve
MA	M35	Pilzliche Zink-Endopeptidasen ▶ präferieren basische Aminosäuren (Arg, Lys) in P1' ▶ Peptidyl-Lys Metallopeptidasen (M35.004): Lys in P1'	Per, Posf, Sco, Tve
MA	M36	Zink-Endopeptidasen, präferieren große hydrophobe Aminosäuren C-terminal der Schnittstelle	Per, Tve
MH		Zink-Exopeptidasen, Amino- / Carboxy- / Di- / Tripeptidasen	Sco
SB	S08	Endopeptidasen, unspezifische Hydrolyse, Spaltung nach hydrophoben Aminosäuren leicht präferiert, aktiv bei neutralem oder leicht alkalischem pH	Per, Posf
SB	S53	▶ Endopeptidasen, breite Spaltspezifität, hydrophobe Aminosäuren in P1 und P2 leicht präferiert, aktiv im Sauren ▶ Tripeptidyl-Peptidase, hauptsächlich Exoaktivität, aktiv im Sauren	Gfr, Pch, Per, Tve, Tve
SC	S10	Carboxypeptidasen, aktiv im Sauren ▶ präferieren hydrophobe Aminosäuren in P1 und P1' ▶ präferieren hydrophobe und basische Aminosäuren in P1 und P1'	Gfr, Per
SC	S28	Exo- und Endopeptidasen, mit Präferenz für Pro in P1	Tve
SK	S41	C-terminal prozessierende Peptidasen, erkennen C-terminal drei Aminosäuren und schneiden in variabler Entfernung, eine typische Schnittstelle enthält Arg in P1', wenn in P2' eine aliphatische Aminosäure ist	Tve

* Der erste Buchstabe des Clans und der Familie stehen für den katalytischen Typ (A – Aspartat, M – Metallo, S – Serin), eine individuelle Benennung ergibt sich durch den zweiten Buchstaben des Clans (nach dem Alphabet) und durch die Zahl der Familie (fortlaufende Nummerierung).

4 Diskussion

4.1 Kultivierung von Basidiomyceten zur Gewinnung von Peptidasen

In dieser Arbeit wurden Basidiomyceten kultiviert, um Peptidasen zu gewinnen. Es wurde ein Einsatz in der Lebensmittelindustrie angestrebt. Für das Screening wurden viele beliebte Speisepilze oder zumindest essbare Basidiomyceten ausgewählt. Der Fokus lag hauptsächlich auf extrazellulären Peptidasen, da sie oftmals stabiler, leichter zu gewinnen und im Screening gut handhabbar sind (Kudriavtseva *et al.*, 2008; Souza *et al.*, 2015). Die submerse Kultivierung mit Gluten stellte ein ausgedehntes Screening nach extrazellulären Peptidasen dar (**Tabelle 3.1**). Die sechs peptidolytisch aktivsten Arten des Screenings waren Gfr, Pch, Per, Posf, Sco und Tve, die, abgesehen von Pch, essbare Basidiomyceten darstellen. Insgesamt wurden für die Hälfte aller Basidiomyceten deutliche Aktivitäten (im Azocasein-Assay mit über 1 kaU mL⁻¹) nachgewiesen. Im Screening setzten sich die quantifizierten Aktivitäten für jeden Basidiomyceten meist aus verschiedenen, in der Zymografie visualisierten Peptidasen zusammen. Diese Vielzahl extrazellulärer Peptidasen aus Basidiomyceten wurde auch in anderen umfangreichen experimentellen (Grimrath *et al.*, 2011; Jaya Prakash Goud *et al.*, 2008) und bioinformatischen Screenings (Alfaro *et al.*, 2014) vorgefunden. Basidiomyceten bieten ein immenses peptidolytisches Potenzial und sind eine vielversprechende Quelle neuer Peptidasen z. B. für die Lebensmittelindustrie.

Wie bereits zuvor beschrieben (Abd El-Baky *et al.*, 2011a; Eisele *et al.*, 2011; Grimrath *et al.*, 2011), stellte Gluten auch in dieser Arbeit ein geeignetes Substrat dar, um hohe extrazelluläre Peptidaseaktivitäten zu erzielen. Gluten hat einen hohen Gehalt an Prolin (13 bis 23 % (Woychik *et al.*, 1961)). Peptidbindungen zum Prolin sind häufig *cis*-konfiguriert und führen somit zu einem Knick in der Aminosäurekette. Das macht Gluten zu einem schwierigen Substrat. Es kann nur von manchen Peptidasen gespalten werden (Gass und Khosla, 2007; Mika *et al.*, 2015) und hat evtl. daher eine stark peptidaseinduzierende Wirkung (Abd El-Baky *et al.*, 2011a). Außerdem war Gluten nur schlecht in dem Medium löslich und lag suspendiert vor. Dieser Tatsache wird ebenfalls eine peptidaseinduzierende Wirkung zugesprochen, da Basidiomyceten besonders gut auf Oberflächen wachsen (Abd El-Baky *et al.*, 2011a).

Für die sechs aktivsten Basidiomyceten wurden in fortführenden Analysen verschiedene Proteine als Substrate verwendet (Kapitel 3.1.1.2). Alle Basidiomyceten zeigten in den verwendeten Medien sichtbares Wachstum. Demzufolge müssen sie in der Lage gewesen sein, die Proteine als Kohlenstoff- und Stickstoffquelle zu verwenden. Basidiomyceten können anorganische Substanzen (wie Ammoniumsalze und Nitrate) und besser noch organische Stoffe wie Aminosäuren und Proteine als einzige Stickstoffquelle nutzen (Guidot *et al.*, 2005).

Die verwendeten Proteinzusätze führten z. T. zu starken Aktivitätsunterschieden (**Tabelle 3.3**). Insbesondere durch Gluten, Erbsen-, Reis- oder Sojaproteine wurden hohe Peptidaseaktivitäten erreicht. Gelatine eignete sich am wenigsten, da das sichtbare Wachstum sowie die Peptidaseaktivitäten gering waren ($< 0,5 \text{ kaU mL}^{-1}$). Die verwendete Gelatine war deutlich kompakter als die anderen Proteinpulver. Sie bot eine geringere Oberfläche und damit evtl. schlechtere Wachstumsbedingungen. Außerdem enthält Gelatine nahezu kein Tryptophan und Cystein (Souci *et al.*, 2008), während den anderen verwendeten Proteinen keine der proteinogenen Aminosäuren fehlt. Die fehlenden Aminosäuren könnten ein Grund für das schlechtere Wachstum und die geringeren Aktivitäten sein, obwohl die meisten Pilze Aminosäure autotroph sind. Ansonsten gab es keine generelle Rangfolge der Proteinsubstrate zur effektiven Peptidasegewinnung. Bereits Grimrath (2011) beschrieb, dass es schwierig ist, die Wirkung eines Substrats auf die Peptidaseaktivitäten abzuschätzen. Dies muss somit für jeden Basidiomyceten individuell bestimmt werden. Screenings nach geeigneten Substraten stellten sich allerdings als lohnenswert heraus, sofern hohe Aktivitäten angestrebt sind. Schließlich konnten die Aktivitäten beispielsweise für Tve um den Faktor 7 erhöht werden, wenn Erbsen- statt Reisproteine verwendet wurden und um den Faktor 47, wenn Erbsenproteine statt Gelatine eingesetzt wurden.

Außerdem wurde gezeigt, dass bei Abwesenheit eines Proteinsubstrats geringere Aktivitäten ($< 0,4 \text{ kaU mL}^{-1}$) resultierten (**Tabelle 3.3**). Dies wurde sowohl für die Kultivierungen in reinem Minimalmedium, mit limitierter Kohlenstoff- und Stickstoffversorgung (Gfr, Posf, Tve), als auch für die Kultivierungen im nährstoffreichen SNL-Medium (Gfr, Tve) beobachtet. Für höhere Pilze aus der Abteilung der Ascomycota und Basidiomycota finden sich konträre Studien zur Bildung hoher Peptidaseaktivitäten. In *Aspergillus nidulans* beispielsweise findet eine Katabolitrepression statt, und extrazelluläre Peptidasen werden als Antwort auf eine limitierte Kohlenstoff- oder Stickstoffversorgung gebildet (Katz *et al.*, 2008). Eine extrazelluläre Peptidase des *P. chrysosporium* wurde ebenfalls durch Stickstofflimitierung induziert (Dass *et al.*, 1995). Für andere Ascomyceten

und Basidiomyceten wurde jedoch häufig festgestellt, dass nährstoff- und proteinreiche Medien zu hohen Peptidaseaktivitäten führten, welche außerdem besonders vom pH-Wert des Mediums abhängen (Braaksma *et al.*, 2009; Dunaevsii *et al.*, 2006; Ire *et al.*, 2011; Kirsch *et al.*, 2011; Shah *et al.*, 2013). Dabei war der Zusatz von Proteinen für die Bildung extrazellulärer Peptidasen nicht nötig, führte allerdings zu höheren Aktivitäten (Dunaevsii *et al.*, 2006). Diese Beobachtungen decken sich mit den Ergebnissen dieser Arbeit. Die in der Literatur beschriebenen Unterschiede lassen vermuten, dass je nach Organismus, Peptidase und deren Funktion die Induktions- und Repressionsmechanismen variieren.

In dieser Arbeit blieb trotz variierender Proteinsubstrate das Peptidasmuster der einzelnen Basidiomyceten in der Zymografie nahezu unverändert (**Abbildung 3.3**, **Abbildung 3.4**). Shah *et al.* (2013) beobachteten ebenfalls gleichbleibende Peptidasmuster für *Paxillus involutus*, als dieser mit BSA, Gliadin oder Pollen kultiviert wurde. Demgegenüber stehen Studien mit *Flammulina velutipes*, in denen das Peptidasmuster in der Zymografie abhängig vom Substrat variierte (Grimrath *et al.*, 2011). Allerdings handelte es sich um emerse Kulturen und die Substrate unterschieden sich stark. So wurden z. B. Hagebuttentreiber, Schafwolle und Kartoffelschalen verwendet, die unterschiedliche Inhaltsstoffe, pH-Werte und Texturen haben. In dieser Arbeit wurden ausschließlich Proteine als Substrate genutzt. Es wurden keine auf das Substrat angepassten (arginyl-)spezifischen Peptidasen sekretiert (**Tabelle 3.5**, Kapitel 3.1.2.2). Vielmehr scheint das Angebot von Proteinen die Sekretion von Peptidasen allgemein induziert zu haben. Ein möglicher Grund dafür könnte sein, dass holzabbauenden Basidiomyceten in ihrem natürlichen Substrat wenig Stickstoff zur Verfügung steht. Das Kohlenstoff-/Stickstoffverhältnis von Holz beträgt nur bis zu 1250/1 (Watkinson *et al.*, 2006). Proteine sind die vorwiegende Stickstoffquelle im Holz (Kudryavtseva *et al.*, 2008). Basidiomyceten müssen sich Stickstoff aus exogenen Proteinquellen möglichst effektiv zugänglich machen und sekretieren dafür evtl. generell Peptidasegemische.

Die Arginin-Affinitätschromatografie (Kapitel 3.1.2.1) bestätigte, dass die Kulturüberstände keine arginylspezifischen Peptidasen enthielten. Es wurden zwar Peptidasen von Gfr, Pch und zusätzlich von Psa affinitätschromatografisch gereinigt, allerdings handelte es sich nicht um Peptidasen mit Spaltspezifität für Peptidbindungen neben Arginin. Auch der spätere Einsatz ausgewählter synthetischer Arginyl-Substrate zeigte, dass keine arginylspezifische Peptidase in den Kulturüberständen (von Gfr, Pch, Per, Posf, Sco und Tve) vorlag (**Tabelle 3.5**).

Das Screening nach arginylspezifischen Peptidasen wurde daher ausgeweitet. Durch die genutzten Substrate Bz-Arg-pNA und Gly-Arg-pNA lag der Fokus auf Trypsin-ähnlichen Peptidasen und

arginylspezifischen Dipeptidyl-Peptidasen (Kapitel 3.1.2.2). Trypsin und Trypsin-ähnliche Peptidasen haben typischerweise pH-Optima im leicht Alkalischen. Ansonsten sekretieren Basidiomyceten überwiegend saure Peptidasen. Das Screening wurde daher bei pH 4, 6 und 8 durchgeführt. Nur für *Hericium erinaceum* wurde intrazelluläre Aktivität gegenüber Gly-Arg-pNA detektiert. Evtl. ist die bereits bekannte Metallopeptidase Herinase für die detektierte Aktivität verantwortlich. Es handelt sich um eine aus dem Fruchtkörper von Her isolierte und charakterisierte Peptidase, die spezifisch neben Lysin und Arginin spaltet (Choi *et al.*, 2013) und daher für die Generierung von Arginyl-Dipeptiden eine aussichtsreiche Peptidase ist. Da die Aktivität jedoch erst zum Ende dieser Arbeit detektiert wurde, waren keine weiteren Analysen möglich.

In dem ausgedehnten Screening wurden keine Trypsin-ähnlichen Peptidasen (mit Aktivität gegenüber Bz-Arg-pNA) gefunden (Kapitel 3.1.2.2). Dabei sind zumindest für die Fruchtkörper der im Screening vertretenen Basidiomyceten Her, Tve und Pos Trypsinaktivitäten beschrieben (Gzogyan *et al.*, 2005). Da die Bildung von Peptidasen allerdings stark von den Kultivierungsbedingungen abhängt, ist nicht zwingend zu erwarten, dass die Enzymausstattung der Fruchtkörper mit der von submersen Kulturen vergleichbar ist.

Andere Studien stellten für filamentöse Pilze eine Korrelation zwischen Pathogenität und Bildung Trypsin-ähnlicher Peptidasen fest. Je stärker die Pathogenität, desto höher war die Trypsin-Aktivität. Trypsin scheint direkt im pathogenen Prozess involviert zu sein. Während pathogene Pilze Trypsin-ähnliche Peptidasen sekretieren, wurden bei Saprophyten keine Trypsin-ähnlichen Peptidasen gefunden. Stattdessen lagen extrazelluläre Subtilisine vor (Dunaevskii *et al.*, 2006; Dunaevskii *et al.*, 2008). Der submers kultivierte phytopathogene *Rhizoctonia solani* zeigte entweder pathogenes oder saprophytisches Wachstum. Abhängig von der organischen Stickstoffquelle wurden hauptsächlich Trypsin-ähnliche oder Subtilisin-ähnliche Peptidasen gebildet (Kudriavtseva *et al.*, 2010). Bioinformatische Analysen zeigten ebenfalls nur für pathogenen Pilze Trypsin-ähnliche Protein- und Genomsequenzen. Ein Umkehrschluss ist allerdings nicht möglich, denn nicht alle pathogenen Pilze enthalten Trypsin-analoge Sequenzen im Genom (Dubovenko *et al.*, 2010).

Lägen vergleichbare Regulationsmechanismen bei den in dieser Arbeit kultivierten Basidiomyceten vor, würde das Fehlen von Trypsin-ähnlichen Peptidasen saprophytisches Wachstum bedeuten. Im Screening nach arginylspezifischen Peptidasen wurden überwiegend Basidiomyceten der Unterabteilung Agaricomycotina analysiert, welche die meisten Speisepilze umfasst. Ihre Vertreter

können als Saprophyt oder Parasit wachsen. Ein weiterer Pilz gehörte zur Unterabteilung Ustilaginomycotina, welche ebenfalls viele obligate Parasiten beinhaltet. Die Unterabteilung Pucciniomycotina war in dieser Arbeit nicht vertreten. Sie umfasst viele Parasiten und ihre Vertreter sind daher womöglich geeignete Kandidaten für weitere Screenings nach Trypsin-ähnlichen Peptidasen.

4.2 Arginin-Affinitätschromatografie zur Isolierung von Peptidasen

In der Literatur diente die Arginin-Affinitätschromatografie der Reinigung von Trypsin- oder Pappain-ähnlichen Endopeptidasen mit Serin bzw. Cystein im aktiven Zentrum (Chamrád *et al.*, 2011; Kang *et al.*, 2004) sowie von Metallo-carboxypeptidasen M14 (Hendriks *et al.*, 1990; Wang *et al.*, 1994). Die Wechselwirkungen dieser Enzyme mit der Affinitätsmatrix lassen sich durch ihre Spaltpräferenz für Arginin in der P1-Position erklären. In dieser Arbeit wurde mittels Arginin-Affinitätschromatografie keine arginylspezifisch spaltende Peptidase isoliert. Dies liegt vermutlich am Fehlen arginylspezifischer Peptidasen in den untersuchten Kulturüberständen.

Stattdessen wurden drei Aspartatpeptidasen der Familie A01 (aus Gfr, Pch und Psn) unter Verwendung der Arginin-Affinitätschromatografie isoliert (Kapitel 3.1.2.1, **Abbildung 7.1**). Es wurden keine Beispiele in der Literatur gefunden, in denen zuvor Aspartatpeptidasen mit einer Arginin-Affinitätsmatrix gereinigt worden sind. A01 Peptidasen haben meist eine breite Spaltspezifität, bevorzugen große hydrophobe Aminosäuren in der Schnittstelle und sind Endoenzyme (Rawlings *et al.*, 2014). Die Affinitätsmatrix bietet durch den Arginin-Liganden eine Guanidyl- und eine Carboxylgruppe zur Wechselwirkung mit dem Analyten (Darstellung der Matrix: **Abbildung 3.7**). Die Spaltspezifität der gereinigten Peptidasen scheint daher nicht verantwortlich für die Bindung an die Matrix. Es ist fraglich, ob die gereinigten Peptidasen tatsächlich eine Affinität zu Arginin hatten oder die Bindung an der Matrix unspezifisch war. In der Arginin-Sepharose lag ein hydrophiler Spacer vor (**Abbildung 3.7**), sodass intensive hydrophobe Wechselwirkungen (wie bei der Hydrophoben Interaktionschromatografie) mit der Matrix ausgeschlossen werden können. Die Chromatografie fand bei pH 6 statt, wodurch die Arginylreste positiv geladen waren. Es sind ionische Wechselwirkungen wie bei der Ionenaustauschchromatografie denkbar. Evtl. lagen auch komplexe Wechselwirkungen wie bei der multimodalen Chromatografie vor, bei der ionische Wechselwirkungen mit der Guanidyl- oder Carboxylgruppe, hydrophobe Interaktion mit den Kohlenwasserstoffen des Arginylrests und Wasserstoffbrückenbindungen auftreten könnten. Gegen unspezifische Interaktionen spricht allerdings, dass die Peptidasen bereits durch geringe Konzentrationen (20 mM) an freien Liganden eluiert wurden, was typisch für die Affinitätschromatografie

ist (Rehm und Letzel, 2009). Außerdem wurden in der Chromatografie 100 mM NaCl eingesetzt, um unspezifische ionische Wechselwirkungen zu unterbinden. Tatsächlich wechselwirkten neben den Aspartatpeptidasen nur wenige weitere Proteine mit der Arginin-Matrix (**Abbildung 7.1**). Außerdem zeigten Inhibierungsstudien, dass die Peptidasen durch Antipain ($\geq 39\%$) inhibiert wurden (**Tabelle 3.4**). Antipain weist strukturelle Ähnlichkeit zu kleinen Arginyl-Peptiden auf (**Abbildung 4.1**). Anscheinend haben die gereinigten Peptidasen spezifisch an die Arginin-Sephrose gebunden, obwohl sie keine Spaltspezifität für Arginyl-Substrate hatten. Die Peptidasen haben womöglich nicht über die Substratbindestelle an die Arginin-Matrix gebunden. Evtl. kann das allosterische Zentrum Arginin binden und z. B. zu einer *Feedback*-Hemmung führen. Aminosäuren können zur Produktinhibierung von Peptidasen führen. Diverse Aminosäuren wirkten z. B. inhibierend auf Peptidasen von *F. velutipes* und *Aspergillus oryzae* (Flavourzyme, Novozymes Corp.) (Giesler *et al.*, 2013).

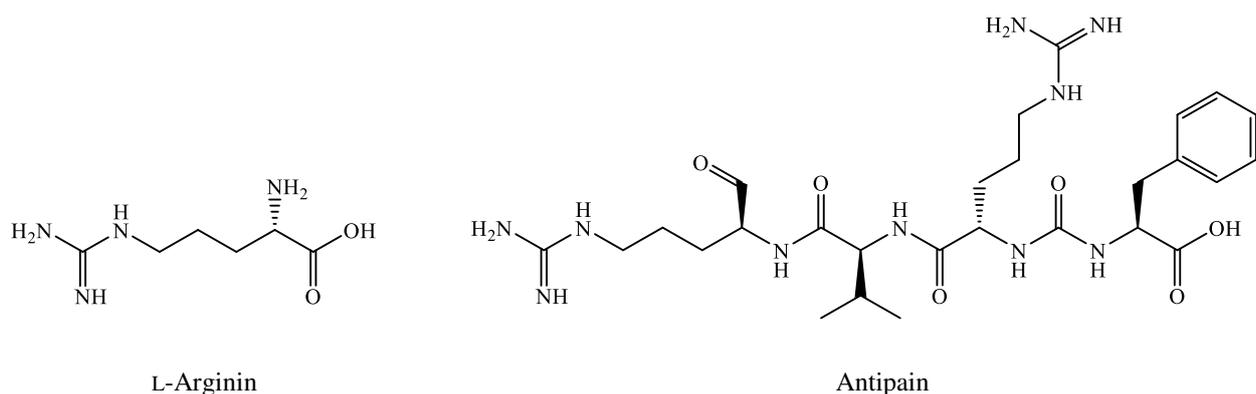


Abbildung 4.1: Strukturformeln der Aminosäure L-Arginin und des Peptidaseinhibitors Antipain.

Die Aspartatpeptidasen von Gfr, Pch und Psan waren sich untereinander ähnlich (**Tabelle 3.4**) und glichen den biochemischen Charakteristika der Aspartatpeptidase des *Piptoporus soloniensis* (molekulare Masse, pH-Optimum, isoelektrischer Punkt, etc.). Diese Peptidase führte zur Milchdicklegung (Abd El-Baky *et al.*, 2011b). Womöglich weisen die isolierten Peptidasen ähnliche Aktivitäten auf und hätten demzufolge Anwendungspotenzial in der Käseherstellung. Diverse aktuelle Studien bestätigen das Interesse an dicklegenden Peptidasen aus mikrobiellen Quellen wie Pilzen (Majumder *et al.*, 2015; Silva *et al.*, 2014). Dagegen sind die gereinigten Aspartatpeptidasen aufgrund ihrer breiten (Endo-)Spaltspezifität zur Freisetzung von Arginyl-Dipeptiden nicht als

zielführend einzustufen. Lediglich der Einsatz zur unspezifischen Vorhydrolyse der Substrate ist denkbar, um anschließend gezielt salzgeschmacksverstärkende Peptide zu generieren.

4.3 Hydrolyse von Casein und Lysozym mit Peptidasen aus Basidiomyceten

Das Screening nach peptidasereichen Basidiomyceten legte den Grundstein für weitere Experimente. Die gewonnenen Peptidasegemische und die erzeugten Hydrolysate werden im Folgenden diskutiert.

4.3.1 Peptidasegemische aus Basidiomyceten

Die Basidiomyceten Gfr, Pch, Per, Posf, Sco und Tve zeigten hohe extrazelluläre Peptidaseaktivitäten. In der Zymografie, mit der Endoaktivitäten nachgewiesen werden (Budič *et al.*, 2009), wurden verschiedene Peptidasen visualisiert (**Abbildung 3.9**). Die Freisetzung von Aminosäuren war dagegen ein Nachweis für Exoaktivitäten (Kapitel 3.3.4). Die späteren Identifizierungen der Peptidasen durch tryptische Hydrolyse und Peptidsequenzierungen untermauerten, dass jeder Kulturüberstand eine Vielzahl an Peptidasen aufwies (Kapitel 3.4). Die verwendeten konzentrierten Kulturüberstände stellten Gemische verschiedener Endo- und Exopeptidasen dar. Peptidasegemische wurden als zielführend zur Generierung der Dipeptide erachtet, da synergistische Wirkungen verschiedener Peptidasen für eine effiziente und weitgehende Hydrolyse erforderlich sind (Byun *et al.*, 2001; Kamnerdpetch *et al.*, 2007). So erreichten Khiari *et al.* (2014) höhere Freisetzungen bioaktiver Peptide mit geringen molekularen Massen (550 bis 2000 Da) durch die Kombination kommerzieller Peptidasen (Trypsin, Flavourzyme und Alcalase) verglichen mit einzelnen Peptidasen.

Die Peptidasegemische hatten alle ein pH-Optimum bei pH 5 oder 6 (**Abbildung 3.10**). Auch die Sequenzierungen (Kapitel 3.4) ergaben überwiegend Homologien zu sauren Peptidasen (A01, S53, S10). Bei filamentösen Pilzen ist die Bildung extrazellulärer Peptidasen vom pH-Wert während der Kultivierung abhängig (Braaksma *et al.*, 2009; Dunaevsii *et al.*, 2006; Ire *et al.*, 2011). So zeigten Studien von Sriranganadane *et al.* (2010), dass *Aspergillus fumigatus*, der bei pH 7 wuchs, neutrale und alkalische Endopeptidasen und Leucin-Aminopeptidasen bildete. Dagegen förderte pH 3,5 die Bildung von sauren Endopeptidasen und Carboxypeptidasen. Auch der Basidiomycet *Bjerkandera adusta* bildete während der Kultivierung bei pH 4,5 vorwiegend im Sauren aktive Peptidasen und bei pH 7,3 besonders Peptidasen mit Aktivität im leicht Alkalischen (Dunaevsii *et*

al., 2006). Basidiomyceten sind typischerweise in der Lage den pH-Wert des Nährmediums während der Kultivierung zu beeinflussen (Grimrath *et al.*, 2011; Kudriavtseva *et al.*, 2010). In dieser Arbeit wurde Medium mit pH 6 verwendet. Die Kulturüberstände des Gfr, Pch, Per, Posf, Sco und Tve blieben in einem sauren bis neutralen Bereich (pH 5,9 bis 7,3, Daten nicht gezeigt). Bei den kultivierten Basidiomyceten könnte der pH-Wert des Mediums die Peptidasebildung ebenfalls beeinflussen haben.

Alle Kulturüberstände waren über einen breiten pH-Bereich peptidolytisch aktiv (**Abbildung 3.10**). Ein Grund dafür ist, dass es komplexe Peptidasegemische waren, deren Aktivität in der Summe bestimmt wurde. Die Peptidasegemische der beiden *Pleurotus*-Arten (Per und Posf) waren in einem besonders breiten Bereich aktiv. Sie hatten bei pH 9 noch über 40 % ihrer maximalen Aktivitäten, was sie von den anderen Basidiomyceten abhob. Die Analyse der Spaltspezifität (**Tabelle 3.5**) und die Identifizierungen (**Tabelle 3.10**) wiesen für Per und Posf Subtilasen nach. Diese Enzyme könnten die beobachteten Ergebnisse erklären, denn beide Subtilasen wurden als im leicht Basischen aktive Peptidasen beschrieben (Eisele *et al.*, 2011; Palmieri *et al.*, 2001), was charakteristisch für S08 Peptidasen ist.

Die Peptidasen von Tve waren im Sauren besonders stabil und verloren bereits im leicht Basischen ihre Aktivität (**Abbildung 3.11**). In dieser Arbeit wurde als Anwendungsgebiet die Salzgeschmacksverstärkung in Milchprodukten wie Käse angestrebt. Das pH-Optimum und die pH-Stabilität der Peptidasen begünstigen Hydrolysen bei saurem pH, was dem typischen Milieu von Milchprodukten entspricht. Ein Einsatz der Peptidasen wäre also auch während der Lebensmittelverarbeitung möglich. Da der Effekt des pH-Werts auf die azocaseinolytische Aktivität bestimmt wurde, ist nicht erwiesen, dass die sauren Bedingungen auch die optimalen Bedingungen zur Freisetzung von L-Arginyl-Dipeptiden sind.

Die komplexen Peptidasegemische wurden zur Spaltung verschiedener *pNA*-Substrate eingesetzt (**Tabelle 3.5**). Die synthetischen Substrate ermöglichten eine rasche und unkomplizierte Aussage über die Spaltspezifität der enthaltenen Peptidasen, ohne dass eine Reinigung nötig war. Für Gfr, Per und Tve wurden prolylspezifische Peptidasen detektiert. Per enthielt wahrscheinlich eine prolylspezifische Dipeptidyl-Peptidase, da nur das Substrat Arg-Pro-*pNA* gespalten wurde (Shibata *et al.*, 2003). Die Kulturüberstände des Gfr und Tve hatten dagegen prolylspezifische Endo- und Exoaktivitäten, denn es wurde zusätzlich das für Endopeptidasen typische Substrat,

Z-Gly-Pro-*p*NA (Kang *et al.*, 2014), hydrolysiert. Für Gfr ist bereits eine prolylspezifische Aminopeptidase aus dem Fruchtkörper beschrieben (Hiwatashi *et al.*, 2004). Für den Genom-sequenzierten Tve sind einige hypothetische Prolyl-Peptidasen annotiert (z. B. Prolyl-Aminopeptidase XP_008034986, prolylspezifische Peptidase XP_008039325, Dipeptidyl-Aminopeptidase EIW59929). Für Pch wurde in dieser Arbeit dagegen keine prolylspezifische Aktivität detektiert, obwohl in der Literatur eine prolylspezifische Aminopeptidase beschrieben wurde (Li *et al.*, 2010). Eine direkte Vergleichbarkeit ist jedoch nicht gegeben, da andere Prolyl-Substrate und stark abweichende Kultivierungsbedingungen gewählt wurden. Auch für andere filamentöse Pilze sind prolylspezifische Peptidasen nicht ungewöhnlich (Mika *et al.*, 2015).

Prolylspezifische Peptidasen sind für die Forschung und Industrie von besonderem Interesse. In Lebensmitteln können sie z. B. zur Entbitterung von Proteinhydrolysaten eingesetzt werden (FitzGerald und O'Cuinn, 2006; Mika *et al.*, 2015). Schließlich sind neben hydrophoben Aminosäuren und Peptiden vor allem Prolin-haltige Peptide für ihren bitteren Geschmack bekannt (Ishibashi, 1988; Ney, 1971). Beispielsweise wurden Prolin-reiche Peptide des in Gouda-Käse hydrolysierten Caseins als bittere Metabolite identifiziert (Toelstede und Hofmann, 2008b). Ziel dieser Arbeit war es, Casein und Lysozym effizient zu hydrolysieren und salzgeschmacksverstärkende Hydrolysate zu erzeugen. Eine entbitternde Aktivität ist zwar nicht zielführend zur Freisetzung von L-Arginyl-Dipeptiden, kann sich aber positiv auf den Geschmack des gesamten Hydrolysats auswirken. Außerdem sind viele Peptidasen nicht in der Lage, Peptidbindungen neben Prolin zu spalten (Gass und Khosla, 2007). Sollen Prolin-reiche Substrate wie Casein möglichst weitgehend hydrolysiert werden, ist der Einsatz prolylspezifischer Peptidasen daher von Vorteil.

Entbitternde Eigenschaften hatte auch eine Aminopeptidase N (Familie M01) von *Lactococcus lactis* verglichen mit tryptisch hydrolysiertem β -Casein (Tan *et al.*, 1993). Für Gfr, Pch, Posf und Tve wurden Alanyl-Aminopeptidasen derselben Familie detektiert (mit Ala-*p*NA), die der Bitterkeit von Proteinhydrolysaten entgegen wirken könnten.

Peptidasen mit Aktivität gegenüber Bz-Arg-*p*NA und Gly-Arg-*p*NA wurden als besonders geeignet zur Freisetzung von L-Arginyl-Dipeptiden erachtet; allerdings wurden keine arginylspezifischen Peptidasen in den Proben detektiert (**Tabelle 3.5**). Eine Aktivität gegenüber Arg-*p*NA wurde ebenfalls nicht detektiert. Das ist hingegen als positiv zu bewerten, schließlich würde eine solche Aminopeptidase zur Abspaltung von Arginin führen. Das freie Arginin stände dann nicht mehr zur Generierung von Arginyl-Dipeptiden zur Verfügung. Außerdem wäre die Spaltung der Zielpeptide denkbar. Auch die späteren Identifizierungen ergaben keine arginylspezifischen Peptidasen.

Für Per und Posf wurden durch die Spaltstellenanalyse (Z-Gly-Gly-Leu-pNA, N-Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA) und die Identifizierung Subtilisine nachgewiesen, während für Sco und Tve nur mittels N-Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA Hinweise auf Subtilisine erhalten wurden. Diese vorgefundenen Subtilisin-Aktivitäten unterstützen die zuvor (Kapitel 4.1) aufgestellte These, dass die kultivierten Pilze als Saprophyten wuchsen und daher keine Trypsin-ähnlichen Peptidasen des pathogenen Wachstums (Dunaevskii *et al.*, 2006; Dunaevskii *et al.*, 2008) gebildet wurden.

4.3.2 Peptidolyse von Casein und Lysozym

Die prinzipielle Eignung der verwendeten Peptidasen zur Hydrolyse der Modellsubstrate wurde sowohl mittel Zymografie (**Abbildung 3.9**), SDS-PAGE (**Abbildung 3.12**) und Aminosäure-Analytik (Kapitel 3.3.4) demonstriert. Die Löslichkeit des Caseins im leicht Sauren nahm mit zunehmender Inkubationsdauer zu (Kapitel 3.3.2). Das zeigte den Fortschritt der Hydrolyse und war eine wichtige Voraussetzung für bioaktive und funktionelle Peptide (Khiari *et al.*, 2014). Die Löslichkeit eines Proteins hängt neben dem pH-Wert u. a. von der molekularen Masse ab (Khiari *et al.*, 2014; Luo *et al.*, 2014). In der Hydrolyse nimmt die Anzahl ionisierbarer Amino- und Carboxylgruppen zu, was zur Löslichkeit beiträgt (Tavano, 2013). Peptidasen von Gfr brachten Casein am langsamsten in Lösung. Ein Grund dafür könnte sein, dass sich die Peptidasen von Gfr weniger zur heterogenen Katalyse eigneten.

Mehrere Peptidasen waren in der Lage Casein, aber nicht Lysozym zu hydrolysieren. Diese Substratspezifität wurde besonders für Peptidasen von Pch, Per und Posf beobachtet. Für diese Pilze lagen mehr Banden in der Casein- als in der Lysozym-Zymografie vor (**Abbildung 3.9**) und der Hydrolysegrad des Caseins war deutlich höher als der des Lysozyms (**Tabelle 3.6**). Das Auftreten vieler Endoaktivitäten (in der Zymografie) korrelierte demnach mit erhöhten Gehalten freier Aminosäuren (in dieser Arbeit gleichzusetzten mit einem hohen Hydrolysegrad). Hier zeigte sich vermutlich das Zusammenwirken von Endo- und Exoenzymen.

Anhand der freigesetzten Aminosäuren (Kapitel 3.3.4) lassen sich prinzipiell Spaltspezifitäten der Peptidasen ableiten (Kamnerdpetch *et al.*, 2007). Die Freisetzungen der Aminosäuren aus den Modellsubstraten legen nahe, dass die Exopeptidasen der Kulturüberstände überwiegend unspezifisch hydrolysierten. Unter den Aminosäuren dominierten nämlich die Hauptaminosäuren der Substrate. In den Caseinhydrolysaten waren dies L-Lysin, L-Leucin und L-Glutaminsäure. In den

Lysozymhydrolysaten wurde besonders viel L-Arginin, L-Lysin, L-Leucin und L-Alanin detektiert. Abgesehen von L-Lysin sind diese Aminosäuren die Hauptbestandteile des Lysozyms. Die erhöhten Gehalte an L-Lysin sind ein Hinweis auf lysylspezifische Peptidasen in allen untersuchten Basidiomyceten. Dies deckt sich damit, dass viele lysylspezifische M35 Peptidasen identifiziert wurden (**Tabelle 3.11**). Außerdem wurde besonders L-Phenylalanin aus Casein mittels Tve freigesetzt und L-Glutaminsäure aus Lysozym mittels Pch, obwohl keine der Aminosäuren eine Hauptkomponente des Substrats darstellt. Das könnte auf Peptidasen mit entsprechender Spaltspezifität hindeuten.

Die Bestimmung der L-Arginyl-Dipeptide in den Hydrolysaten war zunächst ein Nachweis dafür, dass es möglich ist mit Peptidasegemischen aus Basidiomyceten die Zielpeptide aus den gewählten Substraten zu generieren (Kapitel 3.3.5.2). Offensichtlich muss die Wahl des Substrates generell starken Einfluss auf die Gehalte der freigesetzten L-Arginyl-Dipeptide haben, jedoch führten die überlappenden Spaltspezifitäten der Peptidasen zu teilweise unerwarteten Ergebnissen. Mit dem Substrat Lysozym wurden die höchsten Freisetzungen erzielt und mit Casein die geringsten (**Abbildung 3.17**). Das deckt sich mit den berechneten maximalen Ausbeuten (Kapitel 3.3.5.1). Sie sind für das Arginin-reichere Lysozym höher als für Casein. Allerdings lassen sich die großen Konzentrationsunterschiede der L-Arginyl-Dipeptiden nicht alleine durch die verschiedenen Arginin-Gehalte der Substrate erklären. So enthält Lysozym etwa um den Faktor drei mehr Arginin als Casein, aber es wurden je nach verwendetem Basidiomycet um den Faktor 20 bis 80 höhere Gehalte an Arginyl-Dipeptiden freigesetzt. Außerdem ergaben die alternativen Substrate (Gelatine, Erbsen-, Reis- und Sojaproteine) mit einem etwas geringeren bzw. höheren Arginin-Gehalt als Lysozym (**Tabelle 3.2**) trotzdem deutlich geringere Konzentrationen an Arginyl-Dipeptiden (**Abbildung 3.17**). Warum Lysozym zu höheren Ausbeuten führte, ist nicht geklärt. Jedoch decken sich diese Ergebnisse mit denen von Schindler *et al.* (2011). Sie bestimmten L-Arginyl-Dipeptide aus verschiedenen sauren, enzymatischen und kommerziellen Proteinhydrolysaten. Aus dem sehr Arginin-reichen Protamin (> 60 % Arginin (Frehlick *et al.*, 2006)) wurden die meisten Arginyl-Dipeptide freigesetzt und die zweitmeisten aus dem Substrat Lysozym. Geringere Gehalte wurden für Gluten, Casein, Soja-, Reis- und Erbsenproteine erzielt.

Das Substrat hatte Einfluss auf die Quantität und außerdem auf die Qualität der freigesetzten Arginyl-Dipeptide. Für Casein (**Tabelle 3.7**) überwogen in Übereinstimmung mit den theoretischen Ausbeuteberechnungen (**Abbildung 3.15**) die Peptide RI/IR/RL/LR und RE/ER, die kaum Einfluss auf den Salzgeschmack haben. Außerdem wurden in den Caseinhydrolysaten erhöhte Gehalte

von RP/PR und RV/VR gefunden. Schindler *et al.* (2011) fanden in einem kommerziellen pankreatischen Caseinhydrolysat ebenfalls vorwiegend PR, RV und zusätzlich RI. Diese Parallelen bestätigen den großen Einfluss des Substrats auf die Dipeptidfreisetzung.

In dieser Arbeit wurden aus Lysozym (**Tabelle 3.8**) vergleichbar zum enzymatisch hydrolysierten Lysozym von Schindler *et al.* (2011) besonders RG/GR, RS/SR, RI/IR und RD/DR freigesetzt. Die häufig gebildeten Peptide RG/GR und RS/SR sind vermehrt in der Aminosäuresequenz des Lysozyms zu finden. Die Peptide RN/NR wurden kaum gefunden, obwohl sie theoretisch am häufigsten freizusetzen wären. Welche Arginyl-Dipeptide generiert werden, hängt demnach nicht nur von der Aminosäuresequenz des Substrates ab.

Das gegenüber tryptischer Hydrolyse relativ resistente α -Lactoalbumin verdeutlicht die Rolle der Proteinstruktur für die enzymatische Hydrolyse. Im α -Lactoalbumin sind die potenziellen Schnittstellen für Trypsin durch die Proteinfaltung unzugänglich (Antila *et al.*, 1991). Die Änderung der Konformation und Löslichkeit des Substrats stellt einen wichtigen Parameter zur Regulation enzymatischer Hydrolysen dar. So führten denaturierte bzw. native Substrate zu Hydrolyseprodukten mit unterschiedlichen Verteilungen der molekularen Massen (Cui *et al.*, 2009; Stefanović *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2009).

In dieser Arbeit hatte die dreidimensionale Struktur des Substrats vermutlich ebenfalls einen Einfluss auf die Qualität und die Quantität der Hydrolyseprodukte. Für Casein, welches nahezu keine Sekundär- und Tertiärstruktur besitzt (Holt, 2013), stimmten die experimentellen Daten zur Freisetzung von L-Arginyl-Dipeptiden gut mit den theoretischen überein. Für Lysozym, welches eine ausgeprägte dreidimensionale Struktur aufweist (Gajda und Bugla-Ploskonska, 2014), stimmten die Daten nur bedingt überein.

Insgesamt stellte sich Casein sowohl hinsichtlich der Qualität und der Quantität als eher ungeeignetes Substrat zur Freisetzung von salzgeschmacksverstärkenden L-Arginyl-Dipeptide heraus. Die alternativen Substrate Gelatine, Erbsen-, Reis- und Sojaproteine führten nur zu geringfügig höheren Gehalten. In dieser Arbeit war Lysozym der am besten geeignete Präkursor zur enzymatischen Freisetzung von salzgeschmacksverstärkenden L-Arginyl-Dipeptiden (**Abbildung 3.17**).

Die Peptidasegemische verschiedener Basidiomyceten hatten einen geringeren Einfluss auf die Freisetzung der Arginyl-Dipeptide als die Wahl des Substrates. Dies galt für die freigesetzten Stoffmengen der Zielpeptide und für deren Profil. Hinsichtlich der Qualität waren besonders Gfr,

Pch, Sco und Tve von Interesse. Dagegen waren unter den freigesetzten Arginyl-Dipeptiden des Per und Posf (beides Pilze der Gattung *Pleurotus*) nur wenige mit salzgeschmacksverstärkendem Effekt (**Tabelle 3.8**, Kapitel 3.3.5.2). Mit rund 10 % der maximal möglichen Ausbeuten wurden die höchsten Freisetzungen an Arginyl-Dipeptiden insgesamt mit Peptidasen von Pch und Tve aus dem Substrat Lysozym erreicht (Abbildung 3.17). Durch Optimierungen der Hydrolyseparameter wie Inkubationszeit, pH-Wert, Temperatur und Peptidase-Substrat-Verhältnis sollten höhere Ausbeuten realisierbar sein.

Die Analyse des Hydrolysegrades (**Tabelle 3.6**) deutete auf inhibierende Effekte im Verlauf der Hydrolyse hin. Der Anstieg des Hydrolysegrades war zunächst deutlich und nahm dann ab. Gründe dafür können die Autolyse der Peptidasen, eine Produktinhibierung oder fehlende Schnittstellen sein (Giesler *et al.*, 2014). Sollten diese Effekte vorliegen, verlangsamt sich nicht nur die Freisetzung der hier detektierten Aminosäuren, sondern aller Hydrolyseprodukte und damit auch der Zielpeptide. Die zeitabhängige Freisetzung der L-Arginyl-Dipeptide durch Peptidasen von Tve (**Abbildung 3.18**) zeigte einen ähnlichen Trend und bestätigte diese Hypothese. Dennoch führte im analysierten Zeitraum (bis zu 18 Stunden) die längste Hydrolysedauer zu den höchsten Gehalten an L-Arginyl-Dipeptiden. Somit lagen keine Hinweise für einen schnellen Abbau der Zielpeptide vor.

4.3.3 Sensorische Evaluierung der Lysozymhydrolysate

In der Profilsensorik waren die Grundgeschmücke der Lysozymhydrolysate meist bitter, leicht süß und leicht sauer (**Abbildung 3.19**). In allen Lysozymhydrolysaten dominierten die als bitter beschriebenen Aminosäuren L-Arginin, L-Lysin und L-Leucin (Zorn und Czermak, 2014) in vergleichbaren Konzentrationen (Kapitel 3.3.4). Die Hydrolysate wurden jedoch als unterschiedlich bitter eingestuft. Demnach müssen zusätzlich bittere Peptide vorgelegen haben. Wie bereits beschrieben, wurden in den Kulturüberständen des Gfr, Per und Tve prolylspezifische Peptidasen detektiert (**Tabelle 3.5**, **Tabelle 3.10**), die typischerweise Anwendung zur Entbitterung von Proteinhydrolysaten finden (Mika *et al.*, 2015). Tatsächlich waren die Hydrolysate des Per und Tve weniger bitter als alle anderen. Das Hydrolysat des Gfr war dennoch bitter. Nicht nur Prolyl-Peptide sind für ihre Bitterkeit bekannt (Ishibashi, 1988), sondern auch hydrophobe Aminosäuren und Peptide (Ney, 1971), was die Bitterkeit des Gfr sowie der anderen Hydrolysate erklären könnte. Bitterkeit ist ein häufiges Problem in der Erzeugung von Proteinhydrolysaten besonders aus Milch-

proteinen (Liu *et al.*, 2014; Maehashi und Huang, 2009). Sollen wie in dieser Arbeit speziell Peptide mit geringen molekularen Massen gebildet werden, so geht Bitterkeit oft damit einher (Cheison *et al.*, 2007). Es wurde eine Korrelation der Freisetzung vieler kleiner Peptide (500 bis 1000 Da) und einer starken Bitterkeit gezeigt (Leksrisompong *et al.*, 2010). Hydrophobe Aminosäuren und kleinere hydrophobe Peptide führen zur Aktivierung der Geschmacksrezeptoren für Bitterkeit (Kohl *et al.*, 2013). Hingegen gleichen sich in größeren Peptiden hydrophobe und hydrophile Aminosäuren oft aus und die hydrophoben Bereiche liegen durch intramolekulare Wechselwirkungen typischerweise im Proteininneren. Für größere Peptide (3000 bis 6000 Da) wurde außerdem eine Interaktionen untereinander postuliert, sodass hydrophobe Bereiche abgeschirmt vorliegen und nicht als bitter wahrgenommen werden (Leksrisompong *et al.*, 2010).

Der leicht süße Geschmack der erzeugten Lysozymhydrolysate (**Abbildung 3.19**) deckt sich mit den erhöhten Konzentrationen der süßen Aminosäuren (Zorn und Czermak, 2014) L-Lysin und L-Alanin (Kapitel 3.3.4). Nicht hydrolysiertes Lysozym ist ein weiterer Grund für den süßen Geschmack sowie für die Adstringenz der Proben (Maehashi und Udaka, 1998). Der saure Geschmack der Hydrolysate lässt sich ebenfalls mit den erhöhten Gehalten an L-Lysin erklären. Die Aminosäuren L-Lysin, L-Asparagin- und L-Glutaminsäure sind als sauer beschrieben (Kuramitsu *et al.*, 1996). Peptide mit diese Aminosäuren zeigten ebenso einen sauren Geschmack (Kuramitsu *et al.*, 1996; Maehashi *et al.*, 1999; Nakata *et al.*, 1995).

Die beschriebenen Eigengeschmäcke der Hydrolysate können deren Einsatz in Lebensmitteln limitieren. Es gibt zwar Strategien, um beispielsweise bittere Komponenten abzutrennen oder zu maskieren. Sie sind aber oft für industrielle Zwecke zu teuer und nicht effizient genug (Saha und Hayashi, 2001), insbesondere wenn einige spezielle Peptide erhalten bleiben sollen. Daher ist es als positiv zu bewerten, dass der Eigengeschmack der Hydrolysate in den Verkostungsmatrices deutlich weniger wahrnehmbar war.

In vorherigen Studien (Schindler *et al.*, 2011) hatte die Verkostungsmatrix Einfluss auf den salzgeschmacksverstärkenden Effekt von L-Arginyl-Dipeptiden. So wurde z. B. für RP in Modellbrühe eine Verstärkung des Salzgeschmacks von über 20 % gezeigt, während es in reiner NaCl-Lösung keinen signifikanten Effekt gab (**Abbildung 1.2**). Daher wurden in dieser Arbeit Verkostungsmatrices gewählt, die an das gewünschte Anwendungsgebiet in Milch- und speziell Käseprodukten angepasst waren. Für Lysozymhydrolysate des Gfr und Tve wurden salzgeschmacksverstärkende Effekte in Magerquark festgestellt. In der Käsematrix zeigten dagegen nur Hydrolysate des Tve

ein Effekt (Tabelle 3.9). Demnach beeinflusste die Matrix auch in dieser Arbeit die salzgeschmacksverstärkende Wirkung der Hydrolysate.

Keines der Hydrolysate war von sich aus salzig (**Tabelle 3.9**), sodass Geschmacksverstärker für den intensiveren Salzgeschmack verantwortlich gewesen sein müssen. Der salzgeschmacksverstärkende Effekt des Tve und Gfr lässt sich nicht durch die L-Arginyl-Dipeptide alleine erklären. Die beiden Pilze führten nämlich einmal zu den höchsten (Tve) und zu den geringsten (Gfr) Freisetzungen insgesamt. Beide Pilze lagen im Mittelfeld, betrachtet man nur die als Salzgeschmacksverstärker bekannten L-Arginyl-Dipeptide (**Abbildung 3.17**). Außerdem ähnelte sich das Profil der Arginyl-Dipeptide in allen Hydrolysaten (**Tabelle 3.8**). Hinzu kommt, dass die Konzentrationen der L-Arginyl-Dipeptide in den Verkostungen vergleichsweise gering waren. Die Peptidasen von Tve setzten mit rund $75 \mu\text{mol g}^{-1}$ Lysozym die meisten Arginyl-Dipeptide frei. Da die Hydrolysate überwiegend in Konzentrationen von 0,5 % (w/v) verkostet wurden, lagen die Dipeptide insgesamt in Konzentrationen von etwa $375 \mu\text{mol L}^{-1}$ vor. Verglichen mit den von Schindler *et al.* (2011) verkosteten 12 mmol L^{-1} einzelner Arginyl-Dipeptide, wurden in dieser Arbeit um den Faktor 32 geringere Konzentrationen verkostet. Schindler *et al.* (2011) zeigten, dass der salzgeschmacksverstärkende Effekt von der Konzentration der Arginyl-Dipeptide abhängt. Es wurden 0,3 bis 3 % enzymatisch hydrolysiertes Protamin, welches reich an L-Arginyl-Dipeptiden ist, in Modellbrühe verkostet. Je höher der Anteil des Hydrolysats war, desto intensiver war die Salzgeschmacksverstärkung (zwischen nicht signifikant und bis zu 37 %).

Die Diskrepanz zwischen wahrgenommener Salzigkeit und den Konzentrationen an Arginyl-Dipeptiden lassen vermuten, dass in dieser Arbeit zusätzliche Komponenten der Hydrolysate eine Rolle für den Salzgeschmack spielten. Es werden weitere salzgeschmacksverstärkende Peptide in den Hydrolysaten des Gfr und Tve vermutet. Wie einleitend beschrieben, wurden bereits einige Peptide als salzgeschmacksverstärkend bzw. salzig beschrieben (vgl. **Tabelle 1.2**). Allgemein wurde der Einfluss von Peptiden auf den Salzgeschmack jedoch wenig untersucht, sodass auch weitere bislang unbekannte Salzgeschmacksverstärker denkbar sind.

Außerdem wurden in dieser Arbeit u. a. bittere Hydrolysate verkostet (**Abbildung 3.19**). Starke Bitterkeit kann den Salzgeschmack reduzieren (Schindler *et al.*, 2011). Auch der umgekehrte Fall ist bekannt: starker Salzgeschmack reduziert die Bitterkeit (Breslin und Beauchamp, 1997; Keast *et al.*, 2004). Es sind vielfältige verstärkende und maskierende Effekte in den Hydrolysaten möglich. Das könnte zur fehlenden Korrelation des Salzgeschmacks und der Konzentration der Arginyl-Dipeptide beigetragen haben.

Der Geschmackseindruck in der gustatorischen und olfaktorischen Wahrnehmung ist von einer Vielzahl an Rezeptoren und Ionenkanälen abhängig und somit komplex (Gravina *et al.*, 2013). Es existieren zwar Modelle zur Vorhersage beispielsweise der Bitterkeit eines Hydrolysats (Newman *et al.*, 2014). Dennoch bleiben Sensorikexperimente in anwendungsorientierten Matrices unabdingbar, um salzgeschmacksverstärkende und möglichst wohlschmeckende Hydrolysate aufzufinden. Schließlich gibt es bislang kaum Studien zu salzgeschmacksverstärkenden Peptiden aus Proteinhydrolysaten. Außerdem beinhalten die Hydrolysate heterogene Peptide und Aminosäuren wodurch eine Vorhersage des Geschmacks auch bei einer noch umfassenderen Analytik schwierig wäre.

4.3.4 Identifizierte Peptidasen der Basidiomyceten

Durch die Sequenzierungen wurden diverse Peptidasen der verwendeten Kulturüberstände identifiziert (Kapitel 3.4). Pch, Sco und Tve sind häufig untersuchte Modellorganismen, deren Genome sequenziert sind. Die durch ESI-MS/MS identifizierten tryptischen Peptide wurden Peptidasen des jeweiligen Organismus zugeordnet. Im Vergleich dazu ist das Genom der Basidiomyceten Gfr, Per und Posf bislang nicht sequenziert (vgl. **Tabelle 1.4**), sodass Homologiesuchen zu anderen Basidiomyceten durchgeführt wurden. Per und Posf sind beides Arten der Gattung *Pleurotus*, sodass Homologien zu *P. ostreatus* gefunden wurden. Für Gfr ergaben sich Homologien zu etwas fernerer Verwandten innerhalb der Klasse der Agaricomycetes (**Tabelle 3.10**).

Die in der PAGE ausgeschnittenen Peptidasen wiesen in vielen Fällen abweichende molekulare Massen zu den ermittelten Homologen auf (**Tabelle 3.10**). Dafür gibt es verschiedene Gründe. Zum einen erfolgte die Probenvorbereitung mittels semi-nativer PAGE, in der die Trennung von der molekularen Masse, der Ladung und Konformation der Proteine abhängt. Außerdem wurden bereits häufiger Agglomerationen von Peptidasen in der semi-nativen PAGE beobachtet (Grimrath, 2011; Oliveira *et al.*, 2005). Des Weiteren sind posttranslationale Modifikationen wie *N*-Glykosidierungen möglich, während die molekulare Masse hypothetischer Proteine nur aus deren Aminosäuresequenz berechnet wird. Darüber hinaus ist speziell für Peptidasen von Gfr, Per und Posf zu berücksichtigen, dass zwar Homologien zu bekannten Sequenzen anderer Organismen gefunden wurden, aber es sich dennoch nicht um identische Proteine handeln muss. Auch ein teilweiser Abbau der Proteine durch peptidolytische Aktivität ist für die Peptidase-reichen Proben

naheliegend. Dies begründet auch, warum in der IEF das gleiche Protein in verschiedenen Banden gefunden wurde (**Abbildung 3.21**).

Die Sequenzierung bestätigte, dass die verwendeten Kulturüberstände nicht nur hohe Peptidaseaktivitäten hatten, sondern sich diese Aktivitäten aus verschiedenen Peptidasen zusammensetzten. Es wurden viele, aber nicht alle Peptidasen der genutzten Peptidasegemische identifiziert. So wurden z. B. nur zwei Peptidasen von Pch identifiziert, obwohl in der Zymografie sechs Banden sichtbar waren. Auch der umgekehrte Fall wurde beobachtet: für Tve wurden mehr Peptidasen identifiziert, als Banden in der Zymografie visualisiert wurden (**Abbildung 3.9**). Das ist mit der Substratpräferenz, den Wirkoptima oder einer möglichen Inaktivierung der Peptidasen in der Zymografie zu erklären.

In den Kulturüberständen überwogen Serinpeptidasen, da besonders viele Peptidasen dieser Klasse identifiziert wurden. In der Literatur wurde beschrieben, dass in Basidiomyceten vermehrt Serinpeptidasen vorkommen (Sabotič *et al.*, 2007).

Die meisten identifizierten Peptidasen waren Endoenzyme (**Tabelle 3.11**). Diverse der Endopeptidasen zeichnen sich durch eine breite Spaltspezifität und Präferenz für hydrophobe Aminosäuren aus (A01, S08, S53, M36). Diese Peptidasen eignen sich nicht direkt zur Freisetzung von Arginyl-Dipeptiden, allerdings können sie das Substrat zunächst unspezifisch hydrolysieren, damit anschließend Exopeptidasen vermehrt agieren können.

Wie bereits zuvor diskutiert, wurden mittels *p*NA-Substraten prolylspezifische Peptidasen für Gfr, Per und Tve detektiert (**Tabelle 3.5**). In Tve wurden zwei prolylspezifische Peptidasen identifiziert (**Tabelle 3.10**). Es waren saure Prolyl-Endopeptidasen mit der MEROPS-ID S28.004. Diese Gruppe umfasst die Peptidasen AN-PEP und AO-PEP aus *Aspergillus niger* bzw. *oryzae*, welche beispielsweise zur Entbitterung und zum effizienten Glutenabbau genutzt wurden (Edens *et al.*, 2005; Montserrat *et al.*, 2015).

Auch für Carboxypeptidasen sind entbitternde Effekte beschrieben (Fu *et al.*, 2011; Liu und Yasuda, 2005). Für Gfr und Per wurden die im Sauren aktiven Carboxypeptidasen der Familie S10 identifiziert. Sie präferieren entweder hydrophobe Aminosäuren in der P1- und P1'-Position oder zusätzlich basische Aminosäuren (Rawlings *et al.*, 2014). Die Spaltung neben hydrophoben Aminosäuren ermöglicht die Entbitterung von Proteinhydrolysaten. S10 Carboxypeptidasen bergen gleichzeitig allerdings die Gefahr, dass Arginin freigesetzt wird und nicht mehr zur Bildung von Dipeptiden zur Verfügung steht. Für Gfr wurden zwei S10 Peptidasen bestimmt (**Tabelle 3.10**),

und innerhalb der Lysozymhydrolysate führte dieser Pilz zu der geringsten Konzentration an L-Arginyl-Dipeptiden (**Abbildung 3.17**).

Außerdem wurden in Per, Posf, Sco und Tve Peptidyl-Lys Metallopeptidasen (M35.004) nachgewiesen (**Tabelle 3.10**). Es sind pilzliche Endopeptidasen, die selektiv neben Lysin in der P1'-Position schneiden (Rawlings *et al.*, 2014). Die Peptidyl-Lys Metallopeptidase PoMEP des *P. ostreatus* wurde in der Literatur bereits beschrieben (Nonaka *et al.*, 1998) und war homolog zu einer Peptidase des Per und Posf. Das Auftreten der M35 Peptidasen deckt sich mit dem vermehrt freigesetzten L-Lysin (Kapitel 3.3.4), das bereits auf eine Lysylspezifität hindeutete. Innerhalb der Familie M35 sind Deuterolysine (M35.002), die bevorzugt neben Arg oder Lys spalten, für ihren Beitrag zur Bildung des Geschmacks von Sojasoße bekannt (Rawlings *et al.*, 2014).

Innerhalb der identifizierten Peptidasen ist die S41 Peptidase des Tve hervorzuheben (**Tabelle 3.10**). S41 Peptidasen erkennen C-terminal drei Aminosäuren und schneiden in variabler Entfernung. Eine typische Schnittstelle enthält Arg in P1'-Position, sofern P2' eine aliphatische Aminosäure ist (Rawlings *et al.*, 2014). Diese Peptidase könnte daher an der Bildung salzgeschmacksverstärkender Arginyl-Peptide beteiligt gewesen sein. Sie sollte sich zur Spaltung von Casein eignen, da in dem Substrat C-terminal des Arginins häufig eine aliphatische Aminosäure liegt. Auch für Fruchtkörper des *F. velutipes* wurde eine Serinpeptidase S41 als Caspase-ähnliches Enzym beschrieben (Iketani *et al.*, 2013). Bereits zuvor wurde die Peptidase Fvp32 aus der Koji-Kultur des *F. velutipes* in die Familie S41 eingeordnet (Grimrath, 2011). Ansonsten wurden in der Literatur keine Daten zu S41 Peptidasen aus Pilzen gefunden. Sie stellen eine kaum erforschte Peptidase-Familie aus Pilzen dar.

Außerdem war die S53 Tripeptidyl-Peptidase des Tve vermutlich bei der Bildung kleiner Peptide involviert. Tripeptidyl-Peptidasen haben hauptsächlich Exoaktivität und generieren dabei Tripeptide (Rawlings *et al.*, 2014). Bisher sind zwar vor allem Arginyl-Dipeptide als Salzgeschmacksverstärker bekannt (Schindler *et al.*, 2011), es werden jedoch weitere salzgeschmacksverstärkende Peptide vermutet. Womöglich handelt es sich dabei um Tri- und Tetrapeptide mit enthaltenem Arginin, wie das salzige Tetrapeptid DEKR (Jin-Young Suh *et al.*, 2014). Aus Pilzen sind bereits einige Tripeptidyl-Peptidasen (S53.003) bekannt (Lin *et al.*, 2011; Reichard *et al.*, 2006), zu diesen Enzymen speziell aus Basidiomyceten wurde jedoch keine Literatur gefunden.

Die Sensorik (**Tabelle 3.9**) zeigt, dass vor allem Peptidasen von Tve zu salzgeschmacksverstärkenden Peptiden führten. Für Tve wurden die meisten Peptidasen identifiziert (**Tabelle 3.10**). Sie wurden mit den sekretierten Peptidasen des Basidiomyceten *F. velutipes* verglichen (**Tabelle 4.1**), da Peptidasen von *F. velutipes* bereits zur effektiven Proteinhydrolyse und Geschmacksverbesserung genutzt wurden (Grimrath *et al.*, 2011). Für beide Pilze überwogen Serin- und Metallopeptidasen. Für alle aus *F. velutipes* identifizierten extrazellulären Peptidasen waren Homologe in Tve zu finden, abgesehen von einer Subtilase. Für Tve gab es jedoch einen Hinweis auf eine Subtilase (Aktivität gegenüber *N*-Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-*p*NA). Im Gegensatz zu *F. velutipes* wies Tve außerdem A01 sowie S53 Endo- und Tripeptidyl-Peptidasen auf.

Tabelle 4.1: Vergleich der identifizierten extrazellulären Peptidasen von *F. velutipes* und *T. versicolor*.

<i>Flammulina velutipes</i>	<i>Trametes versicolor</i>	Familie	Aktivität
	Pepsin-ähnliche Peptidase	A01	Endopeptidase
Subtilase ¹		S08	Endopeptidase
Prolyl-Endopeptidase ¹	Prolyl-Endopeptidase	S28	Endopeptidase
C-terminal prozessierende Peptidase ¹	C-terminal prozessierende Peptidase	S41	Endopeptidase
	Tripeptidyl-Peptidase A	S53	Tripeptidyl-Peptidase
	Tripeptidyl-Peptidase / Sedolisin-ähnliche Peptidase	S53	Tripeptidyl- / Endopeptidase
Deuterolysin ¹	Peptidyl-Lys Metallopeptidase	M35	Endopeptidase
Fungalysin (FVP-I) ^{1,2}	Fungalysin	M36	Endopeptidase

1 – (Grimrath, 2011) , 2 – (Park *et al.*, 2007), Familie der Peptidasen nach MEROPS (Rawlings *et al.*, 2014).

Letztendlich wurden für einige der genutzten Basidiomyceten ähnliche Peptidasen identifiziert. Tve hob sich durch seine Vielzahl an Peptidasen und speziell durch die S28 Prolyl-Peptidase, die S41 Peptidase und die S53 Tripeptidyl-Peptidase hervor (**Tabelle 3.10**). Die beiden zuletzt genannten Peptidasen sind neuartige Enzyme, welche bislang kaum aus Basidiomyceten isoliert wurden.

5 Ausblick

Die wissenschaftlichen Erkenntnisse dieser Arbeit zur Proteinhydrolyse mit basidiomycetischen Peptidasen eröffnen neue Perspektiven zur Bildung salzgeschmackverstärkender Peptide und somit zur Salzreduktion in Lebensmitteln.

In dieser Arbeit konnten keine arginylspezifischen Peptidasen sequenziert werden, allerdings wurde für *Hericium erinaceus* Aktivität gegenüber Gly-Arg-pNA detektiert. Die verantwortliche Peptidase sollte isoliert und biochemisch charakterisiert werden, um mit dem Enzym gezielt L-Arginyl-Dipeptide zu generieren. Außerdem könnte das Screening nach interessanten Peptidasen unter Verwendung der Substrate Gly-Arg- und Bz-Arg-pNA weiter ausgedehnt werden.

Es wurden salzgeschmacksverstärkende Hydrolysate mit den peptidasereichen Kulturüberständen des Gfr und Tve hergestellt. In weiteren Arbeiten sollten die Peptidasegemische weiter analysiert werden, da zumindest für Gfr nicht alle enthaltenen Peptidasen in dieser Arbeit sequenziert wurden. Neben der Sequenzierung könnten Spaltstellenanalysen genutzt werden, um die Peptidasen zu bestimmen, welche zur Generierung salzgeschmacksverstärkender Peptide wichtig sind.

Für weiterführende Arbeiten wäre die Isolierung von Peptidasen aus den vielversprechenden Gemischen (Gfr und Tve) denkbar, um einzelne Aktivitäten geschickt zu kombinieren oder zeitlich verzögert zu nutzen. Alternativ könnten die Aktivitäten der Peptidasegemische durch Änderungen des pH-Werts und der Temperatur während der Hydrolyse geregelt werden. Durch die Reaktionsbedingungen könnte z. B. zunächst eine unspezifische Vorhydrolyse mit sauren A01 Peptidasen und anschließend eine gezielte Freisetzung kleinerer Peptide durch die Tripeptidyl-Peptidase des Tve begünstigt werden.

In einem Machbarkeitsnachweis wurden salzgeschmacksverstärkende L-Arginyl-Dipeptide mit basidiomycetischen Peptidasegemischen freigesetzt. Um höhere Gehalte an L-Arginyl-Dipeptide freizusetzen, könnten weitere Arginin-reichere Substrate erprobt werden, beispielweise Protamin. Schließlich hatte besonders das Substrat großen Einfluss auf die Bildung der Zielpeptide. Durch vorherige Hitze-Denaturierung der Substrate sollten die erreichten Freisetzungen mit dem Arginin-Gehalt korrelieren. Eine Optimierung der Ausbeuten durch Variation der Hydrolyseparameter wie pH-Wert, Temperatur, Inkubationszeit und Enzym/Substrat-Verhältnis sollte realisierbar sein.

Der salzgeschmacksverstärkende Effekt von L-Arginyl-Dipeptiden sollte in Abhängigkeit von dessen Konzentration untersucht werden. In der Literatur gibt es bereits erste Hinweise dafür, dass erhöhte Konzentrationen zu einem intensiveren Salzgeschmack führen. Gewonnene Erkenntnisse würden die richtige Dosierung der Peptide in Lebensmitteln ermöglichen. Außerdem könnte das Potenzial von L-Arginyl-Dipeptiden zur Salzreduktion besser abgeschätzt werden.

Diese Arbeit verweist auf die Existenz weiterer salzgeschmackverstärkender Peptide. Ihre Identifizierung könnte durch eine mehrstufige aktivitätsorientierte Reinigung der Hydrolyseprodukte in Kombination mit LC-MS/MS-Experimenten erfolgen.

In welcher Form die basidiomycetischen Peptidasen zur Bildung salzgeschmacksverstärkender Peptide Anwendung in der Lebensmittelindustrie finden könnten, ist noch offen. Es besteht die Option, die Zielmoleküle während der Lebensmittelverarbeitung zu generieren. Außerdem ist es denkbar, salzgeschmacksverstärkende Peptide zu erzeugen und diese Lebensmitteln zuzusetzen. Beide Strategien sollten abgewogen und untersucht werden. Besonders im Bereich der Käseherstellung ist allerdings der Zusatz von Peptiden oder Enzymen auf dem deutschen Markt stark reglementiert. Die vielversprechendste Anwendungsmöglichkeit ist derzeit in dem Zusatz von Peptiden zu Frisch- und Schmelzkäse zu sehen, für die weniger Beschränkungen der Inhaltsstoffe gelten. Applikationsstudien in diesen Käseprodukten sollten folgen. Dabei ist neben dem Geschmack auch die Stabilität der salzgeschmacksverstärkenden Peptide unter den gegebenen Bedingungen zu überprüfen.

Unter Umständen wird es nötig sein, störende Proteine und Peptide aus den Hydrolysaten abzutrennen, um Nebengeschmäcke zu reduzieren. In dieser Arbeit wurde Adstringenz und ein süßer Geschmack durch nicht hydrolysiertes Lysozym beobachtet, welches mittels Ultrafiltration entfernt werden könnte. Die Trennung kleinerer Peptide in einem auch industriell realisierbaren Maßstab ist dagegen eine größere Herausforderung. Dafür sind verschiedene Strategien möglich wie die Bindung von (z. B. bitteren) Peptiden an aktivierten Kohlenstoff, mehrstufige Reinigungen durch Flüssigchromatografie oder Membranadsorption. Die simultane Produktion und Fraktionierung der Zielpeptide ist in einem Membranreaktor in Verbindung mit der Chromatografie oder durch die Elektrodialyse in Kombination mit Ultrafiltrationseinheiten denkbar.

Diese Arbeit befasst sich mit der Proteinhydrolyse zur Erzeugung salzgeschmackverstärkender Peptide. Dennoch soll ein kurzer Ausblick darüber hinaus gegeben werden. Für Tve wurden zwei

prolylspezifische Peptidasen sequenziert und für Gfr und Per wurde prolylspezifische Aktivität mit *p*NA-Substraten detektiert. Prolyl-Peptidasen haben vielfältige Einsatzmöglichkeiten in der Pharmazie und Lebensmittelindustrie. Daher könnten sich weitere Arbeiten mit der Isolierung und biochemischen Charakterisierung dieser Peptidasen befassen. Außerdem könnten die affinitätschromatografisch isolierten Aspartatpeptidasen von Gfr, Pch und Psan auf ihr Potenzial zur Milch-Dicklegung überprüft werden.

6 Literaturverzeichnis

Aaslyng, M.D., Martens, M., Poll, L., Nielsen, P.M., Flyge, H., Larsen, L.M., (1998). Chemical and Sensory Characterization of Hydrolyzed Vegetable Protein, a Savory Flavoring. *J. Agric. Food Chem.* 46, 481-489.

Aaslyng, M.D., Poll, L., Nielsen, P.M., Flyge, H., (1999). Sensory, chemical and sensometric studies of hydrolyzed vegetable protein produced by various processes. *Eur. Food Res. Technol.* 209, 227-236.

Abd El-Baky, H., Linke, D., Metry, W.A., El-Demerdash, O., Berger, R.G., (2011a). Submerged cultured basidiomycete fungi secrete peptidases with distinct milk clotting properties. *Adv. Food Sci.* 33, 109-115

Abd El-Baky, H., Linke, D., Nimtz, M., Berger, R.G., (2011b). PsoP1, a Milk-Clotting Aspartic Peptidase from the Basidiomycete Fungus *Piptoporus soloniensis*. *J. Agric. Food Chem.* 59, 10311-10316.

Alfaro, M., Oguiza, J.A., Ramírez, L., Pisabarro, A.G., (2014). Comparative analysis of secretomes in basidiomycete fungi. *J. Proteomics* 102, 28-43.

Altug, T., Demirag, K., (1993). Influence of monosodium glutamate on flavour acceptability and on the reduction of sodium chloride in some ready-made soups. *Chemie, Mikrobiologie, Technologie der Lebensmittel* 15, 161-164.

Antila, P., Paakkari, I., Järvinen, A., Mattila, M.J., Laukkanen, M., Pihlanto-Leppälä, A., Mäntsälä, P., Hellman, J., (1991). Opioid peptides derived from in-vitro proteolysis of bovine whey proteins. *Int. Dairy J.* 1, 215-229.

Arvaniti, F., Priftis, K.N., Papadimitriou, A., Yiallourous, P., Kapsokefalou, M., Anthracopoulos, M.B., Panagiotakos, D.B., (2011). Salty-snack eating, television or video-game viewing, and asthma symptoms among 10- to 12-year-old children: the PANACEA study. *J. Am. Diet. Assoc.* 111, 251-257.

Belitz, H.D., Grosch, W., Schieberle, P., (2007). *Lehrbuch der Lebensmittelchemie*. Springer, Berlin.

- Berglund, K.A., Alizadeh, H., (1999). Composition and method for producing a salty taste. United States Patent, US5897908 A.
- Bibbins-Domingo, K., Chertow, G.M., Coxson, P.G., Moran, A., Lightwood, J.M., Pletcher, M.J., Goldman, L., (2010). Projected Effect of Dietary Salt Reductions on Future Cardiovascular Disease. *New Engl. J. Med.* 362, 590-599.
- Bongers, J., Heimer, E.P., (1994). Recent applications of enzymatic peptide synthesis. *Peptides* 15, 183-193.
- Braaksma, M., Smilde, A.K., van der Werf, M.J., Punt, P.J., (2009). The effect of environmental conditions on extracellular protease activity in controlled fermentations of *Aspergillus niger*. *Microbiology* 155, 3430-3439.
- Bradford, M.M., (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Brady, M., (2002). Sodium Survey of the usage and functionality of salt as an ingredient in UK manufactured food products. *Br. Food J.* 104, 84-125.
- Breslin, P.A.S., Beauchamp, G.K., (1997). Salt enhances flavour by suppressing bitterness. *Nature* 387, 563-563.
- Britton, H.T.S., Robinson, R.A., (1931). Universal buffer solutions and the dissociation constant of veronal. *J. Chem. Soc.*, 1456-1462.
- Brown, I.J., Tzoulaki, I., Candeias, V., Elliott, P., (2009). Salt intakes around the world: implications for public health. *Int. J. Epidemiol.* 38, 791-813.
- Budič, M., Kidrič, M., Meglič, V., Cigić, B., (2009). A quantitative technique for determining proteases and their substrate specificities and pH optima in crude enzyme extracts. *Anal. Biochem.* 388, 56-62.
- Budzen, S., Rymaszewska, J., (2013). The biological role of carnosine and its possible applications in medicine. *Adv. Clin. Exp. Med.* 22, 739-744.

- Byun, T., Kofod, L., Blinkovsky, A., (2001). Synergistic Action of an X-Prolyl Dipeptidyl Aminopeptidase and a Non-Specific Aminopeptidase in Protein Hydrolysis. *J. Agric. Food Chem.* 49, 2061-2063.
- Cappuccio, F.P., Kalaitzidis, R., Duneclift, S., Eastwood, J.B., (2000). Unravelling the links between calcium excretion, salt intake, hypertension, kidney stones and bone metabolism. *J. Nephrol.* 13, 169-177.
- Chamrád, I., Strouhal, O., Řehulka, P., Lenobel, R., Šebela, M., (2011). Microscale affinity purification of trypsin reduces background peptides in matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of protein digests. *J. Proteomics* 74, 948-957.
- Cheison, S.C., Wang, Z., Xu, S.-Y., (2007). Use of macroporous adsorption resin for simultaneous desalting and debittering of whey protein hydrolysates. *Int. J. Food Sci. Tech.* 42, 1228-1239.
- Chen, J.T., Chao, M.L., Wen, C.Y., Chu, W.S., (2012). Screening, purification, and characterization of an extracellular prolyl oligopeptidase from *Coprinopsis clastophylla*. *J. Microbiol.* 50, 652-659.
- Chigurupati, S., (2007). Low-sodium salt composition. United States Patent, US20070059428 A1.
- Chigurupati, S.R., Parekh, K.G., May, W.A., (2001). Method for producing a savory flavor base. United States Patent, US6251443 B1.
- Choi, B.-S., Sapkota, K., Choi, J.-H., Shin, C.-h., Kim, S., Kim, S.-J., (2013). Herinase: A Novel Bi-functional Fibrinolytic Protease from the Monkey Head Mushroom, *Hericium erinaceum*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 170, 609-622.
- Cianciaruso, B., Bellizzi, V., Minutolo, R., Tavera, A., Capuano, A., Conte, G., De Nicola, L., (1998). Salt Intake and Renal Outcome in Patients with Progressive Renal Disease. *Miner. Electrolyte Metab.* 24, 296-301.
- Cook, N.R., Cutler, J.A., Obarzanek, E., Buring, J.E., Rexrode, K.M., Kumanyika, S.K., Appel, L.J., Whelton, P.K., (2007). Long term effects of dietary sodium reduction on cardiovascular disease outcomes: observational follow-up of the trials of hypertension prevention (TOHP). *BMJ* 334, 885.
- Council of the European Union, (2010). Council Conclusions on Action to Reduce Population Salt Intake for Better Health.

- Cui, C., Zhou, X., Zhao, M., Yang, B., (2009). Effect of thermal treatment on the enzymatic hydrolysis of chicken proteins. *Innov. Food Sci. Emerg.* 10, 37-41.
- Daniels, D., Fluharty, S.J., (2004). Salt appetite: a neurohormonal viewpoint. *Physiol. Behav.* 81, 319-337.
- Dass, S.B., Dosoretz, C., Reddy, C.A., Grethlein, H., (1995). Extracellular proteases produced by the wood-degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium* under ligninolytic and non-ligninolytic conditions. *Arch. Microbiol.* 163, 254-258.
- Denton, D., Weisinger, R., Mundy, N.I., Wickings, E.J., Dixson, A., Moisson, P., Pingard, A.M., Shade, R., Carey, D., Ardaillou, R., Paillard, F., Chapman, J., Thillet, J., Baptiste Michel, J., (1995). The effect of increased salt intake on blood pressure of chimpanzees. *Nat. Med.* 1, 1009-1016.
- Derave, W., Everaert, I., Beeckman, S., Baguet, A., (2010). Muscle carnosine metabolism and beta-alanine supplementation in relation to exercise and training. *Sports Med.* 40, 247-263.
- Djordjevic, J., Zatorre, R.J., Jones-Gotman, M., (2004). Odor-induced changes in taste perception. *Exp. Brain Res.* 159, 405-408.
- Doaei, S., Gholamalizadeh, M., (2014). The association of genetic variations with sensitivity of blood pressure to dietary salt: A narrative literature review. *ARYA Atheroscler* 10, 169-174.
- Doekel, S., Marahiel, M.A., (2000). Dipeptide formation on engineered hybrid peptide synthetases. *Chem. Biol.* 7, 373-384.
- Dötsch, M., Busch, J., Batenburg, M., Liem, G., Tareilus, E., Mueller, R., Meijer, G., (2009). Strategies to Reduce Sodium Consumption: A Food Industry Perspective. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 49, 841-851.
- Dubovenko, A.G., Dunaevsky, Y.E., Belozersky, M.A., Oppert, B., Lord, J.C., Elpidina, E.N., (2010). Trypsin-like proteins of the fungi as possible markers of pathogenicity. *Fungal Biol.* 114, 151-159.
- Dunaevsii, Y.E., Zhang, D., Matveeva, A.R., Belyakova, G.A., Belozerskii, M.A., (2006). Degradation of proteinaceous substrates by xylotrophic basidiomycetes. *Microbiology* 75, 35-39.
- Dunaevskii, Y.E., Gruban, T.N., Belyakova, G.A., Belozerskii, M.A., (2006). Extracellular proteinases of filamentous fungi as potential markers of phytopathogenesis. *Microbiology* 75, 649-652.

- Dunaevskii, Y.E., Matveeva, A.R., Fatkhullina, G.N., Beliakova, G.A., Kolomiets, T.M., Kovalenko, E.D., Belozerskii, M.A., (2008). Extracellular proteases of mycelial fungi as participants of pathogenic processes. *Bioorg. Khim* 34, 317-321.
- Dunkel, A., Köster, J., Hofmann, T., (2007). Molecular and Sensory Characterization of γ -Glutamyl Peptides as Key Contributors to the Kokumi Taste of Edible Beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *J. Agric. Food Chem.* 55, 6712-6719.
- Edens, L., Dekker, P., van der Hoeven, R., Deen, F., de Roos, A., Floris, R., (2005). Extracellular Prolyl Endoprotease from *Aspergillus niger* and Its Use in the Debittering of Protein Hydrolysates. *J. Agric. Food Chem.* 53, 7950-7957.
- Eisele, N., Linke, D., Nimtz, M., Berger, R.G., (2011). Heterologous expression, refolding and characterization of a salt activated subtilase from *Pleurotus ostreatus*. *Process Biochem.* 46, 1840-1846.
- El-Agamy, E.I., (2007). The challenge of cow milk protein allergy. *Small Ruminant Res.* 68, 64-72.
- Ellström, M., Shah, F., Johansson, T., Ahren, D., Persson, P., Tunlid, A., (2015). The carbon starvation response of the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus*. *FEMS Microbiol. Ecol.* 91, 15.
- Ferry, A.L., Hort, J., Mitchell, J.R., Lagarrigue, S., Pamies, B.V., (2004). Effect of Amylase Activity on Starch Paste Viscosity and its Implications for Flavor Perception. *J. Texture Stud.* 35, 511-524.
- FitzGerald, R.J., O'Cuinn, G., (2006). Enzymatic debittering of food protein hydrolysates. *Biotechnol. Adv.* 24, 234-237.
- Floudas, D., Binder, M., Riley, R., Barry, K., Blanchette, R.A., Henrissat, B., Martinez, A.T., Otilar, R., Spatafora, J.W., Yadav, J.S., Aerts, A., Benoit, I., Boyd, A., Carlson, A., Copeland, A., Coutinho, P.M., de Vries, R.P., Ferreira, P., Findley, K., Foster, B., Gaskell, J., Glotzer, D., Gorecki, P., Heitman, J., Hesse, C., Hori, C., Igarashi, K., Jurgens, J.A., Kallen, N., Kersten, P., Kohler, A., Kues, U., Kumar, T.K., Kuo, A., LaButti, K., Larrondo, L.F., Lindquist, E., Ling, A., Lombard, V., Lucas, S., Lundell, T., Martin, R., McLaughlin, D.J., Morgenstern, I., Morin, E., Murat, C., Nagy, L.G., Nolan, M., Ohm, R.A., Patyshakuliyeva, A., Rokas, A., Ruiz-Duenas, F.J., Sabat, G., Salamov, A., Samejima, M., Schmutz, J., Slot, J.C., St John, F., Stenlid, J., Sun, H., Sun, S., Syed, K., Tsang, A., Wiebenga, A., Young, D., Pisabarro,

- A., Eastwood, D.C., Martin, F., Cullen, D., Grigoriev, I.V., Hibbett, D.S., (2012). The Paleozoic origin of enzymatic lignin decomposition reconstructed from 31 fungal genomes. *Science* 336, 1715-1719.
- Fox, P.F., McSweeney, P.L.H., Cogan, T.M., Guinee, T.P., (2004). *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology: General Aspects*. Elsevier Academic, London.
- Frehlick, L.J., Eirín-lópez, J.M., Prado, A., Su, H.W., Kasinsky, H.E., Ausió, J., (2006). Sperm nuclear basic proteins of two closely related species of scorpaeniform fish (*Sebastes maliger*, *Sebastobus* sp.) with different sexual reproduction and the evolution of fish protamines. *J. Exp. Zool. A Comp. Exp. Biol.* 305A, 277-287.
- Fu, J., Li, L., Yang, X.-Q., (2011). Specificity of Carboxypeptidases from *Actinomucor elegans* and Their Debittering Effect on Soybean Protein Hydrolysates. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 165, 1201-1210.
- Gajda, E., Bugla-Ploskonska, G., (2014). Lysozyme-occurrence in nature, biological properties and possible applications. *Postepy Hig. Med. Dosw.* 68, 1501-1515.
- Gass, J., Khosla, C., (2007). Prolyl endopeptidases. *Cell. Mol. Life Sci.* 64, 345-355.
- Giesler, L., Linke, D., Berger, R.G., (2014). Factors Limiting the Enzymatic Hydrolysis of Wheat Gluten. *J. Agric. Food Chem.* 62, 4762-4768.
- Giesler, L., Linke, D., Rabe, S., Appel, D., Berger, R.G., (2013). Hydrolysis of Wheat Gluten by Combining Peptidases of *Flammulina velutipes* and Electrodialysis. *J. Agric. Food Chem.* 61, 8641-8649.
- Goh, F.X.W., Itohiya, Y., Shimojo, R.Y.O., Sato, T., Hasegawa, K., Leong, L.P., (2011). Using naturally brewed soy sauce to reduce salt in selected foods. *J. Sens. Stud.* 26, 429-435.
- Grant, H., Reischman, F., (1946). The effects of the ingestion of large amounts of sodium chloride on the arterial and venous pressures of normal subjects. *Am. Heart J.* 32, 704-712.
- Graudal, N.A., Hubeck-Graudal, T., Jürgens, G., (2012). Effects of Low-Sodium Diet vs. High-Sodium Diet on Blood Pressure, Renin, Aldosterone, Catecholamines, Cholesterol, and Triglyceride (Cochrane Review). *Am. J. Hypertens.* 25, 1-15.
- Gravina, S.A., Yep, G.L., Khan, M., (2013). Human biology of taste. *Ann. Saudi Med.* 33, 217-222.

- Grimrath, A., (2011). Neue Peptidasen aus Basidiomyceten für die Glutenhydrolyse. Leibniz Universität Hannover, Dissertation.
- Grimrath, A., Berends, P., Rabe, S., Berger, R.G., Linke, D., (2011). Koji fermentation based on extracellular peptidases of *Flammulina velutipes*. Eur. Food Res. Technol. 232, 415-424.
- Group, I.C.R., (1988). Intersalt: an international study of electrolyte excretion and blood pressure. Results for 24 hour urinary sodium and potassium excretion. Intersalt Cooperative Research Group. BMJ 297, 319-328.
- Guerrero, A., Kwon, S.S.Y., Vadehra, D.V., (1998). Compositions to enhance taste of salt used in reduced amounts. United States Patent, US5711985 A.
- Guidot, A., Verner, M.C., Debaud, J.C., Marmeisse, R., (2005). Intraspecific variation in use of different organic nitrogen sources by the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporium*. Mycorrhiza 15, 167-177.
- Guinee, T.P., Fox, P.F., (2004). Salt in Cheese: Physical, Chemical and Biological Aspects, in: Patrick F. Fox, P.L.H.M.T.M.C., Timothy, P.G. (Eds.), Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology. Elsevier Academic, 207-259.
- Gzogyan, L.A., Proskuryakov, M.T., Ievleva, E.V., Valueva, T.A., (2005). Trypsin-like Proteinases and Trypsin Inhibitors in Fruiting Bodies of Higher Fungi. Appl. Biochem. Microbiol. 41, 538-541.
- Hamlet, C.G., Sadd, P.A., Crews, C., Velisek, J., Baxter, D.E., (2002). Occurrence of 3-chloro-propane-1,2-diol (3-MCPD) and related compounds in foods: a review. Food Addit. Contam. 19, 619-631.
- He, F., Li, J., MacGregor, G., (2013). Effect of longer-term modest salt reduction on blood pressure. Cochrane Database Syst. Rev. 30.
- He, F.J., MacGregor, G.A., (2010). Reducing population salt intake worldwide: from evidence to implementation. Prog. Cardiovasc. Dis. 52, 363-382.

Hendriks, D., Wang, W., Scharpé, S., Lommaert, M.-P., van Sande, M., (1990). Purification and characterization of a new arginine carboxypeptidase in human serum. *Biochim. Biophys. Acta* 1034, 86-92.

Hiwatashi, K., Hori, K., Takahashi, K., Kagaya, A., Inoue, S., Sugiyama, T., Takahashi, S., (2004). Purification and Characterization of a Novel Prolyl Aminopeptidase from *Maitake* (*Grifola frondosa*). *Biosci., Biotechnol., Biochem.* 68, 1395-1397.

Holt, C., (2013). Unfolded phosphopolypeptides enable soft and hard tissues to coexist in the same organism with relative ease. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 23, 420-425.

Huynh, H.L., Danhi, R., Yan, S.W., (2015). Using Fish Sauce as a Substitute for Sodium Chloride in Culinary Sauces and Effects on Sensory Properties. *J. Food Sci.* 27, 1750-3841.

Iketani, A., Nakamura, M., Suzuki, Y., Awai, K., Shioi, Y., (2013). A novel serine protease with caspase- and legumain-like activities from edible basidiomycete *Flammulina velutipes*. *Fungal Biol.* 117, 173-181.

Ire, F.S., Okolo, B.N., Moneke, A.N., Odibo, F.J., (2011). Influence of cultivation conditions on the production of a protease from *Aspergillus carbonarius* using submerged fermentation. *AJES* 5, 353-365.

Ise, N., Kakiuchi, T., Takano, H., (1996). Utilization of sodium and potassium gluconates for baked goods. WIPO Patent, WO1996017521 A1.

Ishibashi, N., (1988). Taste of Proline-containing Peptides. *Agric. Biol. Chem.* 52, 95-98.

Iversen, S., Jørgensen, M., (1995). Azocasein assay for alkaline protease in complex fermentation broth. *Biotechnol. Tech.* 9, 573-576.

Jaya Prakash Goud, M., Suryam, A., Lakshmipathi, V., Singara Charya, M.A., (2008). Extracellular hydrolytic enzyme profiles of certain South Indian basidiomycetes. *Afr. J. Biotechnol.* 8, 354–360.

Jensen, M., Smith, G., Fear, S., Schilmoeller, L., Johnson, C., (2011). Seasoning and method for seasoning a food product while reducing dietary sodium intake. United States Patent, US7923047 B2.

- Jin-Young Suh, Hyun-Soo Kim, Myung-Chul Kim, Kong, K.-H., (2014). Design and Evaluation of Synthetic Peptides Corresponding to the Sweetness Loop of the Sweet-Tasting Protein Brazzein. *Bull. Korean Chem. Soc.* 35, 3353-3356.
- Juárez-Montiel, M., Ibarra, J.A., Chávez-Camarillo, G., Hernández-Rodríguez, C., Villa-Tanaca, L., (2014). Molecular Cloning and Heterologous Expression in *Pichia pastoris* of X-Prolyl-dipeptidyl Aminopeptidase from Basidiomycete *Ustilago maydis*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 172, 2530-2539.
- Kammerdetch, C., Weiss, M., Kasper, C., Scheper, T., (2007). An improvement of potato pulp protein hydrolyzation process by the combination of protease enzyme systems. *Enzyme Microb. Technol.* 40, 508-514.
- Kang, C., Yu, X.-W., Xu, Y., (2014). Purification and characterization of a prolyl endopeptidase isolated from *Aspergillus oryzae*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 41, 49-55.
- Kang, T.H., Yun, D.H., Lee, E.H., Chung, Y.B., Bae, Y.A., Chung, J.Y., Kang, I., Kim, J., Cho, S.Y., Kong, Y., (2004). A cathepsin F of adult *Clonorchis sinensis* and its phylogenetic conservation in trematodes. *Parasitology* 128, 195-207.
- Karppanen, H., Mervaala, E., (2006). Sodium Intake and Hypertension. *Prog. Cardiovasc. Dis.* 49, 59-75.
- Katz, M., Bernardo, S., Cheetham, B., (2008). The interaction of induction, repression and starvation in the regulation of extracellular proteases in *Aspergillus nidulans*: evidence for a role for CreA in the response to carbon starvation. *Curr. Genet.* 54, 47-55.
- Keast, R.S.J., Canty, T.M., Breslin, P.A.S., (2004). The Influence of Sodium Salts on Binary Mixtures of Bitter-tasting Compounds. *Chem. Senses* 29, 431-439.
- Khiari, Z., Ndagijimana, M., Betti, M., (2014). Low molecular weight bioactive peptides derived from the enzymatic hydrolysis of collagen after isoelectric solubilization/precipitation process of turkey by-products. *Poult. Sci.* 93, 2347-2362.
- Kino, H., Kakutani, M., Hattori, K., Tojo, H., Komai, T., Nammoku, T., Kino, K., (2015). Screening of Salt Taste Enhancing Dipeptides Based on a New Strategy Using L-Amino Acid Ligase. *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi* 62, 274-281.

Kirsch, L.d.S., Pinto, A.C.d.S., Porto, T.S., Porto, A.L.F., Teixeira, M.F.S., (2011). The influence of different submerged cultivation conditions on mycelial biomass and protease production by *Lentinus citrinus* Walley et Rammeloo DPUA 1535 (Agaricomycetidae). *Int. J. Med. Mushrooms* 13, 185-192.

van der Klaauw, N.J., Smith, D.V., (1995). Taste quality profiles for fifteen organic and inorganic salts. *Physiol. Behav.* 58, 295-306.

Kohl, S., Behrens, M., Dunkel, A., Hofmann, T., Meyerhof, W., (2013). Amino Acids and Peptides Activate at Least Five Members of the Human Bitter Taste Receptor Family. *J. Agric. Food Chem.* 61, 53-60.

Kohler, A., Kuo, A., Nagy, L.G., Morin, E., Barry, K.W., Buscot, F., Canback, B., Choi, C., Cichocki, N., Clum, A., Colpaert, J., Copeland, A., Costa, M.D., Dore, J., Floudas, D., Gay, G., Girlanda, M., Henrissat, B., Herrmann, S., Hess, J., Hogberg, N., Johansson, T., Khouja, H.R., LaButti, K., Lahrmann, U., Levasseur, A., Lindquist, E.A., Lipzen, A., Marmeisse, R., Martino, E., Murat, C., Ngan, C.Y., Nehls, U., Plett, J.M., Pringle, A., Ohm, R.A., Perotto, S., Peter, M., Riley, R., Rineau, F., Ruytinx, J., Salamov, A., Shah, F., Sun, H., Tarkka, M., Tritt, A., Veneault-Fourrey, C., Zuccaro, A., Tunlid, A., Grigoriev, I.V., Hibbett, D.S., Martin, F., (2015). Convergent losses of decay mechanisms and rapid turnover of symbiosis genes in mycorrhizal mutualists. *Nat. Genet.* 47, 410-415.

Koliandris, A.-L., Morris, C., Hewson, L., Hort, J., Taylor, A.J., Wolf, B., (2010). Correlation between saltiness perception and shear flow behaviour for viscous solutions. *Food Hydrocoll.* 24, 792-799.

Konitzer, K., Pflaum, T., Oliveira, P., Arendt, E., Koehler, P., Hofmann, T., (2013). Kinetics of sodium release from wheat bread crumb as affected by sodium distribution. *J. Agric. Food Chem.* 61, 10659-10669.

Krehenbrink, M., Sallam, A., Steinbüchel, A., (2014). Biotechnological Approaches to Dipeptide Production, in: Grunwald, P. (Ed.), *Industrial Biocatalysis*. Pan Stanford Publishing, Singapur, 863-885.

Kremer, S., Mojet, J., Shimojo, R., (2009). Salt Reduction in Foods Using Naturally Brewed Soy Sauce. *J. Food Sci.* 74, 255-262.

Kudriavtseva, N.N., Gvozdeva, E.L., Sof'in, A.V., Valueva, T.A., (2010). The influence of cultural medium composition on the proteolytic enzyme secretion of fungus *Rhizoctonia solani*. *Prikl. Biokhim. Mikrobiol.* 46, 355-362.

- Kudryavtseva, O.A., Dunaevskii Ia, E., Kamzolkina, O.V., Belozerskii, M.A., (2008). Proteolytic enzymes of the fungi: extracellular proteases of xylotrophic basidiomycetes. *Mikrobiologiya* 77, 725-737.
- Kudryavtseva, O.A., Dunaevsky, Y.E., Kamzolkina, O.V., Belozersky, M.A., (2008). Fungal proteolytic enzymes: Features of the extracellular proteases of xylotrophic basidiomycetes. *Microbiology* 77, 643-653.
- Kühn, D., Dürrschmidt, P., Mansfeld, J., Ulbrich-Hofmann, R., (2002). Boilysin and thermolysin in dipeptide synthesis: a comparative study. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 36, 71-76.
- Kumar, D., Bhalla, T., (2005). Microbial proteases in peptide synthesis: approaches and applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 68, 726-736.
- Kupari, M., Koskinen, P., Virolainen, J., (1994). Correlates of left ventricular mass in a population sample aged 36 to 37 years. Focus on lifestyle and salt intake. *Circulation* 89, 1041-1050.
- Kuramitsu, R., Takahashi, M., Tahara, K., Nakamura, K., Okai, H., (1996). Tastes produced by peptides containing ionic groups and by related compounds. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 60, 1637-1642.
- Kurosawa, M., Kikuchi, S., Xu, J., Inaba, Y., (2006). Highly salted food and mountain herbs elevate the risk for stomach cancer death in a rural area of Japan. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 21, 1681-1686.
- Laemmli, U.K., (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lawrence, G., Salles, C., Palicki, O., Septier, C., Busch, J., Thomas-Danguin, T., (2011). Using cross-modal interactions to counterbalance salt reduction in solid foods. *Int. Dairy J.* 21, 103-110.
- Lawrence, G., Salles, C., Septier, C., Busch, J., Thomas-Danguin, T., (2009). Odour–taste interactions: A way to enhance saltiness in low-salt content solutions. *Food Qual. Prefer.* 20, 241-248.
- Lee, T.D., (1992). Salt enhancer. United State Patent, US5145707 A.
- Leksrisompong, P.P., Miracle, R.E., Drake, M., (2010). Characterization of Flavor of Whey Protein Hydrolysates. *J. Agric. Food Chem.* 58, 6318-6327.

- Leong, J., Kasamatsu, C., Ong, E., Hoi, J.T., Loong, M.N., (2015). A study on sensory properties of sodium reduction and replacement in Asian food using difference-from – control test. *Food Sci. Nutr.*
- Li, N., Wu, J.M., Zhang, L.F., Zhang, Y.Z., Feng, H., (2010). Characterization of a unique proline iminopeptidase from white-rot basidiomycetes *Phanerochaete chrysosporium*. *Biochimie* 92, 779-788.
- Lin, J.-S., Lee, S.-K., Chen, Y., Lin, W.-D., Kao, C.-H., (2011). Purification and Characterization of a Novel Extracellular Tripeptidyl Peptidase from *Rhizopus oligosporus*. *J. Agric. Food Chem.* 59, 11330-11337.
- Linke, D., Matthes, R., Nimtz, M., Zorn, H., Bunzel, M., Berger, R.G., (2013). An esterase from the basidiomycete *Pleurotus sapidus* hydrolyzes feruloylated saccharides. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97, 7241-7251.
- Liu, F., Yasuda, M., (2005). Debittering effect of *Monascus* carboxypeptidase during the hydrolysis of soybean protein. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 32, 487-489.
- Liu, X., Jiang, D., Peterson, D.G., (2014). Identification of Bitter Peptides in Whey Protein Hydrolysate. *J. Agric. Food Chem.* 62, 5719-5725.
- Luo, Y., Pan, K., Zhong, Q., (2014). Physical, chemical and biochemical properties of casein hydrolyzed by three proteases: Partial characterizations. *Food Chem.* 155, 146-154.
- Maehashi, K., Huang, L., (2009). Bitter peptides and bitter taste receptors. *Cell. Mol. Life Sci.* 66, 1661-1671.
- Maehashi, K., Matsuzaki, M., Yamamoto, Y., Udaka, S., (1999). Isolation of Peptides from an Enzymatic Hydrolysate of Food Proteins and Characterization of Their Taste Properties. *Biosci., Biotechnol., Biochem.* 63, 555-559.
- Maehashi, K., Udaka, S., (1998). Sweetness of Lysozymes. *Biosci., Biotechnol., Biochem.* 62, 605-606.
- Majumder, R., Banik, S.P., Khowala, S., (2015). Purification and characterisation of κ -casein specific milk-clotting metalloprotease from *Termitomyces clypeatus* MTCC 5091. *Food Chem.* 173, 441-448.

- Manabe, M., (2008). Saltiness enhancement by the characteristic flavor of dried bonito stock. *J. Food Sci.* 73, 321-325.
- Mandujano-González, V., Arana-Cuenca, A., Anducho-Reyes, M.Á., Téllez-Jurado, A., González-Becerra, A.E., Mercado-Flores, Y., (2013). Biochemical study of the extracellular aspartyl protease Eap1 from the phytopathogen fungus *Sporisorium reilianum*. *Protein Expression Purif.* 92, 214-222.
- Meiselman, H.L., Halpern, B.P., (1973). Enhancement of taste intensity through pulsatile stimulation. *Physiol. Behav.* 11, 713-716.
- Merrifield, R.B., (1963). Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide. *J. Am. Chem. Soc.* 85, 2149-2154.
- Mika, N., Zorn, H., Rühl, M., (2015). Prolyl-specific peptidases for applications in food protein hydrolysis. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99, 7837-7846.
- Miller, R., Hosney, R., (2008). Role of salt in baking. *Cereal Foods World* 53, 4-6.
- Montserrat, V., Bruins, M.J., Edens, L., Koning, F., (2015). Influence of dietary components on *Aspergillus niger* prolyl endoprotease mediated gluten degradation. *Food Chem.* 174, 440-445.
- Murooka, Y., Yamshita, M., (2008). Traditional healthful fermented products of Japan. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 35, 791-798.
- Nagata, C., Takatsuka, N., Shimizu, N., Shimizu, H., (2004). Sodium Intake and Risk of Death From Stroke in Japanese Men and Women. *Stroke* 35, 1543-1547.
- Nakamura, K., Kuramitsu, R., Kataoka, S., Segawa, D., Tahara, K., Tamura, M., Okai, H., (1996). Convenient Synthesis of L-Ornithyltaurine·HCl and the Effect on Saltiness in a Food Material. *J. Agric. Food Chem.* 44, 2481-2485.
- Nakata, T., Takahashi, M., Nakatani, M., Kuramitsu, R., Tamura, M., Okai, H., (1995). Role of Basic and Acidic Fragments in Delicious Peptides (Lys-Gly-Asp-Glu-Glu-Ser-Leu-Ala) and the Taste Behavior of Sodium and Potassium Salts in Acidic Oligopeptides. *Biosci., Biotechnol., Biochem.* 59, 689-693.

- Nasri, N., Beno, N., Septier, C., Salles, C., Thomas-Danguin, T., (2011). Cross-modal interactions between taste and smell: Odour-induced saltiness enhancement depends on salt level. *Food Qual. Prefer.* 22, 678-682.
- Nasri, N., Septier, C., Beno, N., Salles, C., Thomas-Danguin, T., (2013). Enhancing salty taste through odour–taste–taste interactions: Influence of odour intensity and salty tastants' nature. *Food Qual. Prefer.* 28, 134-140.
- Neuhauser, H., Thamm, M., Ellert, U., (2013). Blood pressure in Germany 2008-2011: results of the German Health Interview and Examination Survey for Adults (DEGS1). *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz* 56, 795-801.
- Newman, J., Egan, T., Harbourne, N., O'Riordan, D., Jacquier, J.C., O'Sullivan, M., (2014). Correlation of sensory bitterness in dairy protein hydrolysates: Comparison of prediction models built using sensory, chromatographic and electronic tongue data. *Talanta* 126, 46-53.
- Ney, K.H., (1971). Voraussage der Bitterkeit von Peptiden aus deren Aminosäurezusammensetzung. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 147, 64-68.
- Nielsen, P.M., Petersen, D., Dambmann, C., (2001). Improved Method for Determining Food Protein Degree of Hydrolysis. *J. Food Sci.* 66, 642-646.
- Nilsson, B.L., Soellner, M.B., Raines, R.T., (2005). Chemical Synthesis of Proteins. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 34, 91-118.
- Nishiwaki, T., Asano, S., Ohyama, T., (2009). Properties and substrate specificities of proteolytic enzymes from the edible basidiomycete *Grifola frondosa*. *J. Biosci. Bioeng.* 107, 605-609.
- Noguchi, T., Tehara, N., Uesugi, Y., Jung, S., Imai, N., (2012). Convenient Peptide Synthesis without Protection of C-Terminals. *Chem. Lett.* 41, 42-43.
- Nonaka, T., Hashimoto, Y., Takio, K., (1998). Kinetic characterization of lysine-specific metalloendopeptidases from *Grifola frondosa* and *Pleurotus ostreatus* fruiting bodies. *J. Biochem.* 124, 157-162.

- Noort, M.W.J., Bult, J.H.F., Stieger, M., Hamer, R.J., (2010). Saltiness enhancement in bread by inhomogeneous spatial distribution of sodium chloride. *J. Cereal Sci.* 52, 378-386.
- Nordberg, H., Cantor, M., Dusheyko, S., Hua, S., Poliakov, A., Shabalov, I., Smirnova, T., Grigoriev, I.V., Dubchak, I., (2014). The genome portal of the Department of Energy Joint Genome Institute: 2014 updates. *Nucleic Acids Res.* 42, 12.
- Ohta, S., Saitoh, C., Iwasaki, H., Morita, A., (2005). Method of enhancing salty taste, salty taste enhancer, salty taste seasoning agent and salty taste-enhanced foods. United States Patent, US6974597 B2.
- Okai, H., (2003). Taste-improving agent. European Patent, EP1310174 A1.
- Oliveira, M.G.A., De Simone, S.G., Xavier, L.P., Guedes, R.N.C., (2005). Partial purification and characterization of digestive trypsin-like proteases from the velvet bean caterpillar, *Anticarsia gemmatalis*. *Comp. Biochem. Physiol. B, Biochem. Mol. Biol.* 140, 369-380.
- Ottinger, H., Soldo, T., Hofmann, T., (2003). Discovery and Structure Determination of a Novel Maillard-Derived Sweetness Enhancer by Application of the Comparative Taste Dilution Analysis (cTDA). *J. Agric. Food Chem.* 51, 1035-1041.
- Palmieri, G., Bianco, C., Cennamo, G., Giardina, P., Marino, G., Monti, M., Sannia, G., (2001). Purification, characterization, and functional role of a novel extracellular protease from *Pleurotus ostreatus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 2754-2759.
- Park, I.S., Park, J.U., Seo, M.J., Kim, M.J., Lee, H.H., Kim, S.R., Kang, B.W., Choi, Y.H., Joo, W.H., Jeong, Y.K., (2010). Purification and biochemical characterization of a 17 kDa fibrinolytic enzyme from *Schizophyllum commune*. *J. Microbiol.* 48, 836-841.
- Park, S.-E., Li, M.-H., Kim, J.-S., Sapkota, K., Kim, J.-E., Choi, B.-S., Yoon, Y.-H., Lee, J.-C., Lee, H.-H., Kim, C.-S., Kim, S.-J., (2007). Purification and Characterization of a Fibrinolytic Protease from a Culture Supernatant of *Flammulina velutipes* Mycelia. *Biosci., Biotechnol., Biochem.* 71, 2214-2222.
- Parker, J.B., Walsh, C.T., (2013). Action and Timing of BacC and BacD in the Late Stages of Biosynthesis of the Dipeptide Antibiotic Bacilysin. *Biochemistry* 52, 889-901.

- Perry, I.J., Beevers, D.G., (1992). Salt intake and stroke: A possible direct effect. *J. Hum. Hypertens.* 6, 23-25.
- Phan, V.A., Yven, C., Lawrence, G., Chabanet, C., Reparet, J.M., Salles, C., (2008). In vivo sodium release related to salty perception during eating model cheeses of different textures. *Int. Dairy J.* 18, 956-963.
- Poulter, N.R., Khaw, K.T., Hopwood, B.E., Mugambi, M., Peart, W.S., Rose, G., Sever, P.S., (1990). The Kenyan Luo migration study: observations on the initiation of a rise in blood pressure. *BMJ* 300, 967-972.
- Rahulan, R., Dhar, K.S., Nampoothiri, K.M., Pandey, A., (2012). Aminopeptidase from *Streptomyces gedanensis* as a useful Tool for Protein Hydrolysate Preparations with Improved Functional Properties. *J. Food Sci.* 77, C791-C797.
- Rawlings, N.D., Waller, M., Barrett, A.J., Bateman, A., (2014). MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. *Nucleic Acids Res.* 42, D503–D509.
- Rehm, H., Letzel, T., (2009). *Der Experimentator: Proteinbiochemie/Proteomics*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- Reichard, U., Lechenne, B., Asif, A.R., Streit, F., Grouzmann, E., Jousson, O., Monod, M., (2006). Sedolisins, a new class of secreted proteases from *Aspergillus fumigatus* with endoprotease or tripeptidyl-peptidase activity at acidic pHs. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 1739-1748.
- Ryberg, P., (2010). Salt mixture with low sodium content for human. United States Patent, US20100247709 A1.
- Sabotič, J., Trček, T., Popovič, T., Brzin, J., (2007). Basidiomycetes harbour a hidden treasure of proteolytic diversity. *J. Biotechnol.* 128, 297-307.
- Sacks, F.M., Svetkey, L.P., Vollmer, W.M., Appel, L.J., Bray, G.A., Harsha, D., Obarzanek, E., Conlin, P.R., Miller, E.R., 3rd, Simons-Morton, D.G., Karanja, N., Lin, P.H., (2001). Effects on blood pressure of reduced dietary sodium and the Dietary Approaches to Stop Hypertension (DASH) diet. DASH-Sodium Collaborative Research Group. *N. Engl. J. Med.* 344, 3-10.
- Saha, B.C., Hayashi, K., (2001). Debittering of protein hydrolyzates. *Biotechnol. Adv.* 19, 355-370.

- Schechter, I., Berger, A., (1967). On the size of the active site in proteases. I. Papain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 27, 157-162.
- Schindler, A., Dunkel, A., Stähler, F., Backes, M., Ley, J., Meyerhof, W., Hofmann, T., (2011). Discovery of Salt Taste Enhancing Arginyl Dipeptides in Protein Digests and Fermented Fish Sauces by Means of a Sensomics Approach. *J. Agric. Food Chem.* 59, 12578-12588.
- Schroeder, H.A., Goldman, M.L., et al., (1949). Low sodium chloride diets in hypertension; effects on blood pressure. *J. Am. Med. Assoc.* 140, 458-463.
- Seo, H.S., Iannilli, E., Hummel, C., Okazaki, Y., Buschhüter, D., Gerber, J., Krammer, G.E., van Lengerich, B., Hummel, T., (2013). A salty-congruent odor enhances saltiness: Functional magnetic resonance imaging study. *Hum. Brain Mapp.* 34, 62-76.
- Shah, F., Rineau, F., Canback, B., Johansson, T., Tunlid, A., (2013). The molecular components of the extracellular protein-degradation pathways of the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus*. *New Phytol.* 200, 875-887.
- Shepherd, R., Wharf, S.G., Farleigh, C.A., (1989). The effect of a surface coating of table salt of varying grain size on perceived saltiness and liking for paté. *Int. J. Food Sci. Tech.* 24, 333-340.
- Shibata, Y., Miwa, Y., Hirai, K., Fujimura, S., (2003). Purification and partial characterization of a dipeptidyl peptidase from *Prevotella intermedia*. *Oral Microbiol. Immunol.* 18, 196-198.
- Shimono, M., Sugiyama, K., (2013). Salty taste enhancer and food or drink containing the same. United States Patent, US8409653 B2.
- Silva, B.L., Geraldés, F.M., Murari, C.S., Gomes, E., Da-Silva, R., (2014). Production and Characterization of a Milk-clotting Protease Produced in Submerged Fermentation by the Thermophilic Fungus *Thermomucor indicae-seudaticae* N31. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 172, 1999-2011.
- Sinopoli, D.A., Lawless, H.T., (2012). Taste properties of potassium chloride alone and in mixtures with sodium chloride using a check-all-that-apply method. *J. Food Sci.* 77, 1750-3841.

Soldo, T., Frank, O., Ottinger, H., Hofmann, T., (2004). Systematic studies of structure and physiological activity of alapyridaine. A novel food-born taste enhancer. *Mol. Nutr. Food Res.* 48, 270-281.

Souci, S.W., Fachmann, W., Kraut, H., (2008). *Food Composition and Nutrition Tables*. MedPharm, Stuttgart.

Souza, P.M.d., Bittencourt, M.L.d.A., Caprara, C.C., Freitas, M.d., Almeida, R.P.C.d., Silveira, D., Fonseca, Y.M., Ferreira Filho, E.X., Pessoa Junior, A., Magalhães, P.O., (2015). A biotechnology perspective of fungal proteases. *Braz. J. Microbiol.* 46, 337-346.

Sprecher, E., (1959). Über die Guttation bei Pilzen. *Planta* 53, 565-574.

Sriranganadane, D., Waridel, P., Salamin, K., Reichard, U., Grouzmann, E., Neuhaus, J.-M., Quadroni, M., Monod, M., (2010). *Aspergillus* Protein Degradation Pathways with Different Secreted Protease Sets at Neutral and Acidic pH. *J. Proteome Res.* 9, 3511-3519.

Stefanović, A., Jovanović, J., Grbavčić, S., Šekuljica, N., Manojlović, V., Bugarski, B., Knežević-Jugović, Z., (2014). Impact of ultrasound on egg white proteins as a pretreatment for functional hydrolysates production. *Eur. Food Res. Technol.* 239, 979-993.

Stieger, M., (2011). Texture-taste interactions: Enhancement of taste intensity by structural modifications of the food matrix. *Procedia Food Sci.* 1, 521-527.

Stieger, M.A., Bult, J.H.F., Hamer, R.J., Noort, M.W.J., (2009a). Flour-based food product with inhomogeneous tastant bulk distribution and method for making such food product. WIPO Patent, WO2009108058 A1.

Stieger, M.A., Bult, J.H.F., Hamer, R.J., Noort, M.W.J., (2009b). Food product with inhomogeneous tastant bulk distribution and method for making such food product. WIPO Patent, WO2009108057 A1.

Tabata, K., Ikeda, H., Hashimoto, S., (2005). ywfE in *Bacillus subtilis* codes for a novel enzyme, L-amino acid ligase. *J. Bacteriol.* 187, 5195-5202.

Tada, M., Shinoda, I., Okai, H., (1984). L-Ornithyltaurine, a new salty peptide. *J. Agric. Food Chem.* 32, 992-996.

- Takano, H., Kondou, R., (2002). Sodium Gluconate and Potassium Gluconate as Substitutes for Sodium Chloride in Breadmaking. *Food Sci. Technol. Res.* 8, 75-79.
- Tamura, M., Seki, T., Kawasaki, Y., Tada, M., Kikuchi, E., Okai, H., (1989). An Enhancing Effect on the Saltiness of Sodium Chloride of Added Amino Acids and Their Esters. *Agric. Biol. Chem.* 53, 1625-1633.
- Tan, P.S., van Kessel, T.A., van de Veerdonk, F.L., Zuurendonk, P.F., Bruins, A.P., Konings, W.N., (1993). Degradation and debittering of a tryptic digest from beta-casein by aminopeptidase N from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* Wg2. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 1430-1436.
- Tavano, O.L., (2013). Protein hydrolysis using proteases: An important tool for food biotechnology. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 90, 1-11.
- The UniProt Consortium, (2015). UniProt: a hub for protein information. *Nucleic Acids Res.* 43, D204-D212.
- Toelstede, S., Hofmann, T., (2008a). Quantitative studies and taste re-engineering experiments toward the decoding of the nonvolatile sensometabolome of Gouda cheese. *J. Agric. Food Chem.* 56, 5299-5307.
- Toelstede, S., Hofmann, T., (2008b). Sensomics Mapping and Identification of the Key Bitter Metabolites in Gouda Cheese. *J. Agric. Food Chem.* 56, 2795-2804.
- Toldra, F., Barat, J.M., (2012). Strategies for salt reduction in foods. *Recent Pat. Food Nutr. Agric.* 4, 19-25.
- Uchida, Y., Iritani, S., Miyake, T., (2000). Method for enhancing the salty-taste and/or delicious-taste of food products. United States Patent, US6159529 A.
- Udenigwe, C.C., Aluko, R.E., (2012). Food Protein-Derived Bioactive Peptides: Production, Processing, and Potential Health Benefits. *J. Food Sci.* 77, R11-R24.
- Vasquez, R.E., (2008). Non-bitter sodium-free or low-sodium salt composition. WIPO Patent, WO2008116142 A1.

- Vollmer, W.M., Sacks, F.M., Ard, J., Appel, L.J., Bray, G.A., Simons-Morton, D.G., Conlin, P.R., Svetkey, L.P., Erlinger, T.P., Moore, T.J., (2001). Effects of diet and sodium intake on blood pressure: subgroup analysis of the DASH-sodium trial. *Ann. Intern. Med.* 135, 1019-1028.
- Wang, J., Wei, Z., Li, L., Bian, K., Zhao, M., (2009). Characteristics of enzymatic hydrolysis of thermal-treated wheat gluten. *J. Cereal Sci.* 50, 205-209.
- Wang, W., Hendriks, D.F., Scharpé, S.S., (1994). Carboxypeptidase U, a plasma carboxypeptidase with high affinity for plasminogen. *J. Biol. Chem.* 269, 15937-15944.
- Wang, X., Zhou, J., Tong, P.S., Mao, X.Y., (2011). Zinc-binding capacity of yak casein hydrolysate and the zinc-releasing characteristics of casein hydrolysate-zinc complexes. *J. Dairy Sci.* 94, 2731-2740.
- Watkinson, S., Bebbler, D., Darrah, P., Fricker, M., Tlalka, M., Boddy, L., (2006). The role of wood decay fungi in the carbon and nitrogen dynamics of the forest floor, in: Gadd, G.M. (Ed.), *Fungi in biogeochemical cycles*. Cambridge University Press, Cambridge, 151-181.
- Webster, J.L., Dunford, E.K., Hawkes, C., Neal, B.C., (2011). Salt reduction initiatives around the world. *J. Hypertens.* 29, 1043-1050.
- Wittmann, R., (1991). Bestimmung von Dichlorpropanolen und Monochlorpropandiolen in Würzen und würzehaltigen Lebensmitteln. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 193, 224-229.
- World Health Organization, (2012). *Guideline: Sodium intake for adults and children*. World Health Organization.
- Woychik, J.H., Boundy, J.A., Dimler, R.J., (1961). Wheat Gluten Proteins, Amino Acid Composition of Proteins in Wheat Gluten. *J. Agric. Food Chem.* 9, 307-310.
- Yagasaki, M., Hashimoto, S., (2008). Synthesis and application of dipeptides; current status and perspectives. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 81, 13-22.
- Yan, Q.J., Huang, L.H., Sun, Q., Jiang, Z.Q., Wu, X., (2015). Isolation, identification and synthesis of four novel antioxidant peptides from rice residue protein hydrolyzed by multiple proteases. *Food Chem.* 179, 290-295.

Yim, S.K., Ahn, T., Kim, J.S., Yun, C.H., (2002). Polyacrylamide gel electrophoresis without a stacking gel: application for separation of peptides. *Anal. Biochem.* 305, 277-279.

Yokozeki, K., Hara, S., (2005). A novel and efficient enzymatic method for the production of peptides from unprotected starting materials. *J. Biotechnol.* 115, 211-220.

Zolotov, S., Braverman, O., Genis, M., Biale, D., (1998). Low sodium edible salt composition and process for its preparation. United States Patent, US5853792 A.

Zorn, H., Czermak, P., (2014). *Biotechnology of Food and Feed Additives*. Springer, Berlin.

7 Anhang

7.1 Affinitätschromatografische Reinigung

Jeweils eine 36 kDa-Peptidase aus Gfr, Pch und Psan wurde in einer zweistufigen Reinigung aus Affinitätschromatografie und Größenausschlusschromatografie isoliert. Die Reinigung wurde u. a. mit semi-nativer PAGE belegt. **Abbildung 7.1** zeigt Proben vor der Reinigung, nach der Affinitätschromatografie und nach der Größenausschlusschromatografie. Die Ergebnisse der Identifizierung sind **Tabelle 7.1** zu entnehmen.

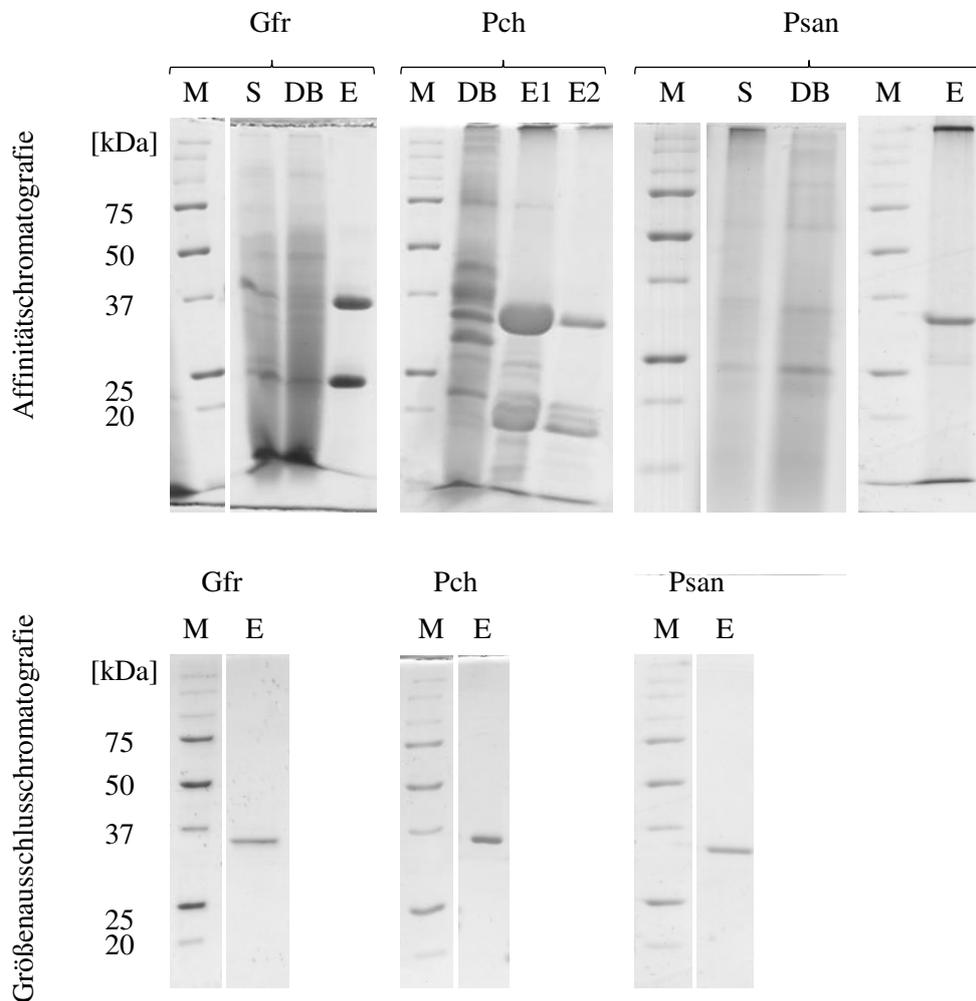


Abbildung 7.1: Die semi-native PAGE zeigt die Reinigung einer 36 kDa-Peptidase aus Gfr, Pch und Psan. M – Marker, S – Startprobe / Kulturüberstand, DB – Durchbruch der Affinitätschromatografie, E – Elutionsfraktion / Probe nach dem jeweiligen Reinigungsschritt.

Tabelle 7.1: Identifizierung der affinitätschromatografisch gereinigten Peptidasen von Gfr, Pch und Psan.

Probe		Mascot Score	Gefundene Peptide	Identifizierung				
Pilz	MW [kDa]*			Homologie zu	AC No.* ¹	GI* ²	Pilz	MW [kDa]* ³
Gfr	36	181	FTGSITYTSLTK, FYSVFDTTNKR, AT- GATLDNNTGLLR	Aspartatpeptidase A01	ABB73030	82408362	<i>P. chrysosporium</i>	41,9
Pch	36	593	FTGSITYTSLTK, LGLATTPFTTATTN, ATGATLDNNTGLLR, FYSVFDTTNKR	Aspartatpeptidase A01	ABB73030	82408362	<i>P. chrysosporium</i>	41,9
Psan	36	615	LASSGSELYLGGTDSK	Aspartatpeptidase A01	XP_008034243	636606217	<i>T. versicolor</i>	43,5

* Angabe der molekularen Masse in der semi-nativen PAGE verglichen mit einem denaturierten Marker. Die Angaben entsprechen nicht zwingend den tatsächlichen molekularen Massen der Proteine. *¹ Accession number, *² gene identifier, *³ berechnete molekulare Masse.

7.2 Freisetzung von L-Arginyl-Dipeptiden

7.2.1 Berechnung der maximalen Ausbeuten an L-Arginyl-Dipeptiden

Zur Bestimmung der maximalen Ausbeuten einzelner L-Arginyl-Dipeptide aus den Modellsubstraten Lysozym und Casein wurden die Aminosäuresequenzen von Lysozym, α -S1-, α -S2-, β - und κ -Casein analysiert. Die Sequenzen wurden jeweils ohne ihr Signalpeptid einbezogen und sind zusammen mit ihren Molekülmassen nachfolgend aufgeführt. Aus den Molekülmassen ergibt sich die Stoffmenge des Substrates pro eingesetztem Gramm (für Lysozym $69,9 \mu\text{mol g}^{-1}$). Anhand der Aminosäuresequenz wurden die N- bzw. C-terminal des Arginins vorliegenden Aminosäuren und die somit möglichen Arginyl-Dipeptide ermittelt. Die maximal erreichbaren Stoffmengen der Dipeptide pro Gramm Substrat wurde berechnet, indem die Häufigkeit jedes Dipeptids in der Aminosäuresequenz mit der Stoffmenge des Substrats pro Gramm multipliziert wurde. Beispielsweise kommt die Sequenz SR zweimal im Lysozym vor und demnach sind $139,8 \mu\text{mol g}^{-1}$ ($2 \times 69,9 \mu\text{mol g}^{-1}$) maximal freisetzbar.

Die maximale Ausbeute aller L-Arginyl-Dipeptide entspricht der Häufigkeit des Arginins in der Aminosäuresequenz des Substrats multipliziert mit dessen Stoffmenge pro Gramm (für Lysozym $11 \times 69,9 \mu\text{mol g}^{-1} = 768,9 \mu\text{mol g}^{-1}$).

Es war zu berücksichtigen, dass Casein ein Stoffgemisch darstellt. Das Verhältnis von 42,5 % α -S1-, 11,1 % α -S2-, 34,1 % β - und 12,3 % κ -Casein wurde ausgehend von der Zusammensetzung des Gesamtproteins der Milch gewählt (Belitz *et al.*, 2007).

Lysozym des Haushuhns *Gallus gallus*:

MRSLLILVLC FLPLAALGKV FGRCELAAM KRHGLDNYRG YSLGNWVCVA KFESNFNTQA
 TNRNTDGSTD FGILQINSRW WCNDGRTPGS RNLCNIPCSA LLSSDITASV NCAKKIVSDG
 NGMNAVVAWR NRCKGTDVQA WIRGCRL

Molekülmasse 14313,14 Da

Caseine des Hausrinds *Bos taurus*:> α -S1-Casein

MKLLILTCLV AVALARPKHP IKHQGLPQEV L¹NENLLRFFV APFPEVFGKE KVNELSKDIG
 SESTEDQAME DIKQMEAESI SSSEIIVPNS VEQKHIQKED VPSERYLGYL EQLLRLLKKYK
 VPQLEIVPNS AEERLHSMKE GIHAQQKEPM IGVNQELAYF YPELFRQFYQ LDAYPSGAWY
 YVPLGTQYTD APSFSDIPNP IGSENSEKTT MPLW

Molekülmasse 22974,87 Da

> α -S2-Casein

MKFFIFTCLL AVALAKNTME HVSSSEESII SQETYKQEK¹N MAINPSKENL CSTFCKEVVR
 NANEEEEYSIG SSSEESA¹EVA TEEVKITVDD KHYQKALNEI NQFYQKFPQY LQYLYQGPIV
 LNPWDQVKRN AVPITPTLNR EQLSTSEENS KKTVDMESTE VFTKKTCLTE EEKNRLNFLK
 KISQRYQKFA LPQYLKTVYQ HQKAMKPWIQ PKTKVIPYVR YL

Molekülmasse 24348,55 Da

> β -Casein

MKVLILACLV ALALARELEE LNVPGEIVES LSSSEESITR INKKIEKFQS EEQQQTEDEL
 QDKIH¹PFAQT QSLVYPPFGP IPNSLPQNI¹P PLTQTPVVVP PFLQPEVMGV SKVKEAMAPK
 HKEMPPPKYP VEPFTESQSL TLTDVENLHL PLPLLOSWMH QPHQPLPPTV MFPPQSVLSL
 SQSKVLPVPQ KAVPYPQ¹RD¹M PIQAFLLYQE PVLGPV¹RGPF PIIV

Molekülmasse 23583,99 Da

> κ -Casein

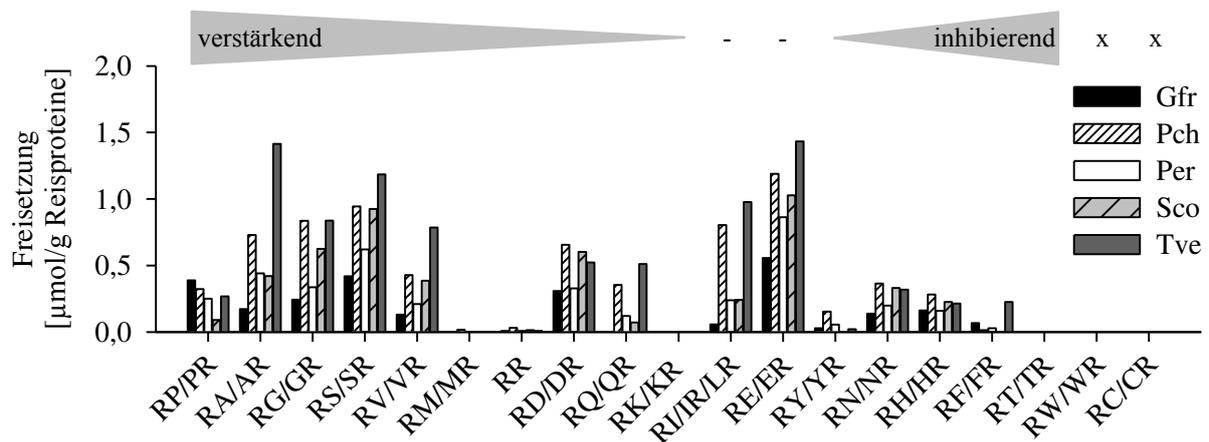
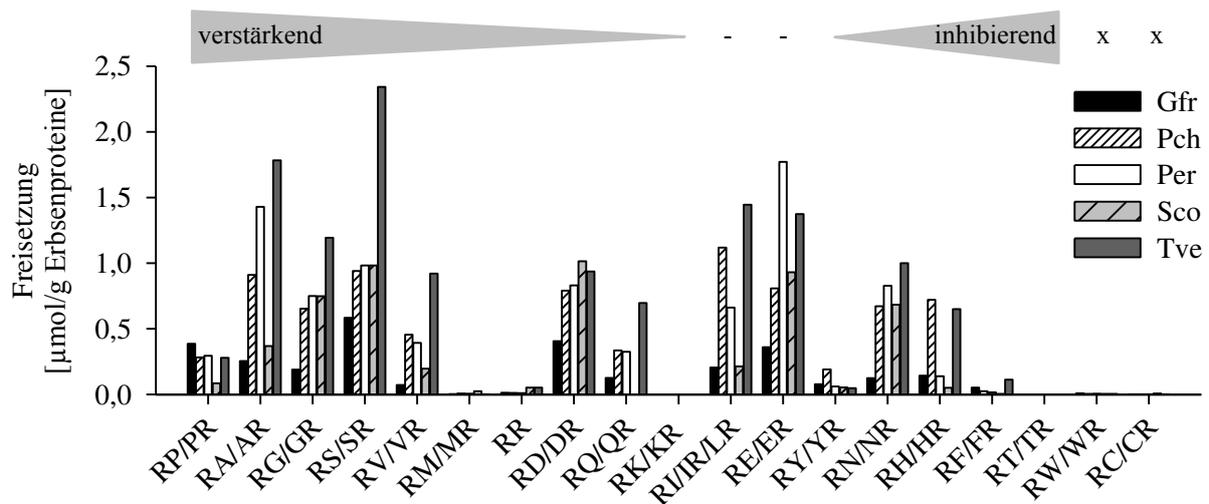
MMKSFFLVVT ILALTL¹PFLG AQEQNQEQPI RCEKDERFFS DKIAKYIPIQ YVLSRYPSYG
 LNYYQQKPVA LINNQFLPYP YYAKPAAVRS PAQILQWQVL SNTVPAKSCQ AQPTT¹MARHP
 HPHLSFMAIP PKKNQDKTEI PTINTIASGE PTSTPTTEAV ESTVATLEDS PEVIESPPEI
 NTVQVTSTAV

Molekülmasse 18974,42 Da

Unterstrichene Buchstaben – Signalsequenz
 grau hinterlegt – Aminosäure Arginin
 Molekülmassen – berechnet ohne Signalpeptid

7.2.2 Enzymatische Freisetzung von L-Arginyl-Dipeptiden

Die aus Erbsen-, Reis-, Sojaproteinen und Gelatine freigesetzten L-Arginyl-Dipeptide wurden einzeln quantifiziert (**Abbildung 7.2**). Die Freisetzung nach 24-stündiger Hydrolyse stellt die Differenz der Werte nach 0 und 24 Stunden dar.



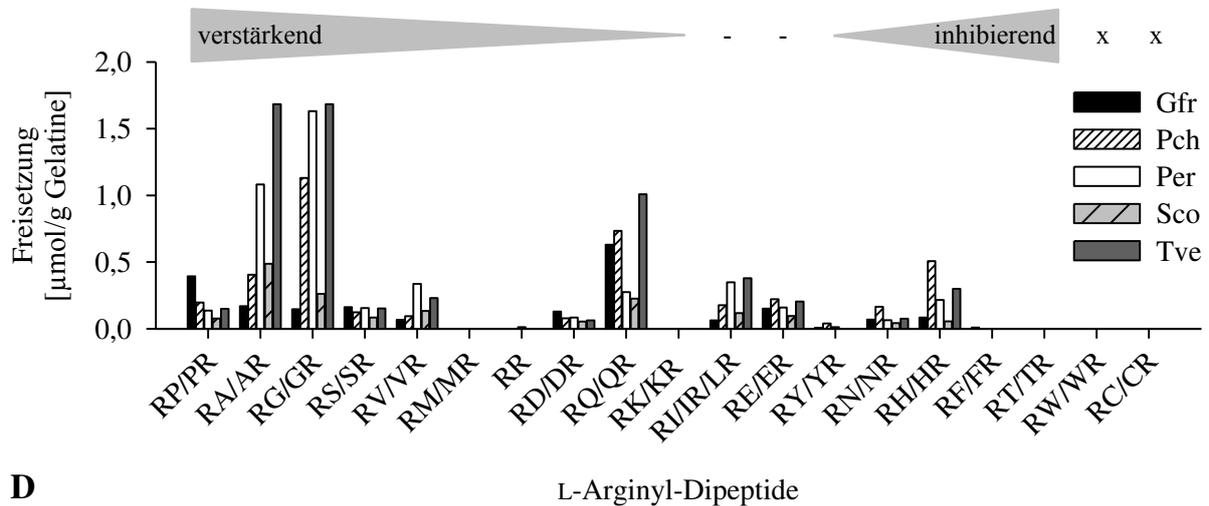
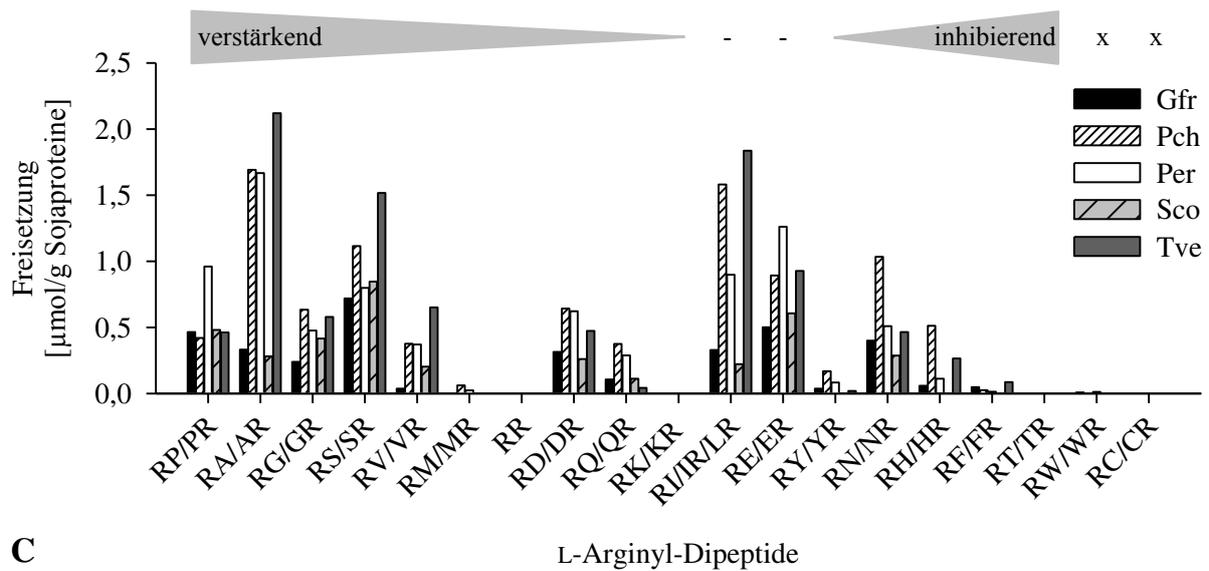


Abbildung 7.2: Freisetzung einzelner L-Arginyl-Dipeptide aus Erbsen- (A), Reis- (B), Sojaproteinen (C) oder Gelatine (D) nach 24-stündiger Hydrolyse mit Peptidasen von Gfr, Pch, Per, Sco und Tve. Effekt auf den Salzgeschmack nach Schindler *et al.* (2011): verstärkend, inhibierend, keine Veränderung (-), Effekt nicht bestimmt (x).

7.3 Identifizierung von Peptidasen

Die nach der IEX identifizierten Peptidasen wurden bereits in **Tabelle 3.10** dargestellt. **Tabelle 7.2** umfasst zusätzliche Informationen wie *gene identifiers* und die gefundenen Peptide. **Tabelle 7.3** fasst die Ergebnisse der Identifizierungen nach der IEF (für Tve) zusammen.

Tabelle 7.2: Nach der IEX identifizierte Peptidasen der genutzten Peptidasegemische von Gfr, Pch, Per, Posf, Sco und Tve.

Probe		Mascot Score	Gefundene Peptide	Identifizierung				
Pilz	MW [kDa]*			Homologie zu	AC No.* ¹	GI* ²	Pilz	MW [kDa]* ³
Gfr	30-35	427	VILDTGSSNLWVPSVK, YDSSSSSTYK, EPGLAFAFGK, KAYWEVELEK, AYWEVELEK, SWNGQYTVDCAK	Aspartatpeptidase A01	EJF61236	395328846	<i>D. squalens</i>	44
	36	181	FYAVFDTANSR	Aspartatpeptidase A01	EJF59364	395326960	<i>D. squalens</i>	40
	80	270	AVIVHGLADYILIAEGTR	Serinpeptidase S10	KII83375	749758274	<i>P. crispa</i>	57
	36	150	NAGTFSYVR, IFGAGHEVPAYK, NSRPNLET- VINAGVR	Serinpeptidase S10	EIN08494	390599097	<i>P. strigosozonata</i>	53
	30	338	VCNGFAQLGAR, GLFNPNGR, GWDPVTGVGTPNFGK	Serinpeptidase S53	CDO69591	691795651	<i>T. cinnabarina</i>	66
Pch	35	1621	YVTTSTSK, SSGFSGVDGILGIGPVDLTEGTVS- GLSTVPTVTDNLFK, FTGSITYTSLTK, YQKAT- GATLDNNTGLLR, ATGATLDNNTGLLR, FYSVFDTTNK, FYSVFDTTNKR, RLGLATTPFT- TATTN, LGLATTPFTTATTN	Aspartatpeptidase A01	ABB73030	82408362	<i>P. chrysosporium</i>	42
	35	1984	FRPDLK, SLANNLCNAYAQLGAR, GWDPVT- GLGTPNFAALK, AAKGWDPVTGLGTPNFAALK, GWDPVTGLGTPNFAALKAAAGV, GTSILFAS- GDGGVSGGQSQSCTK, ATQSSNTLGVSG- FIDQFANQADLTTFLNR	Serinpeptidase S53	ABB73029	82408360	<i>P. chrysosporium</i>	58

* Molekulare Massen in der semi-nativen PAGE, verglichen mit einem denaturierten Marker. Die Angaben entsprechen nicht zwingend den tatsächlichen molekularen Massen der Proteine. *¹ Accession number, *² gene identifier, *³ berechnete molekulare Masse.

Probe		Mascot Score	Gefundene Peptide	Identifizierung				
Pilz	MW [kDa]*			Homologie zu	AC No.* ¹	GI* ²	Pilz	MW [kDa]* ³
Per	32	517	YTQTSTSTR, SATGAVNDANTGLLR, FYSVFDT-TNR, FYSVFDTNRR, RVGFATTANTHSTVN, VGFATTANTHSTVN	Aspartatpeptidase A01	KDQ31153	646310010	<i>P. ostreatus</i>	43
	27	170	ATFVGCSATR, GGTLIHESHFTR	Peptidyl-Lys Metallopeptidase M35	P81055	3122615	<i>P. ostreatus</i>	18
	36	249	DGALENDIIVHENTHGITNR, THPYSTSATVNP-LR, DAWIQADVNR, FGGANSCTLWR, GLGVGAANHR	Fungalsin M36	KDQ24160	646303011	<i>P. ostreatus</i>	62
	36	110	ASALTGEEFLGR, IQAVPVSPESFQSR, KAL-PEAWR	Metallopeptidase	KDQ30770	646309627	<i>P. ostreatus</i>	39
	75	194	LHAQGITGAGIK, RGTCTFVQK, TLFETTAQR, GTQQFTVR, TYTLR, FTLAPGK, LAFGSPK	Serinpeptidase S08	CAG25549	46193755	<i>P. ostreatus</i>	93
	100-150	370	MFAGNLPVQR, RDASVFLNDKR, DAS-VFLNDKR	Serinpeptidase S10	KDQ26706	646305560	<i>P. ostreatus</i>	72
	32	309	GSTILFSSGDSGVGGDCR, AYPDLAQANR, AGWDPATGLGTPDFAK	Serinpeptidase S53	KDQ26836	646305690	<i>P. ostreatus</i>	63
Posf	60	120	ATFVGCSATR, GGTLIHESHFTR	Peptidyl-Lys Metallopeptidase M35	P81055	3122615	<i>P. ostreatus</i>	18
	60	1061	SVNLIAVK, APSAITVGASTITDTR, SLSLKGVLS-GIPSGTLNDLAHHA, GVLSGIPSGTLNDLAHHA	Serinpeptidase S08	ACR25273	237868680	<i>P. ostreatus</i>	39

* Molekulare Massen in der semi-nativen PAGE, verglichen mit einem denaturierten Marker. Die Angaben entsprechen nicht zwingend den tatsächlichen molekularen Massen der Proteine. *¹ Accession number, *² gene identifier, *³ berechnete molekulare Masse.

Probe		Mascot Score	Gefundene Peptide	Identifizierung				
Pilz	MW [kDa]*			Homologie zu	AC No.* ¹	GI* ²	Pilz	MW [kDa]* ³
Sco	18	282	FSAVASESDSSR	Peptidyl-Lys Me- tallopeptidase M35	XP_003037751	302696145	<i>S. commune</i>	36
	30-32	201	AQYTSSCTSTYR	Peptidyl-Lys Me- tallopeptidase M35	XP_003035465	302691572	<i>S. commune</i>	37
	30-32	106	ILAANNYQGSR, DTIDKLDFTK	Metallopeptidase MH	XP_003032752	302686144	<i>S. commune</i>	42
Tve	25-30	496	SKYTAASSSTSVKK, YTAASSSTSVKK, LASS- GSELYLGGTDSK	Aspartatpeptidase A01	EIW62808	392569635	<i>T. versicolor</i>	44
	50-75	109	STTFVQGSR, SGTDTVTVGGVAAK	Aspartatpeptidase A01	EIW63301	392570128	<i>T. versicolor</i>	41
	25-30	621	ETYVGCSTSQK, SALTTAAPNALTYATNAK, SYLTANTAATTR, AGTLIHESSTHFTK	Peptidyl-Lys Me- tallopeptidase M35	XP_008032702	636603135	<i>T. versicolor</i>	37
	30-45	170	ASYLVLPITK, YGFTEAAFNFQTNNFGK, MFLWDLTSPQR, SHPYSTSATVNPLR	Metallopeptidase M36	EIW51569	392558381	<i>T. versicolor</i>	64
	50-75	452	YWLSDR, QSAPAACITQVER, TIDEVDR, TIDE- VDRLITSPNAK, LAYDPGEHFQVPPEPD- VEAVNK, LITSPNAK, ATDLSQTWR, LITQDYASLICK, LGGYSIAYDR, ADTTLRPFK	Serinpeptidase S28	EIW65216	392572044	<i>T. versicolor</i>	58
	50-75	266	YYGLSNPFPDLSVK, FHTIQQAIDDLEYFAK, NTKEIDSIK, LVQPAYDER, EATLAADGTNFR	Serinpeptidase S28	EIW61562	392568388	<i>T. versicolor</i>	58

* Molekulare Massen in der semi-nativen PAGE, verglichen mit einem denaturierten Marker. Die Angaben entsprechen nicht zwingend den tatsächlichen molekularen Massen der Proteine. *¹ Accession number, *² gene identifier, *³ berechnete molekulare Masse.

Probe		Mascot Score	Gefundene Peptide	Identifizierung				
Pilz	MW [kDa]*			Homologie zu	AC No.* ¹	GI* ²	Pilz	MW [kDa]* ³
Tve	75	1784	TFVPPADALACMK, QNVLDVVSRL, SPAPFQDST- TNIR, VLAIEGVDPYAYAVK, IAETQSGNYLD- LGVR, VNSAFSSYR, SFILPDKK, SLGS- FQNPFGFQSTNR, SSSDNYMSPPSSR, VINGQTFVESQR, FLDVCPFSVDLPEDPPFDPSK, IALFGGKPGLATQFK, GMAGNQVLEWF- DIDSEIK, TANLKDDPLAPPDLLVSGDFR, IAYS- FLDETLPIEYR, SELPHFR, FAYTADTY- NNPQNLWTFAAK	Serinpeptidase S41	XP_008043737	636625205	<i>T. versicolor</i>	72
	25-30	110	TLAPGTYK, AIPDVAAQADLFR	Tripeptidyl-Peptidase A S53	EIW61376	392568202	<i>T. versicolor</i>	66
	25-30	865	LANQLCNAYAQLGAR, AGWDPVTGLGTPN- FAK, GTSILFASGDGGVAGSQTSSCTK, LLTAVGL	Serinpeptidase S53	EIW61051	392567876	<i>T. versicolor</i>	58
	30-40	822	NSLGVAGYLEEFANR, ADLQTFFSR, TDA- VGGTFTTVR, VGSVGGTSASSPTFAGVIAL- LNDFR	Serinpeptidase S53	EIW59803	392566627	<i>T. versicolor</i>	63

* Molekulare Massen in der semi-nativen PAGE, verglichen mit einem denaturierten Marker. Die Angaben entsprechen nicht zwingend den tatsächlichen molekularen Massen der Proteine. *¹ Accession number, *² gene identifier, *³ berechnete molekulare Masse.

Tabelle 7.3: Identifizierte Peptidasen nach der analytischen IEF der extrazellulären Proteine von Tve.

Probe		Masot-Score	Peptide	Identifizierung				
Pilz	pI*			Homologie zu	AC No. * ¹	GI* ²	Pilz	pI* ³
Tve	7,6	748	ASYLVLPITK, LVLPIK, EVLTQGF, EVLTQGFQTVVD, STAPTTANVNAAR, TAPTTANVNAAR, VNAFYIVN, VNAFYIVNSIH-DITYK, VTVSVQDSAGTDNAD, FSTPPDGQSGAMR, MFLWDLTSPQR, DGALENDIVSHENTHGLTNR, VIADSAGIR, SHPYST-SATVNPLR, TDPTGTAGNVVFLHLFI-DALSLQPCNPTFLTAR, PTFLTAR, DAWIQADANR, GLGVNAASHNDNTAVPSGC, AASHNDNTAVPSGC	Metallopeptidase M36	EIW51569	392558381	<i>T. versicolor</i>	5,2
	7,6	280	ATVPTSCNTVITPACLR, ADLQTFFSR, FRT-DAVGGTFTTVR, TDAVGGTFTTVR, IYYSTGGSPPFK, PSYQSTAVSTFLTK, AQQQGFQ, PVTGLGTPDFGK, LQALIG	Serinpeptidase S53	EIW59803	392566627	<i>T. versicolor</i>	5,0
	5,3-6,5	233	ETYVGCSTSQK, SYLTANTAATTR, AGTLIHESSEHFTK, SALTAAAPNALTYATNAK	Metallopeptidase M35	XP_008032702	392570915	<i>T. versicolor</i>	5,4
	4,2-6,5	202	NLGQTSPR, LCSGTTVASR, NSFIASSFSEGR, SYFGTTSTSTVR, SVLSAVANENSSSR	Metallopeptidase M35	EIW62196	392569022	<i>T. versicolor</i>	5,1

* Angabe eines Bereichs in dem Proteine aus der IEF ausgeschnitten wurden. *¹ Accession number, *² gene identifier, *³ aus der Aminosäuresequenz berechneter pI.

Lebenslauf

PERSÖNLICHE DATEN

Name, Vorname Harth, Lisa
Geburtsdatum, -ort 18.06.1987, Achim

SCHULBILDUNG

1993 – 1997 Grundschule Amtmann-Schröter-Schule
1997 – 1999 Orientierungsstufe Lilienthal
Sept. 1999 – Juni 2006 Gymnasium Lilienthal, Abitur

STUDIUM

Okt. 2006 – Jan. 2010 Bachelor Life Science (B. Sc.)
Bachelorarbeit am Institut für Lebensmittelchemie der Leibniz Universität Hannover (LUH)
Thema: „Präparative Schäumung zur Reinigung einer Glutaminase aus dem Basidiomyceten *Flammulina velutipes*“
Okt. 2009 – Mai 2012 Master Life Science (M. Sc.)
Masterarbeit am Institut für Lebensmittelchemie der LUH
Thema: „Screening nach Hydrolasen aus Basidiomyceten und deren Reinigung und Charakterisierung“

STUDIENBEGLEITENDE TÄTIGKEITEN

Feb. 2010 – Nov. 2010 Studentische Hilfskraft am Institut für Lebensmittelchemie der LUH

WEITERER WERDEGANG

Juni 2012 – Nov. 2012 Wissenschaftliche Hilfskraft
am Institut für Lebensmittelchemie der LUH
Dez. 2012 – Dez. 2015 Wissenschaftliche Mitarbeiterin
am Institut für Lebensmittelchemie der LUH

Liste der wissenschaftlichen Publikationen

Posterpräsentation:

Harth, L.; Krah, U.; Linke, D.; Krings, U.; Hofmann, T.; Berger, R. G.: Release of Salt Taste Enhancing Peptides from Milk and Egg White Proteins by Peptidases of Basidiomycota. 34th International Symposium on the Separation of Proteins, Peptides and Polynucleotides, Würzburg, 05.-07. November 2014