

**Heterologe Produktion bakterieller und basidiomycetischer  
Enzyme für die Anwendung in der Backindustrie**

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

zur Erlangung des Grades

Doktorin der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigte Dissertation

von

**Kathrin Schulz, M. Sc.**

2018

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

Korreferent: Prof. Dr. rer. nat. Kürsad Turgay

Tag der Promotion: 12.12.2018

## **Danksagung**

An erster Stelle möchte ich mich bei Prof. Dr. Dr. Ralf G. Berger, meinem Doktorvater und Mentor bedanken, der es mir ermöglicht hat, meine Promotion durchzuführen. Die sehr gute Ausstattung der Labore, der große Freiraum für die Bearbeitung meines Themas, die konstruktive Diskussion meiner Forschungsergebnisse sowie hilfreiche Anregungen und Lösungsvorschläge haben dazu beigetragen, meine Forschungsziele zu erreichen. Zusätzlich möchte ich mich für die Möglichkeit bedanken, meine Forschung auf internationalen Konferenzen zu präsentieren.

Dr. Diana Linke sowie PD Dr. Ulrich Krings danke ich ebenfalls für das immer offene Ohr und den sehr hilfreichen Ratschlägen.

Des Weiteren möchte ich mich gerne bei Prof. Dr. Turgay für die Übernahme des Co-Referats sowie bei Prof. Dr. Rinas für den Vorsitz meiner Disputation danken.

Großen Dank möchte ich auch meinen Arbeitskollegen aussprechen. Durch die sehr angenehme Arbeitsatmosphäre hat das Arbeiten immer Freude bereitet. Durch die geführten Diskussionen sind gute Lösungsansätze und Vorschläge für meine Arbeit entstanden.

Als letztes möchte ich meinen Eltern Elke und Klaus Schulz für die nicht-nachlassende Unterstützung danken, die anhält, seitdem ich mit meinem Studium begonnen habe. Durch die finanzielle sowie mentale Unterstützung wären meine zahlreichen Auslandsaufenthalte nicht realisierbar gewesen. Nur so konnte ich meinen Wunsch, mich in der Wissenschaft weiterzubilden, nachkommen.

## Zusammenfassung

Die Brotherstellung ist eine der ältesten bekannten Biotechnologien. Die kontinuierliche Verbesserung dieses Prozesses vollzog sich parallel der Entwicklung zu einer modernen zivilisierten Gesellschaft. Um schwankende Rohstoffeigenschaften auszugleichen, der wachsenden Nachfrage nach speziellen Broterzeugnissen nachzukommen und die Verarbeitung des Teiges zu verbessern, nutzt die Industrie immer häufiger chemische und enzymatische Backmittel, wobei letztere in der heutigen Zeit als Lebensmitteladditiv unverzichtbar sind. Hierbei ist besonders bedeutend, dass eine Vielzahl der Enzyme während den thermischen Prozessen deaktiviert werden, somit nicht in ihrer aktiven Form im finalen Produkt vorliegen und folglich nicht gekennzeichnet werden müssen. In der vorliegenden Arbeit wurden zwei potentielle Backenzyme aus mikrobiellen Kulturüberständen isoliert, auf biochemischer und molekularer Ebene charakterisiert und für anschließende Applikationsstudien heterolog produziert.

Eines der isolierten Enzyme, eine Ferulasäureesterase (FAE) aus *Streptomyces werraensis* (SwFAED) wurde heterolog mittels eines Kälte-Schock-Systems in *Escherichia coli* produziert. Eine nachfolgende Co-Expression der Chaperone groES-groEL erzielte eine Verdopplung der Enzymaktivität. SwFAED weist keinerlei Ähnlichkeit bezüglich der Aminosäuresequenz zu bisher bekannten FAEs auf. Das Substratprofil demonstrierte eine Präferenz für voluminöse, natürliche Substrate wie feruloylierte Saccharide. Bei der Behandlung von Weizenteig konnte durch den Zusatz einer geringen Aktivität von  $0,3 \text{ U kg}^{-1}$  in Kombination mit Polysaccharid-abbauenden Enzymen aus *Aspergillus* das Gebäckvolumen eines Weizenbrotes um annähernd 10 % gesteigert werden. Das Temperatur- sowie pH-Optimum ( $40 \text{ }^\circ\text{C}$ , pH 7,5) ermöglichen eine Applikation in der Backindustrie.

Darüber hinaus wurde eine prolylspezifische Endopeptidase (FvpP) aus *Flammulina velutipes* gereinigt und die katalytische Enzymaktivität mittels der heterologen Produktion in *Aspergillus oryzae* verifiziert. Durch den Zusatz von  $\text{Fe}^{2+}$  bzw.  $\text{Fe}^{3+}$  konnte die FvpP-Aktivität gesteigert werden, wobei die Zugabe von  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  und geringe Konzentrationen von Z-Pro-Prolinal die Enzymaktivität senkten. Das Enzym wurde bezüglich seiner Spaltstellenspezifität untersucht und katalysiert effizient die Hydrolyse von prolinreichen Peptiden wie Insulinkette B, Angiotensin I und  $\beta$ -Casein. Ferner wurden Hydrolyseprodukte der Zöliakie auslösenden Komponente in Weizengluten,  $\alpha$ -Gliadin, sowie die Spaltstellen von toxischen Epitopen *in silico* identifiziert. Dies eröffnet den potentiellen Einsatz in der Lebensmittelindustrie für die Produktion glutenfreier Lebensmittel.

Schlagworte: Backenzyme, heterologe Expression, industrielle Enzyme

## Abstract

Bread making is one of the oldest known biotechnologies. The ongoing improvement of the process evolved with the development of a modern civilized society. To ensure a constant quality with flours of different properties, to comply with the demand for specific products and to improve the dough processing, chemical and enzymatic backing aids are used by the industry. Nowadays, enzymes are indispensable additives in food industry and are especially important since the majority of the enzymes will be inactivated during thermal processes and therefore do not have to be listed as additive in the final product. Two potential baking enzymes were isolated from microbial culture supernatants, characterized on the biochemical and molecular biological level and heterologously produced for further application studies.

One of the isolated enzymes, a ferulic acid esterase (FAE) from *Streptomyces werraensis* (SwFAED) was produced heterologously using a cold shock system in *Escherichia coli*. Enzyme activity was doubled by co-expressing the chaperones groES-groEL. SwFAED did not show any similarity to other FAEs regarding the primary amino acid sequence. The substrate profile demonstrated a preference for natural bulky substrates, such as ferulated saccharides. The treatment of wheat dough with a low SwFAED activity of 0.3 U kg<sup>-1</sup> resulted in a volume increase of backed pastries of almost 10 % in combination with polysaccharide degrading enzymes from *Aspergillus*. The temperature and pH optimum (40 °C, pH 7.5) enable a potential application in the baking industry.

Furthermore, a prolyl specific endopeptidase from *Flammulina velutipes* (FvpP) was purified and the catalytic activity was verified by the heterologous production in *Aspergillus oryzae*. By the addition of Fe<sup>2+</sup> and Fe<sup>3+</sup> FvpP activity increased, whereas the addition of Cu<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup> and low concentrations of Z-Pro-prolinal decreased enzyme activity. Moreover, the enzyme was analyzed regarding its cleavage specificity and catalyzed successfully the hydrolysis of proline-rich peptides, such as insulin chain B, angiotensin I and  $\beta$ -casein. Additionally, the hydrolytic products of a causative component in wheat gluten,  $\alpha$ -gliadin, as well as the cleavage of celiac disease provoking epitopes were identified *in silico*. The results have the potential to use the enzyme for the production of gluten free food.

Key words: Baking enzymes; heterologous expression, industrial enzymes

## Vorbemerkung

Diese Arbeit basiert auf zwei in *peer reviewed* Zeitschriften veröffentlichten Artikeln, sowie einem weiteren Forschungsthema, welches als Nebenprojekt bearbeitet wurde.

- K. Schulz, A. Nieter, A.-K. Scheu, J.L. Copa-Patiño, L. Popper, R.G. Berger (2018). A type D ferulic acid esterase from *Streptomyces werraensis* affects the volume of wheat dough pastries. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 102 (3), 1269-1279.
- K. Schulz, L. Giesler, D. Linke, R.G. Berger (2018). A prolyl endopeptidase from *Flammulina velutipes* for the possible degradation of celiac disease provoking toxic peptides in cereal proteins. *Process Biochemistry*, doi.org/10.1016/j.procbio.2018.07.019.

Nachfolgend gelistete Vorträge und Poster sind im Rahmen dieser Doktorarbeit entstanden, jedoch nicht Teil dieser Dissertationsschrift.

### Vorträge:

K. Schulz, M. Siebert, A. Nieter, T. Detering, R.G. Berger (2018). Sustainable food processing using ferulic acid esterases, BioMicroWorld2018, 24-25.05.2018, Torremolinos, Spanien.

K. Schulz, L. Giesler, D. Linke, R.G. Berger (2018). A prolyl endopeptidase from *Flammulina velutipes* degrades celiac disease provoking cereal proteins, 9<sup>th</sup> International Congress on Biocatalysis (Biocat2018), 26-30.08.18, Hamburg, Deutschland.

### Poster:

K. Schulz, A. Nieter, R.G. Berger (2016). A recombinant ferulic acid esterase from *Streptomyces werraensis* increasing the volume of wheat dough pastries, Himmelfahrtstagung: New Frontiers for Biotech-Processes, 02.-04.05.2016, Koblenz, Deutschland.

K. Schulz, L. Giesler, D. Linke, R.G. Berger (2018). Heterologe Expression einer Prolyl-Endopeptidase aus *Flammulina velutipes* zum Glutenabbau in Lebensmitteln für Zöliakie-Patienten, LChG Regionalverbandstagung Nord 2018, 07.-08.03.18, Hannover, Deutschland.

K. Schulz, L. Giesler, D. Linke, R.G. Berger (2018). Heterologe Expression einer Prolyl-Endopeptidase aus *Flammulina velutipes* zum Glutenabbau in Lebensmitteln für Zöliakie-Patienten, LChG 47. Deutscher Lebensmittelchemikertag, 17.-19.09.18, Berlin, Deutschland.

## Inhaltsverzeichnis

Danksagung.....	I
Zusammenfassung.....	II
Abstract.....	III
Vorbemerkung.....	IV
Inhaltsverzeichnis.....	VI
Abkürzungsverzeichnis.....	IX
<b>1. Einordnung der Forschungsthemen und wichtigsten Erkenntnisse aus den Publikationen im Kontext der wissenschaftlichen Literatur.....</b>	<b>1</b>
1.1. Brot - Vom Handwerk zum Industrieprodukt.....	1
1.2. Gluten, der Klebstoff des Teigs.....	1
1.3. Arabinoxylan.....	3
1.4. Qualitätssicherung der Backprodukte und Prozessoptimierung.....	5
1.4.1. Zöliakie als Beispiel einer Nahrungs-Hypersensitivität.....	7
1.4.2. Chemische Additive in der Backindustrie.....	8
1.4.3. Enzymatische Additive in der Backindustrie.....	10
1.4.3.1. Xylanasen.....	11
1.4.3.2. Peptidasen.....	12
1.4.3.3. Sonstige Enzyme.....	12
1.5. Prolyl-spezifische Endopeptidasen.....	13
1.5.1. Struktur und Wirkungsmechanismus.....	14
1.5.2. Industrielle Applikation von PEPs.....	16
1.6. Ferulasäureesterasen.....	17
1.6.1. Struktur und Wirkungsmechanismus.....	18
1.6.2. Industrielle Applikation von FAEs.....	21
1.7. Ziele der Arbeit.....	24
<b>2. Vorwort zur Publikation „A type D ferulic acid esterase from <i>Streptomyces werraensis</i> affects the volume of wheat dough pastries.....</b>	<b>25</b>
<b>3. A type D ferulic acid esterase from <i>Streptomyces werraensis</i> affects the volume of wheat dough pastries.....</b>	<b>26</b>
3.1. Abstract.....	26
3.2. Keywords.....	26
3.3. Introduction.....	27
3.4. Material and Methods.....	28
3.4.1. Chemicals, reagents and substrates.....	28
3.4.2. Purification of the native SwFAED.....	28



3.4.3.	Measurement of FAE activity .....	28
3.4.4.	Denaturing SDS-PAGE.....	29
3.4.5.	Peptide mass fingerprinting.....	29
3.4.6.	DNA isolation and amplification of the <i>swfaed</i> gene.....	29
3.4.7.	Heterologous expression of the <i>swfaed</i> gene in <i>E. coli</i> and purification of the recombinant protein .....	30
3.4.8.	Nucleotide sequence accession number .....	31
3.4.9.	Biochemical characterization of recombinant SwFAED (reSwFAED).....	31
3.4.9.1.	Determination of temperature and pH optimum and stability.....	31
3.4.9.2.	Substrate specificity and kinetic parameters .....	31
3.4.9.3.	Release of diferulic acid from wheat bran .....	32
3.4.10.	Influence of reSwFAED on dough volume.....	32
3.5.	Results .....	33
3.5.1.	Purification of the native SwFAED and amplification of the <i>swfaed</i> gene .....	33
3.5.2.	Heterologous expression and purification of the SwFAED in <i>E. coli</i> .....	35
3.5.3.	Biochemical characterization, substrate specificity and kinetic properties of reSwFAED.....	35
3.5.4.	Baking trials with reSwFAED.....	38
3.6.	Discussion .....	39
3.7.	Acknowledgments .....	42
<b>4.</b>	<b>Vorwort zur Publikation “A prolyl endopeptidase from <i>Flammulina velutipes</i> for the possible degradation of celiac disease provoking toxic peptides in cereal proteins” .....</b>	<b>43</b>
<b>5.</b>	<b>A prolyl endopeptidase from <i>Flammulina velutipes</i> for the possible degradation of celiac disease provoking cereal proteins.....</b>	<b>44</b>
5.1.	Abstract .....	44
5.2.	Key words .....	44
5.3.	Introduction .....	45
5.4.	Materials and methods .....	46
5.4.1.	Chemicals and reagents .....	46
5.4.2.	Cultivation of fungal strains and <i>Escherichia coli</i> .....	46
5.4.3.	Peptidase activity.....	47
5.4.4.	Purification of the wild-type FvpP .....	47
5.4.5.	Denaturing SDS-PAGE.....	47
5.4.6.	Peptide mass fingerprinting.....	48
5.4.7.	cDNA synthesis and amplification of <i>fvpp</i> gene .....	48
5.4.8.	Transformation of <i>A. oryzae</i> and production of recombinant FvpP (reFvpP) for gene verification .....	49

5.4.9.	Activity gel staining .....	50
5.4.10.	Biochemical characterization .....	50
5.4.11.	Hydrolysis of chromogenic substrates .....	51
5.4.12.	Hydrolysis of natural substrates and analysis of the products .....	51
5.4.13.	Statistical analysis .....	52
5.5.	Results and discussion.....	52
5.5.1.	Purification of the wild-type extracellular prolyl endopeptidase FvpP.....	52
5.5.2.	Identification of the <i>fvpP</i> gene sequence and verification of FvpP activity .....	53
5.5.3.	Comparison of FvpP and An-Pep.....	56
5.5.4.	Effect of various metal ions, inhibitors and solvents .....	58
5.5.5.	Substrate specificity of FvpP and An-Pep.....	60
5.6.	Acknowledgement.....	64
5.7.	Supplementary material.....	65
<b>6.</b>	<b>Ausblick.....</b>	<b>66</b>
<b>7.</b>	<b>Vorwort zum Abschnitt “A unique asparaginase from <i>Flammulina velutipes</i> catalyses transpeptidation” .....</b>	<b>68</b>
<b>8.</b>	<b>A unique asparaginase from <i>Flammulina velutipes</i> catalyses transpeptidation</b>	<b>69</b>
8.1.	Abstract .....	69
8.2.	Key words .....	69
8.3.	Introduction .....	70
8.4.	Material and methods .....	71
8.4.1.	Chemicals, reagents and substrates .....	71
8.4.2.	Measurement of enzyme activity .....	71
8.4.3.	Denaturing SDS-PAGE.....	71
8.4.4.	Cloning of the <i>fvnase</i> gene .....	71
8.4.5.	Heterologous expression of the <i>fvnase</i> gene in <i>E. coli</i> and purification of the recombinant protein .....	72
8.4.6.	Formation of dipeptides by FvNase .....	72
8.4.7.	Detection of Glu-peptide formation .....	72
8.5.	Results and discussion.....	73
8.5.1.	Heterologous expression of the recombinant FvNase (reFvNase) in <i>E. coli</i> and verification of transpeptidase activity.....	73
8.5.2.	Optimization of FvNase expression and purification of the recombinant protein ...	75
8.6.	Conclusion.....	77
<b>9.</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>78</b>
<b>10.</b>	<b>Lebenslauf.....</b>	<b>93</b>

## Abkürzungsverzeichnis

Ang I	Angiotensin I
An-Pep	Prolyl-Endopeptidase aus <i>Aspergillus niger</i>
ATP	Adenosintriphosphat
AX	Arabinoxylan
CA-ME	Kaffeesäuremethylester
CZD	Czapek Doc Medium
DEAE	Diethylaminoethyl
Di-FA	Diferulat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
EC	<i>Enzyme commission</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMP	<i>Exponential megapriming polymerase chain reaction</i> (Exponential-Megaprimer Polymerasekettenreaktion)
ESI	<i>Electrospray ionization</i> (Elektrospray-Ionisation)
ESI-MS/MS	<i>Electrospray ionization-tandem mass spectrometry</i> (Elektrospray-Ionisation-Tandem-Massenspektrometrie)
F-A	5-O- <i>trans</i> -Feruloyl-L-Arabinofuranose
FA	Ferulasäure
FAE	Ferulasäureesterase
FA-ME	Ferulasäuremethylester
F-AX	$\beta$ -D-Xylopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)-5-O- <i>trans</i> -Feruloyl-L-Arabinofuranose
F-AXG	$\alpha$ -L-Galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-Xylopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)-5-O- <i>trans</i> -Feruloyl-L-Arabinofuranose
FvNase	Asparaginase aus <i>Flammulina velutipes</i>
FvpP	Prolylspezifische Endopeptidase aus <i>Flammulina velutipes</i>
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i> (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IMAC	<i>Immobilized metal ion affinity chromatography</i> (Immobilisierte Metallchelate-Affinitätschromatographie)
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
K <sub>cat</sub>	<i>Turnover number</i> (Wechselzahl)

K <sub>m</sub>	Michaeliskonstante
LB	Luria-Bertani Medium
LMW	<i>Low molecular weight</i> (Niedrig-molekulare Masse)
MS	Massenspektrometrie
MWCO	<i>Molecular weight cut off</i> (Molekülmassengrenze)
NCBI	<i>National center for biotechnology information</i> (Nationales Zentrum für Biotechnologische Informationen)
ND	<i>Not detectable</i> (nicht detektierbar)
Ni-NTA	<i>Nickel-nitrilotriacetic acid</i> (Nickel-Nitrilotriessigsäure)
OD <sub>600</sub>	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
pCA-ME	<i>Para-Cumarsäuremethylester</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)
PEP	Prolyl-spezifische Endopeptidase
POP	Prolyl-spezifische Oligopeptidase
QTOF	<i>Quadrupole time of flight</i> (Quadropol-Flugzeitmassenspektrometer)
RACE	<i>Rapid amplification of cDNA-ends</i> (schnelle Vervielfältigung von cDNA-Enden)
RPM	<i>Revolutions per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
SA-ME	Sinapinsäuremethylester
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i> (Natriumdodecylsulfat)
<i>Sp.</i>	Spezies
SwFAED	Ferulasäureesterase Typ D aus <i>Streptomyces werraensis</i>
U	Unit (μmol min <sup>-1</sup> )
v/v	<i>Volume by volume</i> (Volumen pro Volumen)
w/v	<i>Weight by volume</i> (Masse pro Volumen)
WE-AX	Wasserlösliches Arabinoxylan
WU-AX	Wasserunlösliches Arabinoxylan

Aminosäuren werden nach dem internationalen Ein- bzw. Dreibuchstabencode abgekürzt.

## **1. Einordnung der Forschungsthemen und wichtigsten Erkenntnisse aus den Publikationen im Kontext der wissenschaftlichen Literatur**

### **1.1. Brot - Vom Handwerk zum Industrieprodukt**

Brot und Backprodukte gelten als eines der wichtigsten Grundnahrungsmittel der Welt. Schon etwa 12000 v. Chr. aßen Menschen Brot, wobei mit der Erfindung des Backofens die Ägypter maßgeblich an der Verbreitung des Brotes als Nahrungsmittel über die ganze Welt beteiligt waren [1]. Nach Milchprodukten und Fleischerzeugnissen zählen die Brot- und Backprodukte mit einem Marktanteil von 11 % im Jahre 2016 zu den am häufigsten konsumierten Lebensmitteln [2]. Alleine in Deutschland wurden 2017 pro Kopf 73,8 kg Brot und Dauerbackwaren verzehrt [3]. Traditionell besteht ein Brotteig aus Wasser, Weizenmehl, Hefe, Salz, Zucker und nach Ermessen Backfett. Wasser und Mehl stellen dabei die Bestandteile des Teiges dar, die den wichtigsten Einfluss auf die Textur der Brotkrume nehmen [1]. Industriell gefertigte Backwaren befolgen im Wesentlichen eine gleiche Rezeptur, jedoch erfolgt eine variable Zugabe von Additiven, um gut bearbeitbare und gärende Teige für die Fließbandproduktion zu erhalten und die Ansprüche der Konsumenten an die finalen Backprodukte zu erfüllen. Nachdem alle Zutaten des Teiges zu einer homogenen Masse vermengt wurden, schließt sich die Gare an, bei der der Teig unter warmen Bedingungen (~30 °C) ruht, was die Fermentation durch die zugesetzte Hefe fördert. Weizen stellt einen wichtigen Rohstoff in Backprodukten dar, wobei Stärke mit 77-87 % zweifellos das meist vorkommende Kohlenhydrat in Weizenmehl (gemessen an der Trockenmasse) ist. Die Minderheit wird von Nicht-Stärke-Polysacchariden gebildet, unter denen Arabinoxylan den größten Anteil darstellt [4]. Ein weiterer Bestandteil in Weizenmehl ist das Gluten, ein Gemisch aus Gliadinen und Gluteninen mit Lipid- und Kohlenhydratanteilen, welches für die Strukturgebung des Brotes unverzichtbar ist.

### **1.2. Gluten, der Klebstoff des Teigs**

Das Weizengetreidekorn besteht zu 8-15 % aus Proteinen, wobei 85-90 % des Proteinanteils Gluten, oder auch Klebereiweiß genannt, ausmacht. Irrtümlicherweise wird Gluten als ein Sammelbegriff für Proteine verwendet, wobei exakt betrachtet ebenso Kohlenhydrate und Lipide enthalten sind [5, 6]. Die gummiähnliche Masse bleibt nach dem Auswaschen von Stärkegranulat und wasserlöslichen Bestandteilen zurück, wobei 75-80 % Proteine und 5-10 % Lipide die Trockenmasse ausmachen. Hinsichtlich der Backvorgänge wird unter dem Begriff Gluten jedoch meist nur der Proteinanteil gemeint, da dieser maßgeblich an der Teigqualität von Backwaren beteiligt ist. Neben der Wasserabsorptionskapazität hat Gluten ebenfalls

Einfluss auf die Viskosität und Elastizität des verarbeiteten Teiges [6]. Gluten-Proteine werden aufgrund ihrer Löslichkeit in wässrigen Alkoholen (~70 % v/v) in zwei Hauptbestandteile unterteilt, den löslichen Gliadinen und den unlöslichen Gluteninen [7, 8]. Beide Fraktionen kommen zu gleichen Teilen in Gluten vor und bestehen aus einem hohen Anteil an den Aminosäuren Prolin und Glutamin. Gliadine sind meist monomere Proteine und weisen eine Molmasse zwischen 28 bis 55 kDa auf. Historisch bedingt werden diese auf Grund ihrer Mobilität bei einer Gel-Elektrophorese bei niedrigerem pH-Wert in  $\alpha/\beta$ -,  $\gamma$ - und  $\omega$ -Typ differenziert. Werden bei der Differenzierung die Aminosäure-Sequenzen, Zusammensetzung sowie die molekularen Massen miteinbezogen, wird der  $\omega$ -Typ nochmals in  $\omega 5$ - und  $\omega 1,2$ -Gliadine unterteilt [6]. Die einzelnen Typen unterscheiden sich zum Teil stark in ihrer partiellen Aminosäure-Zusammensetzung (bezüglich Glutamin, Prolin, Phenylalanin, Tyrosin und Glycin), Aminosäure-Mengenverhältnis untereinander und ihrer molekularen Masse (Tab.1.1).

**Tabelle 1.1: Charakterisierung der verschiedenen Gluten-Protein-Typen.**

Typ	MW [kDa]	Anteil [%]	Partielle Aminosäure Zusammensetzung [%]				
			Gln	Pro	Phe	Tyr	Gly
$\omega 5$ -Gliadin	49-55	3-6	56	20	9	1	1
$\omega 1,2$ -Gliadin	39-44	4-7	44	26	8	1	1
$\alpha/\beta$ -Gliadin	28-35	28-33	37	16	4	3	2
$\gamma$ -Gliadin	31-35	23-31	35	17	5	1	3
<i>x</i> -HMW-GS	83-88	4-9	37	13	0	6	19
<i>y</i> -HMW-GS	67-74	3-4	36	11	0	5	18
LMW-GS	32-39	19-25	38	13	4	1	3

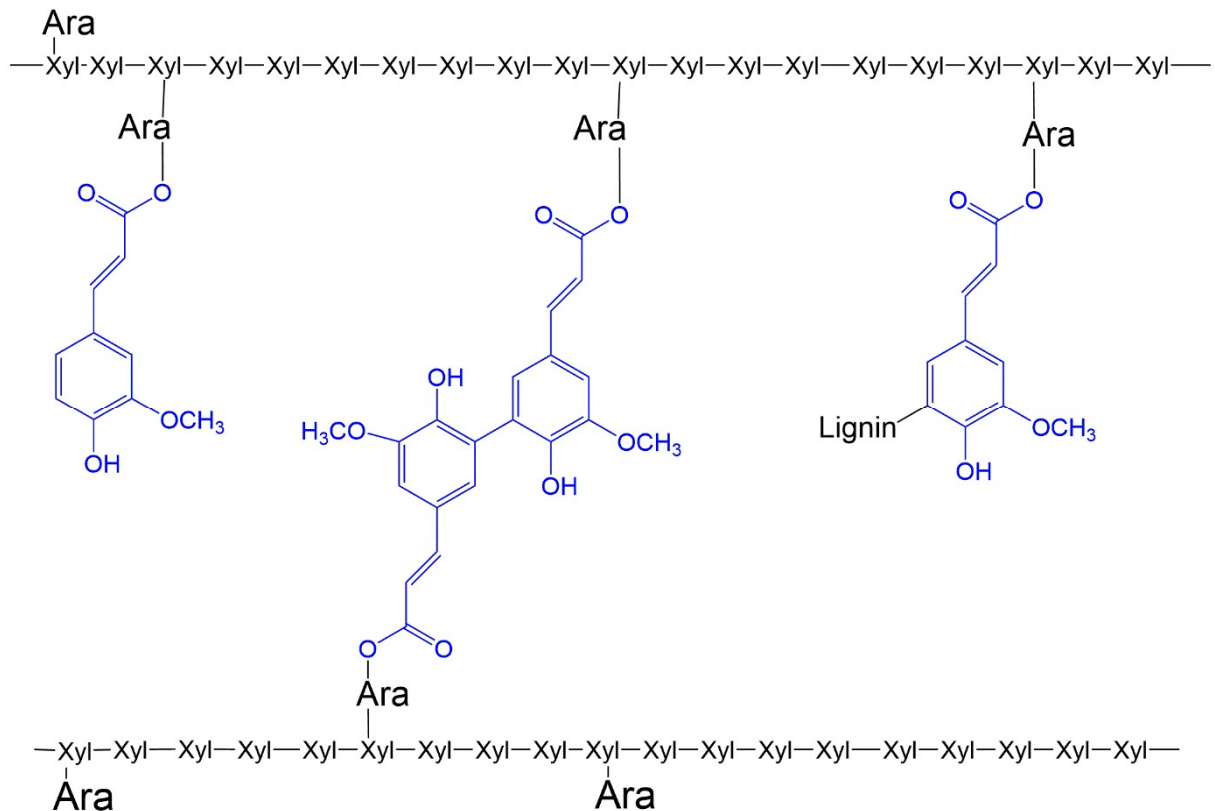
Im Gegensatz zu Gliadinen stellen Glutenine aggregierte Proteinkomplexe mit hohen Molmassen (0,5 bis 10 MDa) dar. Nach Auflösung der Aggregation sind Glutenine im gleichen Maße löslich wie die Gliadine. Die Differenzierung dieser Proteingruppe erfolgt ebenfalls hinsichtlich ihrer molekularen Masse. Die am meisten vorkommende Gruppe ist die Niedrigmolekulare-Masse-Glutenin-Untereinheit (*low molecular weight glutenin subunits*, LMW-GS). Diese Gruppe teilt die gleichen Charakteristika wie die  $\alpha/\beta$ - und  $\gamma$ -Gliadine bezüglich der Molmasse und der Aminosäurezusammensetzung. Die andere Gruppe stellt die Hochmolekulare-Masse-Glutenin-Untereinheit (*high molecular weight glutenin subunits*, HMW-GS) dar und repräsentiert eine Minderheit der gesamten Gluten-Proteine. Diese Untereinheit wird wiederum in zwei Untereinheiten geteilt (*x*- und *y*-Typ), welche sich in ihren molekularen Massen differenzieren (*x*-Type: 83-88 kDa, *y*-Typ: 67-74 kDa; Tab.1.1) [6]. Das Rückgrat der

Glutene werden von den HMW Untereinheiten gebildet, an die die LMW Untereinheiten gebunden sind und so Verzweigungen darstellen. Generell besteht jede Gluten-Untereinheit aus zwei oder drei verschiedenen strukturellen Domänen, wobei jede eine spezifische repetitive glutamin- und prolinreiche Sequenz aufweist.

Obwohl Cystein mit ca. 2 % nur einen geringen Anteil an der Aminosäurezusammensetzung in Gluten aufweist, beeinflusst diese Aminosäure aufgrund ihrer funktionellen Thiolgruppe die Struktur und Funktionalität von Gluten [9]. Die meisten Thiolreste liegen in oxidiertem Form vor und gehen Intra- oder Interketten-Disulfidbrückenbindungen innerhalb des Proteins oder mit anderen Proteinen ein. Diese Bindungen sind das Hauptziel von Redoxreaktionen während der Samenreife, des Mahlens, der Teigzubereitung und des Backprozesses [10]. Allgemein wird die Struktur von Gluten aus Gliadinen und Glutelinen durch nichtkovalente Bindungen wie hydrophobe Wechselwirkungen, ionische Bindungen und Wasserstoffbrückenbindungen stabilisiert. Diese werden während der Teigvermischung und des Teignetzens gebildet, und das Gluten entfaltet seine sogenannte Klebereigenschaft. Parallel dazu wird während der Hefefermentation Kohlendioxid freigesetzt und es kommt zur Ausbildung von Gaszellen. Diese Blasen werden von dem Gluten-Netzwerk eingeschlossen, sodass eine Erweichung und Ausdehnung des Teiges stattfindet [11]. Die Teigeigenschaften werden zwar hauptsächlich von dem Gluten-Netzwerk bestimmt, jedoch haben andere Proteine und Polysaccharide ebenfalls einen Einfluss auf die Eigenschaften.

### 1.3. Arabinoxylan

Eine weitere wichtige Mehlkomponente stellen die Nicht-Stärke-Polysaccharid-Fasern dar, die in den Pflanzenzellwänden vorkommen. Neben Glucanen bestehen die Zellwände aus Arabinoxylan (AX), welches der Hauptbestandteil der Hemicellulose ist. Die Struktur hängt dabei stark von dem Getreidetyp ab und macht bei Weizenmehl ca. 1-3 % der Trockenmasse aus [12]. Das Grundgerüst des Arabinoxylans besteht aus einem Xylan-Rückgrat, welches aus  $\beta$ -1,4-gebundenen D-Xylose-Molekülen gebildet wird. Dieses Rückgrat ist wiederum mit  $\alpha$ -L-Arabinofuranose-Molekülen mittels  $\beta$ -1,2- oder  $\beta$ -1,3-Bindung substituiert [13]. Xylan-Rückgrate können zusätzlich noch andere Verzweigungen aufweisen. Ferulasäure (FA) oder andere Phenolsäuren sind hauptsächlich über die funktionelle Carboxylgruppe mit dem fünften Kohlenstoffatom über den Sauerstoff C(O)5 der  $\alpha$ -L-Arabinofuranose durch eine Esterbindung verbunden (Abb. 1.1) [14].



**Abbildung 1.1: Vereinfachte Struktur von Arabinoxylan.** Das Xylan-Rückgrat, welches aus  $\beta$ -1,4-gebundenen D-Xylose-Molekülen ausgebildet wird, ist durch schwarze Linien gekennzeichnet. Das Rückgrat kann mit Arabinoseresten substituiert sein. Veresterte Ferulasäuren bzw. Diferulate, die zu einer Vernetzung des Xylan-Rückgrats führen, sind blau gekennzeichnet.

Ferner kann es zu einer Ausbildung von Diferulaten durch die Kopplung zweier FA-Molekülen am aromatischen Ring oder der aliphatischen Seitenkette kommen, was zu einer Polysaccharid-Polysaccharid-Vernetzung führt [15].

Aufgrund der Löslichkeit kann AX in Wasser-extrahierbares Arabinoxylan (WE-AX) und Wasser-unextrahierbares Arabinoxylan (WU-AX) unterschieden werden. Im Gegensatz zu WU-AX ist WE-AX lose an die Zellwand-Oberfläche gebunden und trägt keine FA-Reste. WU-AX ist durch kovalente und nichtkovalente Interaktionen mit anderen AX-Molekülen oder anderen Zellwand-Bestandteilen wie Proteinen, Lignin oder Cellulose verbunden [16]. WE-AX und WU-AX unterscheiden sich hinsichtlich ihres Verhältnisses von Arabinose zu Xylose, mit einem charakteristischen Durchschnittswert von 0,5 bis 0,6 für WE-AX und einem höheren Arabinose-Xylose-Verhältnis für solubilisiertes WU-AX, was auf den höheren Substitutionsgrad innerhalb des Moleküls zurückzuführen ist. AX weist eine hohe Wasserhaltekapazität auf und kann ein Vielfaches an Wasser absorbieren, wobei WU-AX mengenmäßig mehr Wasser absorbieren kann (bis zu 9,9-fach des Eigengewichts) als WE-AX [16, 17]. Es wird geschätzt, dass AX bis zu einem Viertel des Wassers aus dem Teig-System



zurückhalten kann [18]. Backstudien belegten, dass WE-AX für ein gängiges wünschenswertes Brotvolumen erforderlich ist, wobei genau ein gegensätzlicher Effekt bei WU-AX beobachtet wurde [19]. Zusätzlich zeigte WU-AX einen negativen Einfluss auf die Textur und die Brotkrume des Brotes. Durch die hohe Arabinoxylan-Wasserhaltekapazität hat AX ebenfalls einen großen Einfluss auf das ausgebaute Gluten-Netzwerk sowie die übrigen Bestandteile des Teigs. AX interagiert direkt mit Gluten-Molekülen, was zu einer Ausbildung eines komplexen Netzwerk führt [20, 21]. Insbesondere WU-AX hat einen negativen Einfluss auf die Gluten-Ausbildung und folglich auch auf die rheologischen Eigenschaften des Teigs [22]. Die unlöslichen Partikel lagern sich während des Fermentationsvorgangs ab und umgeben die Gaszellen. Wird WU-AX enzymatisch in lösliches AX umgesetzt, wirkt sich dies jedoch positiv auf die Gluten-Entwicklung aus [21]. Folglich wird das Polysaccharid-Gluten-Netzwerk aufgelockert und Wasser freigesetzt, welches dem Gluten für nachfolgende Hydratation zur Verfügung steht und letztendlich zu einer Teiglockerung führt [23]. Dem negativen Effekt von WU-AX bezüglich der Backqualität kann jedoch mittels Zugabe von Ferulasäure entgegengewirkt werden. Dabei greift FA in die inter-Disulfid-Reaktion von Gluten ein und verhindert den Ausbau von AX-Vernetzungen [24].

#### **1.4. Qualitätssicherung der Backprodukte und Prozessoptimierung**

Das Ziel jedes Backprozesses ist die Herstellung eines finalen Produkts mit optimaler Qualität. Die Qualitätsmerkmale sind jedoch, objektiv betrachtet, Eigenschaften, die nicht allgemeingültig definiert werden können. Konsumenten, welche das Produkt letztendlich verzehren, legen andere Anforderungen an das Gebäck bzw. an den Teig als der Produzent in der Backindustrie, welcher zusätzlich die Prozesstauglichkeit eines Teiges als Qualitätsmerkmal in Betracht zieht [25]. Die Teig- bzw. Gebäckqualität wird durch die komplexe Interaktion der Rohmaterialien, der einzelnen Qualitäten der Zutaten, Mengenverhältnisse zueinander und Teigverarbeitungsmethoden bestimmt [26]. Die Qualität von Weizenmehl zum Beispiel wird wiederum durch die Menge und Qualität der in dem Mehl enthaltenen Proteine, wie z. B. Gluten, beeinflusst.

Im industriellen Backprozess müssen bei der Teig- bzw. der Backqualität drei Aspekte beleuchtet werden. Zum einen ist das Teigverhalten während des Mischvorgangs, also die maschinelle Bearbeitbarkeit und die daraus resultierende Teigstruktur bzw. Teigeigenschaft ein wichtiger Parameter. Zum anderen ist das Teigverhalten während des Gärprozesses und Backvorgangs wichtig, nachdem der Mischvorgang bereits abgeschlossen ist. Der dritte Aspekt bezieht sich nicht mehr auf die Teigeigenschaften, sondern zielt auf die nachhaltige Frische und

Haltbarkeit der Backware ab [25]. Unter diesen Gesichtspunkten können die Beurteilungen weiter aufgeschlüsselt werden. Die Anforderungen an die Teigeigenschaften im Produktionsablauf zielen auf eine kurze Teigentwicklung ab, wobei in diesem Zeitraum die optimalen Eigenschaften für die Aufarbeitung und Gärung erzielt werden sollen. Dies beinhaltet eine gute Formbarkeit sowie eine ausreichende Elastizität des Teiges. Werden alle Backzutaten vermengt, entwickelt die zuerst inkohärente Masse viskose Eigenschaften. Anhaltende Durchmischung führt zu einem Verlust der Festigkeit, wobei gleichzeitig die Klebrigkeit im Umgang mit dem Teig zunimmt [25]. Zu diesem Zeitpunkt gilt es, das richtige Verhältnis zwischen Elastizität und Klebrigkeit zu ermitteln. Des Weiteren sollten die Teige eine hohe Gärtoleranz sowie hohe Gärstabilität, eine hohe Wasser-Absorptions-Kapazität als auch eine hohe Stabilität gegenüber mechanischer Belastung und eine durchschnittliche  $\alpha$ -Amylase-Aktivität aufweisen [27]. Diese Parameter machen es erforderlich, die Wahl der Backzutaten je nach gewünschten Prozessanforderungen und des Backproduktes zu optimieren und zu verändern.

Das Getreide und somit folglich auch das industriell genutzte Mehl unterliegen natürlichen Qualitätsschwankungen, die auf klimatische Einflüsse, Kultivierungsbedingungen und Lagerung zurückzuführen sind. Für die Backindustrie ist jedoch eine gleichbleibende Prozessführung wichtig, sodass die Unterschiede in der Mehl- bzw. Teigqualität durch die Zugabe von Backmitteln als chemische und enzymatische Additive ausgeglichen werden müssen [27]. Bestimmte Additive tragen beispielsweise zu einer Optimierung des Ofentriebs bei, sodass schon am Anfang des Backprozesses eine Volumenausdehnung stattfindet. Dabei muss die Backmittelmenge sorgfältig ermittelt werden, um ein optimales Gebäckvolumen zu erzielen. Dies gilt auch für die Krumen-Elastizität und Gebäckspezifische Porenbildung des Backproduktes. Krustenbräunung, Aromabildung und lange Haltbarkeit dürfen hierbei ebenfalls nicht vernachlässigt werden.

Konträr dazu bezieht sich der Konsument bei der Beurteilung der Qualität des Backproduktes eher auf sensorische Eigenschaften in Hinblick auf die Textur, Geschmack, das allgemeine Erscheinungsbild und anhaltende Frische des Produkts [10, 28]. Zusätzlich verlangt der Endverbraucher, besonders in den vergangenen Jahren, ein Brot *ohne Chemie* [29]. Also ein Backprodukt, welches möglichst nach traditioneller Weise und ohne Lebensmittelzusatzstoffe hergestellt wird. Zudem wächst die Nachfrage von Backprodukten, die der individuellen Ernährung entsprechen. Beispiele hierfür sind Brot mit einem besonders hohen Eiweißgehalt oder glutenfreies Brot.

#### 1.4.1. Zöliakie als Beispiel einer Nahrungs-Hypersensitivität

Obwohl Gluten in Lebensmitteln sehr verbreitet vorkommt, leidet ein Teil der Bevölkerung an Hypersensitivitäten wie Weizenallergie, Nicht-Zöliakie-Glutensensitivität und Zöliakie. Letztere, auch als gluteninduzierte Enteropathie bekannt, ist eine durch Gluten-Unverträglichkeit verursachte, lebenslange chronisch-entzündliche Erkrankung des Magen-Darm-Trakts, die autoimmune Merkmale aufweist [30]. Dies führt dazu, dass die Betroffenen enorm in ihrer Ernährung eingeschränkt sind und eine hohe Nachfrage an glutenfreien Produkten besteht. Typische Symptome der Krankheit sind Schleimhautentzündungen, Darmzottenatrophie und erhöhte Darmpermeabilität [5]. Die Symptome wurden erstmals im Jahre 1888 beschrieben, wobei die Krankheit erst ca. 60 Jahre später im Zusammenhang mit Gluten erwähnt wurde. Ungefähr ein Prozent der westlichen Bevölkerung ist von der Krankheit betroffen, wobei diese damit die am häufigste vorkommende Nahrungs-Hypersensitivität darstellt und bis zur heutigen Zeit der Verzicht auf glutenhaltige Produkte die einzig wirkungsvolle Therapie darstellt [31].

Die durch Gluten ausgelöste Immunantwort ist spezifisch auf toxische Peptide innerhalb der Gliadin-Fractionen des Glutens gerichtet. Diese Peptide können auf Grund ihres hohen Anteils an den Aminosäuren Prolin bzw. Glutamin in den Dünndarm vordringen, da die Peptide hinsichtlich ihrer Aminosäuresequenz nicht vollständig enzymatisch abgebaut werden können. Anschließend durchdringen diese die Epithelzellschicht und initiieren die immunogene Kaskade, bei welcher die Gewebetransglutaminase 2 involviert ist [32]. Die katalysierten Reaktionen dieses Enzyms, also die Modifizierung von Gliadin-Peptiden durch De- oder Transamidierung, führen zu einer erhöhten Zöliakie-Immun-Reaktivität. Die modifizierten Peptide binden darauffolgend an HLA-DQ2-Antigene. Dies wiederum hat zur Folge, dass die Proliferation von Gliadin-reaktiven intestinalen T-Zellen erhöht ist und diese proinflammatorische Zytokine sekretieren. Nachfolgend wird der Gliadin-Peptid-HLA-DQ2-Antigen-Komplex mittels einem T-Zell-Rezeptor erkannt und bindet an die T-Zellen [33]. Zöliakie-toxische Gluten-Peptide mit einer Länge über acht Resten, welche die Motive PSQQ, QQQP, QQPYP, bzw. QPYP enthalten, können eine direkte Immunantwort auslösen [34]. Insbesondere das toxische 33-mer-Peptid LQLQFPQPQLPYPQPQLPYPQPQLPYPQPQPF ist von großem Interesse, da diese Sequenz drei T-Zell-Epitope enthält [35].

Als Folge der Krankheit kann es dazu kommen, dass Nährstoffe nur schwer vom Körper aufgenommen werden und teilweise unverdaut im Darm verbleiben, sodass sich oftmals ein Nährstoffmangel feststellen lässt, falls die Zöliakie unbehandelt bleibt. Bei mehr als 99 % der betroffenen Menschen lässt sich eine bestimmte genetische Prädisposition von

Histokompatibilitätsantigenen (HLA DQ2 und DQ8) nachweisen. Allerdings besitzen 25 % aller Menschen diese Konstellation, wobei nur eine Minderheit das Gluten nicht verträgt. Neben der Zöliakie-Erkrankung kommt es bei ca. 30 % der Betroffenen vor, dass diese an einer Zöliakie-assoziierten Krankheit wie z. B. Diabetes mellitus Typ 1 leiden [30]. Die Erkenntnisse des Pathomechanismus eröffnen neben einem Verzicht auf glutenhaltige Produkte alternative Therapieansätze für die Zöliakie. Ein möglicher Forschungsansatz könnte die Hydrolyse von symptomauslösenden Peptiden sein. Da Gluten ein hohes Vorkommen an den Aminosäuren Prolin und Glutamin aufweist, stellt der Einsatz von Prolyl- und Glutamyl-spezifischen Peptidasen eine Anwendungsmöglichkeit mit hohem Potential dar [36]. Beispielsweise führt Tolerase<sup>®</sup> G (An-Pep aus *Aspergillus niger*, DSM), eine kommerziell erwerbliche Prolyl-spezifische Endopeptidase, zu einer signifikanten Reduzierung der Gluten-Konzentration im Magen, wobei das Enzym bisher, laut Produktbeschreibung, nicht als Ersatz einer glutenfreien Ernährungsweise genutzt werden soll, sodass noch weiterer Forschungsbedarf besteht [37, 38]. Des Weiteren stellt die Züchtung von genetisch modifizierten Weizenarten, die minimale immunologische Auswirkungen nach dem Verzehr aufweisen, eine Möglichkeit dar [39]. Diese Strategie beeinträchtigt jedoch potentiell die Qualität von der Teigeigenschaft, da Gluten einen wesentlichen Einfluss darauf nimmt und nur durch das Klebereiweiß ein kohäsiver, viskoelastischer Teig mit hohem Gashaltevermögen entsteht. Backmittel könnten dieser Problematik entgegenwirken.

#### 1.4.2. Chemische Additive in der Backindustrie

Das Wachstum von Industrie-Bäckereien und die damit verbundene Massenfertigung von Backwaren in den vergangenen Jahren erforderte eine Mechanisierung der Teigherstellung und des Backprozesses. Um Teige besser und schneller zu verarbeiten, können chemische Additive zugesetzt werden, welche nicht oder nur in ungenügenden Mengen in dem Teig vorkommen. Im Allgemeinen sind Backmittel „Mischungen von Lebensmitteln, Zusatzstoffe inbegriffen, die die Herstellung von Backwaren erleichtern und die wechselnden Verarbeitungseigenschaften der Rohstoffe ausgleichen. [...]“ [40]. Ziel ist die Gewährleistung einer konstanten Verarbeitungsweise der Backwaren sowie eine gleichbleibende Qualität. Grundsätzlich sind in Backwaren der Europäischen Union Zusatzstoffe der Gruppe I (Phosphate) erlaubt. Ausnahmen hierfür sind Brotwaren, welche ausschließlich aus Weizenmehl, Wasser, Hefe oder Sauerteig und Salz hergestellt werden (Kategorie-Nummer 07.1.1), sowie *pain courant francais* und *Friss búzakenyér, fehér és félbarna kenyere* (Kategorie-Nummer 07.1.2). In Brot dürfen keine Konservierungsstoffe enthalten sein. Hiervon ausgenommen sind geschnittene und verpackte

Brote, wie sie in Supermarktregalen zu finden sind. Lebensmittelfarbstoffe sind in Brot ebenfalls untersagt. Einzig in Malzbrot darf Zuckercouleur zugesetzt werden [41]. Weitere Backmittel beeinflussen die Backeigenschaften der Backprodukte, auch wenn diese zum Teil auch nur in geringen Mengen zugesetzt werden (Tab. 1.2). Ascorbinsäure stellt eines der wichtigsten Backmittel dar. Ascorbinsäure ist ein Antioxidans, welches während der Teigproduktion in der Gegenwart von Sauerstoff enzymatisch zu Dehydroascorbinsäure umgewandelt wird. Der Vitamin C–Oxidationsprozess ist komplex, schließt aber wahrscheinlich die Oxidation der Thiolgruppe der Gluten-bildenden Proteine unter Ausbildung von Disulfidbindungen mit ein [42]. Dadurch wird die Kleberstabilität des Gluten-Netzwerkes verstärkt und die Gas-Retention im Teig verbessert, was wiederum zu einer Volumenvergrößerung des Gebäcks führt [43, 44]. Ein weiterer Nutzen von Ascorbinsäure ist der Einsatz bei der Entkopplung der Verfahrensschritte Gärung und Backen, um Teige lagern zu können und diese nicht gleich weiterverarbeiten zu müssen [45].

**Tabelle 1.2: Durchschnittliche Einsatzmengen von backtechnisch wirksamen Stoffen im Teig von Weizenmählerzeugnissen [45].**

<b>Backmittelzusatz</b>	<b>Konzentration</b>
Lecithin	0,1-0,3 %
Ascorbinsäure	100-200 mg kg <sup>-1</sup>
Cystein	50 mg kg <sup>-1</sup>
Fettsäuremonoglyceride, Stearoyllactylat	0,2 %
Hydrokolloide	ca. 1 %
Diacetylweinsäuremono- und -diglyceride	0,2 %

Cystein interagiert ebenfalls mit der Gluten-Struktur und spaltet die Disulfid-Vernetzungen. Durch die Entspannung des Kleberproteins führt die Backmittelzugabe zu einem weichere und elastischeren Teig, welcher zum einen besser formbar ist und zum anderen einer verkürzten Teigruhe und Knetzeit bedarf [44, 46]. In Abhängigkeit von den Anforderungen an den Teig werden gezielt die Gluten-modifizierenden Backmittel ausgewählt. Weitere wichtige Inhaltsstoffe in Backmitteln sind Emulgatoren, welche Einfluss auf die Entwicklung der Gasblasengröße, Gas-Retention, Teigstabilität und Brotkrumen-Weichheit nehmen [42]. Im Allgemeinen werden hauptsächlich Emulgatoren des Typs Lecithin, sowie Diacetylweinsäuremono- und -diglyceride verwendet. Die Zugabe gewährleistet die schnelle

Fett-Wasserverteilung im Gebäck und fördert zusätzlich eine höhere mechanische Belastbarkeit [44]. Hydrokolloide werden für die Erhöhung der Teigwasseraufnahmefähigkeit hinzugefügt, was die Teige trockener macht, sodass diese leichter zu verarbeiten sind [45].

Ein Nachteil der Verwendung von chemischen Backmitteln ist die niedrige Akzeptanz des Verbrauchers, weshalb immer mehr chemische Backmittel durch enzymatische Backmittel ersetzt werden. Daher besteht Bedarf an neuen, spezifischen, industriell anwendbaren Backenzymen.

### 1.4.3. Enzymatische Additive in der Backindustrie

Heutzutage werden Enzyme vielfältig in der Lebensmittelindustrie für die Prozessoptimierung und für die Qualitätssteigerung des finalen Produkts eingesetzt. [18]. Im Allgemeinen wird der Einsatz von Enzymen aufgrund ihrer hohen Spezifität, natürlichen Herkunft und der Unbedenklichkeit in Bezug auf die Gesundheit dem Einsatz chemischer Zusatzstoffen vorgezogen. Ebenso wie chemische Additive können durch enzymatische Backmittel die Prozessparameter stabilisiert, die Mehl-Funktionalität optimiert und so die Teigqualität des finalen End-Backprodukts garantiert werden (Tab. 1.3) [18].

Im Detail bewirkt der Enzym-Zusatz eine Veränderung der Teigverarbeitung wie beispielsweise die maschinelle Bearbeitbarkeit oder Stabilität, eine verlängerte Haltbarkeit der Backwaren, erhöhtes Gebäckvolumen, feinere und weißere Brotkrumenstruktur, sowie eine intensivere Brotrinden-Färbung [18].

Zusätzlich tragen Enzyme zu einer Reduktion des Rohstoffeinsatzes bei und ermöglichen es, die damit verbundenen Kosten zu senken [47]. Außerdem handelt es sich bei Enzym-Backmitteln nicht um Lebensmittelzusatzstoffe, sondern um Verarbeitungshilfsstoffe, welche nach dem Backvorgang in der Regel inaktiviert im Endprodukt zurückbleiben [48]. Die fehlende technologische Aktivität im Endprodukt hat zur Folge, dass entsprechende Enzymzusätze auf dem Produkt nicht deklariert werden müssen, was sie durch eine höhere Verbraucherakzeptanz attraktiv für die Lebensmittelindustrie macht und somit ein kommerzieller Vorteil gegenüber chemischen Backmitteln besteht. Enzyme als Verarbeitungshilfsstoffe dürfen Lebensmitteln zugesetzt werden, wenn die Verwendung der Dosismenge für den Verbraucher gesundheitlich unbedenklich ist, eine hinreichende technologische Notwendigkeit besteht und der Verbraucher durch die Verwendung nicht irregeführt wird [48].

**Tabelle 1.3. Enzymatische Backmittel und deren Wirkung auf die Teigverarbeitung bzw. finalen Backprodukte [18, 49].**

Erzielte Effekte	Eingesetztes Enzym								
	$\alpha$ -Amylase	Amylo-Glucosidase	Xylanase	Lipase	Glucose-oxidase	Peptidase	Oxido-reduktase	Trans-glutaminase	Asparaginase
Verbesserte Gasproduktion und Teigfermentation	×	×					×		
Teigaufbereitung, Teigstabilität, Verbesserung der Krumenstruktur	×		×	×				×	
Glutenstärkung, Ersatz für Oxidationsmittel					×			×	
Glutenschwächung, Teigdehnbarkeit						×			
Volumenvergrößerung	×	×	×	×	×		×		
Entwicklung der Brotkrustenfärbung	×	×					×		×
Krumenaufhellung				×	×				
Verlängerte Haltbarkeit	×					×			
Ersatz von Emulgatoren			×	×					

#### 1.4.3.1. Xylanasen

Modifizierung von Nicht-Stärke-Polysacchariden wie Arabinoxylan im Teig führen zu einer Veränderung der Teigrheologie, Teigverarbeitung und Funktionalität des Teigs (Tab. 1.3). Xylanasen (EC 3.2.1.8) katalysieren das Aufbrechen des  $\beta$ -1,4-verknüpften Xylan-Rückgrats des AX, was zwangsläufig zu einer Erniedrigung des Polymerisationsgrades führt. Als Produkt werden Oligomere, Xylobiose und Xylose freigesetzt. Neben Endoxylanasen, welche ungezielt innerhalb der Xylankette wirken, setzen Exoxylanasen die Produkte von den Enden der Ketten her frei [16]. Die so enzymatisch freigesetzten Pentosen können bei dem Fermentierungsprozess durch die zugesetzte Hefe genutzt werden. Die Mehrheit der Endoxylanasen katalysiert die Hydrolyse unsubstituierter Domänen des Xylan-Rückgrats, wobei die katalytische Aktivität durch Arabinoseseitenketten gehindert wird. Erst mit dem Einsatz zusätzlicher akzessorische Enzyme kann das komplette Xylan-Rückgrat degradiert werden. Die Wirkungsweise der zugesetzten Xylanasen ist von ihrer katalytischen Spezifität gegenüber Wasser-extrahierbaren- bzw. Wasser-unextrahierbaren Polysacchariden abhängig. Je nach zu erzielendem Effekt können die Xylanasen im Verhältnis so eingesetzt werden, bis die gewünschte Teigstruktur erlangt wird. Durch die teilweise Hydrolyse von Nicht-Stärke-

Polysacchariden und die resultierende Reduktion der molekularen Masse wird die Wasser-Rückhaltekapazität verändert. Das hat eine Umverteilung des freien Wassers und daraus folgend eine Veränderung auf die Organisation des Gluten-Netzwerkes zur Folge [49]. Durch die WU-AX-Solubilisierung wird die Viskosität des Teigs erhöht, was ein positives Attribut für die Teigqualität darstellt. Zusätzlich führt der Einsatz von Xylanasen zu einer Volumenvergrößerung des Backproduktes. Allgemein können Xylanasen allen Teigen für verschiedene Brotypen zugesetzt werden. Zusätzlich können sie in Kombination oder als Ersatz von Emulgatoren eingesetzt werden [49]. Freigesetzte Xylo-Oligosaccharide sind ebenso vorteilhaft für die gastrointestinale Flora des Konsumenten [4].

#### 1.4.3.2. **Peptidasen**

Peptidasen (EC 3.4.-.-) gehören den Hydrolasen an und katalysieren die Spaltung von Peptidbindungen innerhalb (Endopeptidasen) oder außerhalb der Polypeptidkette am Carboxy- bzw. Amino-Terminus (Exopeptidasen) eines Proteins. Aufgrund ihrer Spezifität bezüglich der Peptidbindung als Substrat-Nutzung haben diese direkten Einfluss auf die Proteinstruktur des Teigs und somit folglich auf dessen Eigenschaften (Tab. 1.3). Insbesondere bei Mehlen mit niedrigem Ausmahlungsgrad kommt diese Enzymklasse zum Einsatz, da bei diesem Typ ein hoher Gluten-Anteil vorliegt. Durch den Enzymeinsatz wird das Gluten-Netzwerk geschwächt, wodurch Teig-Mischzeiten reduziert werden [18]. Ferner weist der Einsatz dieser Enzymklasse Vorteile gegenüber chemischen Effekt-Analoga auf, da Peptidasen nur Peptidbindungen als Substrat nutzen. Reduzierende Agenzien, die als chemische Backmittel genutzt werden, wirken oft ebenfalls auf intermolekulare Bindungen (bspw. Disulfidbrücken), welche an der Gluten-Struktur maßgeblich beteiligt sind [18]. Exopeptidasen erzielen ihre Hauptwirkung vornehmlich durch die Verbesserung der Krustenbräune und des Geschmacks des Brotes, welche durch die Maillard-Reaktion hervorgerufen wird [4, 50].

#### 1.4.3.3. **Sonstige Enzyme**

Neben Xylanasen und Peptidasen werden noch andere Enzyme in der Backindustrie verwendet, die einen direkten Einfluss auf die Teigverarbeitung und das Backprodukt nehmen (Tab. 1.3). Lipasen (EC 3.1.1.3) kommen natürlich in den meisten Getreidekörnern vor. Diese Enzyme wirken an der Lipid/Wasser- bzw. Lipid/Luft-Grenzschicht und katalysieren im Mehl die Hydrolyse der vorhandenen Lipide zu freien Fettsäuren, Mono- oder Diglyceriden [4, 18]. Als Resultat wirken Lipasen indirekt auch auf die Teigstabilität und die homogene Brotkrumenbildung ein, steigern das Backvolumen und erhöhen die Gärtoleranz (Tab. 1.3) [50].



Oxidoreduktasen bilden eine weitere wichtige Gruppe von Backenzymen, wobei Glucoseoxidasen (EC 1.1.3.4) und Lipoxygenasen (EC 1.13.11.12) die wichtigsten Enzymklassen darstellen. Sie katalysieren Redoxreaktionen, also den Austausch von Elektronen oder Äquivalenten zwischen Akzeptor- bzw. Donormolekülen. Diese Enzymklasse hat so einen indirekten Einfluss auf das Gluten-Netzwerk, was zu einer verbesserten Teigstruktur und Stabilität, einer Reduzierung der Teig-Klebrigkeit und zu einer verbesserten maschinellen Verarbeitbarkeit sowie einem verbesserten Backvolumen führt [18].

Acrylamid-Bildung ist ein häufig auftretendes Problem bei thermisch belasteten Lebensmitteln, da dies ein toxisches Produkt darstellt. Es entsteht in der Maillard-Reaktion zwischen Asparagin und reduzierenden Zuckern bei hohen Temperaturen in stärkehaltigen Lebensmitteln und stellt verstärkt bei der Herstellung von Knäckebrot ein Problem dar. Durch den Einsatz von Asparaginase (EC 3.5.1.1) kann der Acrylamid-Bildung entgegengewirkt werden, da dieses Enzym die Umwandlung von Asparagin in Asparaginsäure katalysiert und so Asparagin nicht mehr als Substrat zur Verfügung steht [18].

Stärke ist mengenmäßig der größte Inhaltsstoff in Weizenmehl, bildet ein Polysaccharid aus Glucosemolekülen und setzt sich aus Amylose und Amylopektin zusammen. Folglich ist der Einsatz von Amylasen als Backmittel sehr effizient, da durch die Modifizierung des Polysaccharid-Netzwerks die Teigeigenschaften beeinflusst werden. Amylasen spalten im Zuge ihrer Katalyse die verknüpften Zuckerketten an der  $\alpha$ -1,4-glykosidischen Bindung. Backtechnisch werden meist die Endo- $\alpha$ -Amylasen (EC 3.2.1.1), die maltogene  $\alpha$ -Amylase (EC 3.2.1.33) und die  $\alpha$ -Glucoamylase (EC 3.2.1.3) eingesetzt. Im Bezug zum Backen sind Amylasen in zweifacher Hinsicht wichtig. Zum einen setzen die Enzyme vergärbare Mono- und Disaccharide frei, die anschließend von der Hefe zu Ethanol und Kohlendioxid fermentiert wird, was folglich die Lockerung des Teiges bewirkt. Zum anderen wirkt der Einsatz von Amylasen der Viskosität des Teigs entgegen, sodass die Gasblasen-Ausbildung voranschreiten kann [45]. Weiterhin nehmen Amylasen Einfluss auf die Vergrößerung des Gebäckvolumens, die Brotkrumen-Entwicklung, die Brotkrustenfarbe und die Haltbarkeit des Brotes [18, 51]. Ferner üben Transglutaminasen (EC 2.3.2.12) einen Einfluss auf das Gluten-Netzwerk aus (Tab. 1.3). Ein weiteres Enzym, welches direkt die Gluten-Moleküle modifizieren kann, sind die Prolyl-spezifischen Peptidasen.

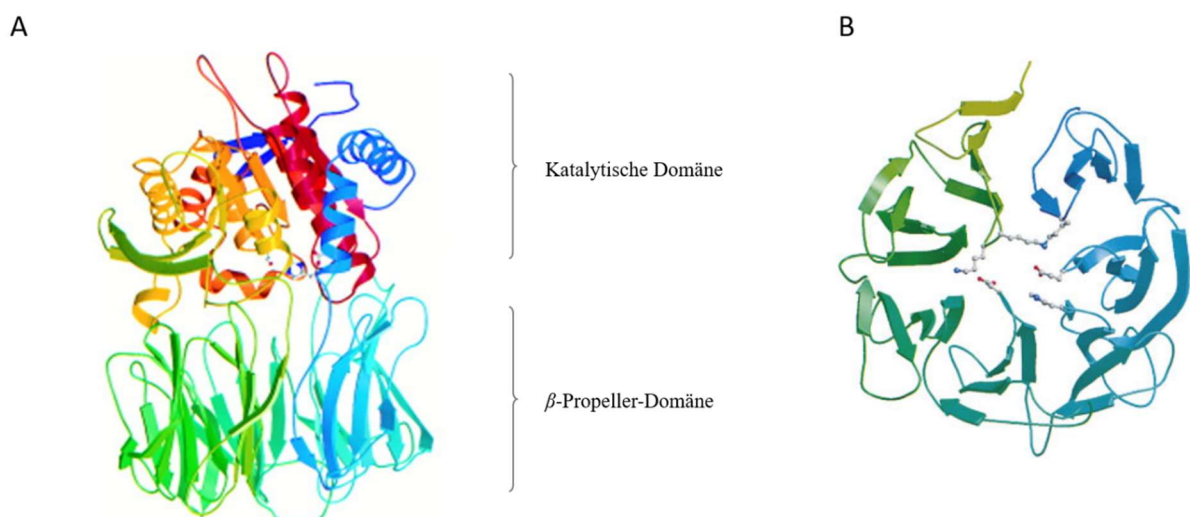
### **1.5. Prolyl-spezifische Endopeptidasen**

Prolin ist eine zyklische proteinogene Aminosäure, die sich durch das sekundäre Amin als Aminofunktion (Pyrrolidin-Ring) auszeichnet. Die Prolin-Reste in Peptidketten bzw. Proteinen

beeinflussen die Proteinfaltung und haben außerdem zur Folge, dass diese Bereiche durch die Immobilität des Restes vor dem enzymatischen Abbau geschützt sind [52, 53]. Prolyl-spezifische Peptidasen vermögen solche Peptidbindungen, an denen Prolyl-Reste beteiligt sind, hydrolytisch zu spalten. Prolyl-spezifische Endopeptidasen (PEPs; EC 3.4.21.26), oder auch Prolyl-Oligo-Peptidasen (POPs) genannt, gehören den Serinpeptidasen an und katalysieren die Hydrolyse von Prolin-Peptidbindungen an dem Carboxyende von internen Peptiden [54]. PEPs kommen in einer Vielzahl von Organismen vor und konnten sowohl aus höheren Tieren, Pilzen, Bakterien, als auch aus Insekten isoliert werden [55, 56]. Die Enzymklasse wurde erstmals 1971 im menschlichen Uterus entdeckt und 1976 als *post-proline cleaving enzyme* postuliert [57, 58]. Die erste mikrobielle PEP wurde im *Flavobacterium meningosepticum* sieben Jahre später identifiziert [59]. PEPs katalysieren die Hydrolyse von Peptidbindungen bei Substraten bis zu einer Länge von 30 Aminosäuren und weisen oftmals eine größere molekulare Masse im Vergleich zu anderen Serin-Peptidasen auf (80 kDa vs. 30 kDa) [60].

### 1.5.1. Struktur und Wirkungsmechanismus

Ein Vergleich der Aminosäuresequenz zeigt eine niedrige Sequenzähnlichkeit innerhalb der bekannten Enzyme, wobei die Enzymklasse eine vergleichbare dreidimensionale Struktur aufweist [61]. Erstmals wurde im Jahre 1998 die Struktur einer PEP aus Schweinemuskel beschrieben (Abb.1.2) [62].



**Abbildung 1.2: Struktur einer aus dem Schwein isolierten Prolyl-Endopeptidase [62].** A: Struktur beider Proteindomänen. Katalytische und  $\beta$ -Propeller-Domäne sind jeweils durch geschweifte Klammern gekennzeichnet. B: Struktur der  $\beta$ -Propeller-Domäne senkrecht zur Abbildung A.

Das 80 kDa Enzym weist eine zylindrische Form auf und basiert auf einer 710 Aminosäuren langen Sequenz [63]. Die Struktur besteht aus einer katalytischen Domäne sowie einer siebenblättrigen  $\beta$ -Propeller-Domäne (Abb. 1.2 A) [62]. Die katalytischen Aminosäure-Reste befinden sich hauptsächlich am carboxyterminalen Ende (AS 428-710), bzw. am N-Terminus (AS 1-72) der Polypeptidkette und bilden die katalytische Domäne. Diese weist eine  $\alpha/\beta$ -Hydrolase-Faltstruktur auf und ähnelt der Struktur der Lipasen [64, 65]. Die katalytische Domäne wird durch acht parallel verlaufende  $\beta$ -Faltblätter gebildet, wobei das zweite antiparallel zu den restlichen sieben  $\beta$ -Faltblättern verläuft. Diese Domäne ist gewunden und wird durch zwei Helices auf der einen und sechs Helices auf der anderen Seite eingeschlossen. Zwischen den beiden katalytischen Resten, die die katalytische Domäne bilden, ist die Propeller-Domäne eingebettet (AS 73-427) und besteht aus einer siebenfachen Wiederholung aus viersträngigen antiparallel verlaufenden  $\beta$ -Faltblättern (Abb. 1.2 B) [62]. Durch ihre verwundene und radiale Anordnung bilden die Faltblätter einen zentralen Tunnel, wobei die Strukturstabilität hauptsächlich durch hydrophobe Wechselwirkungen gewährleistet wird [61]. Die katalytische Reaktion folgt dem *induced-fit*, also dem induzierten Passform-Mechanismus [66]. Die katalytische Triade besteht aus Ser-Asp-His und ist an den Grenzflächen der beiden Proteindomänen in eine Art Höhle eingebettet [62]. Das katalytische Ser liegt innerhalb eines G-X-S-X-G Motivs, wobei X jede beliebige Aminosäure sein kann [60]. Das Ser bildet einen nukleophilen Ellenbogen aus, welcher charakteristisch den  $\alpha/\beta$ -Hydrolasen gleicht [65]. Aufgrund dieser Ausrichtung kann die Hydroxy-Gruppe des Ser zum einen mit dem katalytischen His wechselwirken und zum anderen mit dem Substrat. Die Hydroxy-Gruppe des katalytischen Asp liegt in einer Ebene mit dem Imidazolring des His, was zu einer Wasserstoffbrücken-Ausbildung führt [60]. Der katalytische Mechanismus folgt dem der Serinpeptidasen. Nach der Substratbindung wird das Carbonyl-Kohlenstoffatom der zu spaltenden Peptidbindung im ersten Schritt des Mechanismus nukleophil vom Ser angegriffen [67]. Als Folge dessen kommt es zu einer Ausbildung eines tetraedrischen Intermediats und eines Oxyanion-Lochs, welches von den Aminosäuren Tyr und Asn der Hauptkette des PEP-Proteins gebildet wird [60]. Der His-Rest wirkt säure-basenkatalytisch, wodurch zuerst ein Proton der Ser-Hydroxygruppe entfernt und dieses auf das Substrat übertragen wird, welche die Abgangsgruppe in dem Acylierungs-Reaktionsschritt darstellt [60]. In Folge dieses Mechanismus entsteht ein Imidazoliumion, wobei nach dem Zerfall des Intermediats ein Acyl-Enzym-Intermediat gebildet wird. Nach dem Abgang der Aminogruppe, resultierend aus der Peptidspaltung, wird diese vorherige Bindung mit Wasser substituiert. Das katalytische Ser wird unter der Ausbildung eines zweiten tetraedrischen Intermediats deacyliert, indem ein

Wassermolekül zugeführt wird und steht für einen neuen Katalysezyklus zur Verfügung [55, 67].

### 1.5.2. Industrielle Applikation von PEPs

Einige Bestandteile von Lebensmitteln, wie zum Beispiel das Gluten in Weizen, weisen einen erhöhten Anteil an Prolin auf (vgl. 1.2). Aufgrund dessen besitzen PEPs ein hohes Potential für den Einsatz in der biotechnologischen Industrie. Eine kommerziell erwerbliche PEP ist die An-Pep (Tolerase<sup>®</sup> G), welche von der niederländischen Firma DSM produziert wird.

Gluten-assoziierte Krankheiten wie in Kapitel 1.4.1 beschrieben, stellen ein großes Problem unserer heutigen Gesellschaft dar, da die Betroffenen nicht nur hinsichtlich ihrer Ernährung limitiert, sondern auch auf sozialer Ebene eingeschränkt sind, sobald glutenhaltige Speisen involviert sind. Proteinhydrolysate, die einen hohen Anteil an Prolin aufweisen, stellen ein Risiko für diesen Teil der Bevölkerung dar (vgl. 1.4.1). Der Abbau von prolinreichen Proteinen wie Gluten oder Kollagen für Allergen-freie Nahrungsmittel ist eine anhaltende Herausforderung für die biotechnologische Industrie, da Nahrungsmittel erst ab einem Grenzwert von unter 20 mg kg<sup>-1</sup> Gluten als *glutenfrei* deklariert werden dürfen. An-Pep zeigte erfolgreich den Abbau von immunsensitiven Gluten-Peptiden sowie den Verdau ganzer Gluten-Moleküle [68, 69]. Studien einer weiteren PEP aus *A. niger* zeigten, dass die Immunantwort von Gluten-reaktiven T-Zelllinien durch den Einsatz der PEP aufgehoben werden konnte [70]. Neben der Hydrolyse von Gluten könnte die Hydrolyse von Kollagen, welches als Abfallprodukt in der Fleischindustrie anfällt, eine weitere Option für den Einsatz von PEPs in der Lebensmittelindustrie darstellen [55]. Dieser Abbau konnte erfolgreich mittels einer aus *Aspergillus oryzae* isolierten Prolyl-Aminopeptidase in Kombination mit anderen Peptidasen nachgewiesen werden [71].

Bei der Herstellung von hydrolysierten Lebensmitteln werden zwangsläufig unerwünschte Peptide freigesetzt, welche bitter im Geschmack sind und negativ den Genuss des Produkts beeinflussen [72]. Neben hydrophoben Aminosäuren bewirken auch Prolyl-Peptide einen bitteren Geschmack [73, 74]. Bei der Produktion von Käse sind Peptidasen unabdinglich und auch hier entstehen im Verlauf des Prozesses bittere Peptide. In Goudakäse wurden prolinreiche bittere Peptide detektiert, welche aus  $\alpha$ - und  $\beta$ -Casein stammen [75]. Auch hier zeigte die PEP An-Pep eine erfolgreiche Reduktion des bitteren Geschmacks nach Inkubation mit Casein-Hydrolysaten [68].

Neben dem Einsatz in der Lebensmittelbiotechnologie werden Prolyl-spezifische-Peptidasen auch für den medizinischen Sektor und die pharmazeutische Industrie studiert. Sowohl als

therapeutisches Agens als auch als therapeutisches Target spielen die PEPs eine große Rolle. Da in der Vergangenheit die katalytische Aktivität der Enzymklasse in Zusammenhang mit verschiedenen neurologischen Störungen wie Depression, Manie, Schizophrenie, Bulimie und Parkinson'sche Krankheit gebracht wurde, verstärkte sich die Forschung auf Prolyl-Endopeptidasen [52, 76, 77].

### 1.6. Ferulasäureesterasen

Ferulasäureesterasen (FAEs) oder Feruloylesterasen (EC 3.1.1.73) gehören den Carboxylesterhydrolasen an und katalysieren die Freisetzung von Phenolsäuren durch die Hydrolyse von Esterbindungen aus pflanzlichen Zellwandpolysacchariden [13]. In der Literatur wurden FAEs erstmals im Jahre 1987 aus *Streptomyces olivochromogenes* beschrieben, wobei die biochemische Charakterisierung erst vier Jahre später erfolgte [78, 79]. Bisher wurden FAEs hauptsächlich aus Pilzen isoliert und charakterisiert. Insbesondere die Gattung *Aspergillus* stellt sich als effektiver FAE-Produzent hervor, wobei AnFaeA die wohl am besten erforschte FAE ist [80]. Des Weiteren wurden neben den pilzlichen FAEs auch bakterielle, pflanzliche und aus Ratten und Insekten stammende FAEs identifiziert [15, 81-84].

FAEs stellen eine sehr vielfältige Enzymklasse dar, welche sich durch eine Diversität der physikalischen Eigenschaften und der Gensequenzen auszeichnet. Wie alle Esterasen weisen auch FAEs ein breites Substratspektrum auf, wodurch eine Differenzierung innerhalb der Enzymklasse erschwert wird. Die initiale Einordnung erfolgte abhängig von der Induktion und Substratspezifität zweier FAEs, AnFaeA und AnFaeB [85, 86]. Nach steigender Anzahl der identifizierten FAEs und den stetig wachsenden annotierten Gensequenzen in Genomdatenbanken wurde ein funktionelles Klassifizierungssystem von mikrobiellen FAEs beschrieben [85]. Dieses System stützt sich auf Substratpräferenzen von vier artifiziellen Modellsubstraten: Ferulasäuremethylester (FA-ME), Sinapinsäuremethylester (SA-ME), Kaffeesäuremethylester (CA-ME) und *p*-Cumarsäuremethylester (*p*CA-ME). Parallel wird in diesem System die primäre Sequenzhomologie mit einbezogen (Tab. 1.4). Mittels dieser Parameter werden vier Subtypen (A-D) charakterisiert und definiert. Des Weiteren wurde für die Klassifizierung das Potential der Freisetzung von Diferulaten (Di-FA) aus komplexen natürlichen Substraten nach Vorbehandlung mit Xylanasen berücksichtigt. Typ C und D FAEs katalysieren die Hydrolyse der Modellsubstrate in die entsprechende Säure, wobei Typ D im Gegensatz zu Typ C die Freisetzung von Di-FA begünstigt.

Tabelle 1.4: FAE-Klassifizierung nach Crepin *et al.* 2004 [85].

Typ	A	B	C	D
<b>Substratpräferenz gegenüber</b>	FA-ME	FA-ME	FA-ME	FA-ME
	SA-ME	CA-ME	SA-ME	SA-ME
<b>Hydroxyzimtsäureester</b>	<i>p</i> CA-ME	<i>p</i> CA-ME	CA-ME <i>p</i> CA-ME	CA-ME <i>p</i> CA-ME
<b>Freisetzung von 5,5-Diferulaten</b>	Ja	Nein	Nein	Ja
<b>Sequenzhomologie</b>	Lipasen	Kohlenhydrat- esterase Klasse 1, Acetylxy lanesterase	Chlorogensäure- esterase, Tannase	Xylanase
<b>Beispiel</b>	AnFaeA aus <i>A. niger</i> [80]	StFAE-A aus <i>Sporotrichum</i> <i>thermophile</i> [87]	TsFaeC aus <i>Talaromyces</i> <i>stipitatus</i> [88]	NcFaeD aus <i>Neurospora</i> <i>crassa</i> [89]

Die Freisetzung von Diferulaten ermöglicht auch die Typ A FAE, wobei diese Methoxy-Substitutionen an Substraten, aber nicht das Substrat CA-ME hydrolysiert. Typ B FAE agiert weder an SA-ME noch katalysiert diese die Freisetzung von Di-FA aus Pflanzenmaterial. In Folge der rasant wachsenden Bedeutung von Genomsequenzierung als Informationsquelle wurde drei Jahre später ein weitaus ausführlicheres System diskutiert. Das System teilt die FAEs auf Grundlage der Aminosäuresequenzen in sieben Subtypen ein [90]. Für die Generierung des Klassifizierungssystems wurden 91 Aminosäuresequenzen analysiert, wobei unter diesen Sequenzen bereits charakterisierte FAEs sowie putative FAE-Sequenzen verglichen wurden. Neben den sieben Subfamilienclustern waren ebenfalls FAE-Sequenzen vorhanden, die nicht eindeutig einem Typ zugeordnet werden konnten. Darüber hinaus berücksichtigt das System nicht das Substratspektrum einzelner FAEs. Nochmals acht Jahre später wurde dieses System auf 13 Subfamilien erweitert, nachdem 1251 hypothetischen FAE-Sequenzen untereinander verglichen und zusätzlich die Substratspezifitäten berücksichtigt wurden [91]. Obwohl das Klassifizierungsmodell Typ A-D nach Crepin *et al.* 2004 überholt scheint, da dieses die evolutionären Verwandtschaften nicht widerspiegelt, wird dieses Modell in der vorherrschenden Literatur für die Definition von FAEs weiter berücksichtigt und verwendet.

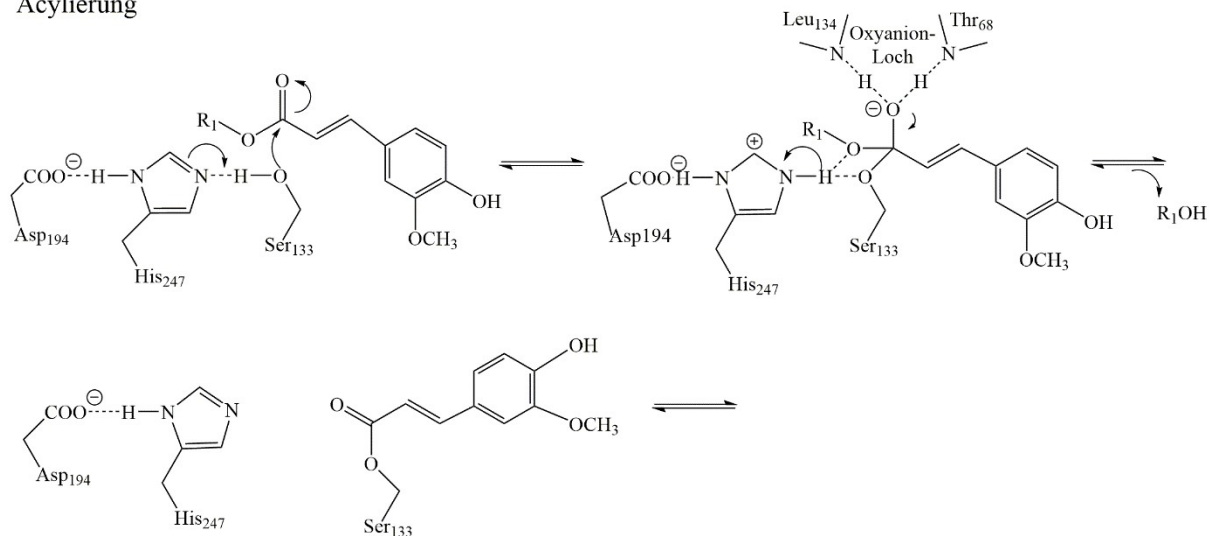
### 1.6.1. Struktur und Wirkungsmechanismus

Ungeachtet der Vielfältigkeit der FAEs bezüglich der biochemischen, substratspezifischen und sequenzbasierten Eigenschaften teilt die Enzymklasse besondere Merkmale in der primären

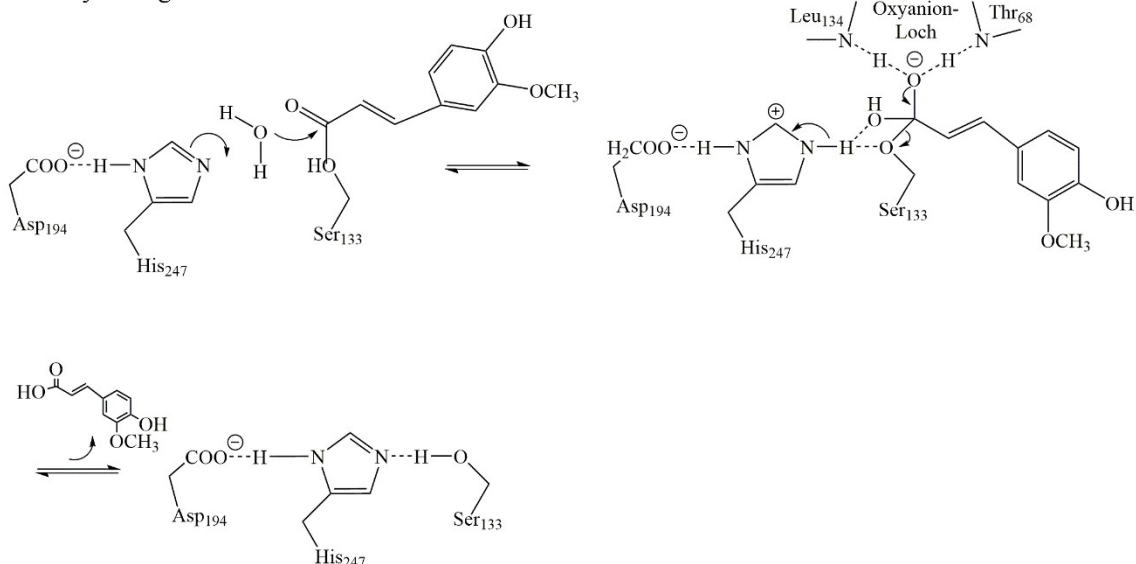
## Einordnung der Forschungsthemen und wichtigsten Erkenntnisse aus den Publikationen im Kontext der wissenschaftlichen Literatur

Struktur. Allen FAEs gemeinsam ist eine konservierte Konsensus-Sequenz eines Pentapeptides (G-X-S-X-G), welche charakteristisch für die Serin-Esterase-Familie ist [92-95]. Das zentral lokalisierte Serin ist Bestandteil der katalytischen Triade Ser-His-Asp, stellt den nukleophilen Ellenbogen dar und katalysiert die Substrat-Hydrolyse ähnlich der Serinproteasen [96, 97]. Konträr dazu zeigen einige basidiomycetische FAEs den Austausch von Glu anstelle von Asp in der katalytischen Triade, welcher auch in Enzymen der  $\alpha/\beta$ -Hydrolase-Faltungsfamilie vorkommt [98-100]. Der katalytische Mechanismus umfasst zwei Reaktionsschritte (Abb. 1.3).

### Acylierung



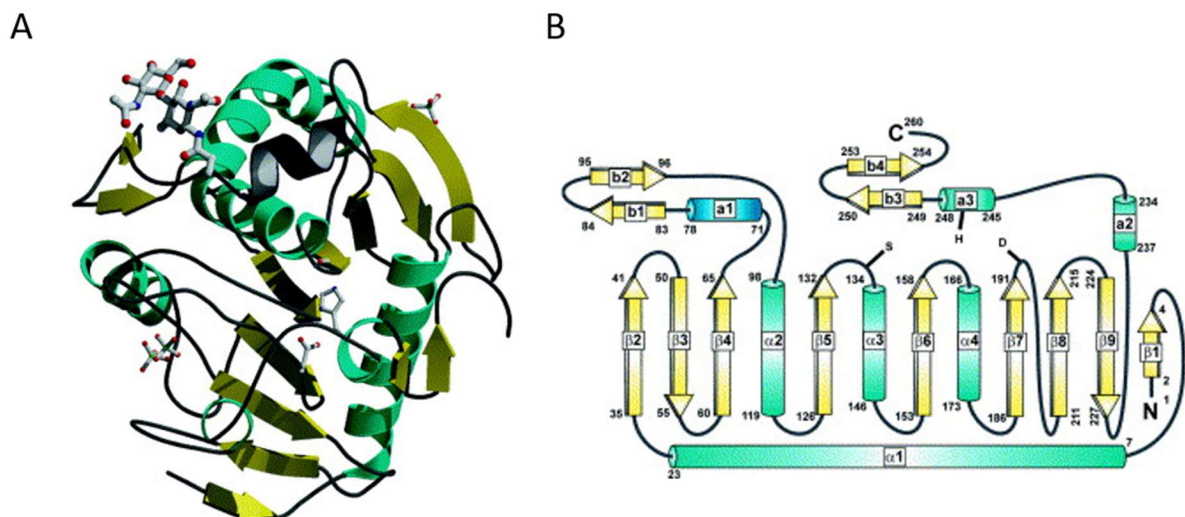
### Deacylierung



**Abbildung 1.3: Katalytischer Mechanismus von FAEs.** Die Hydrolyse des Substrats erfolgt über einen Zwei-Schritt-Mechanismus über die Bildung eines Acyl-Enzyms und den sofortigen Zerfall dieser Struktur mittels eines tetraedrischen Intermediats. Modell nach AnFaeA aus *A. niger* (modifiziert nach [15]).

Initial wird ein tetraedrisches Intermediat durch den nukleophilen Angriff des katalytischen Serins auf das Substrat-Carbonyl-Kohlenstoffatom gebildet. Diese Acylierung wird durch das katalytische His, welches als Base reagiert, durch die Deprotonierung des Ser begünstigt. Die resultierende positive Ladung am His wird durch die elektrostatische Interaktion des Asp-Rests stabilisiert. Durch die Protonierung des Ester-Sauerstoffatoms wird das Intermediat aufgelöst, was zu einem Acyl-Enzym-Intermediat führt, wobei das Kohlenhydrat als Produkt freigesetzt wird. In dem nachfolgenden Deacylierungs-Schritt reagiert ein nukleophiles Wasser-Molekül, welches durch eine basische Reaktion des katalytischen His aktiviert wurde, unter der Bildung eines zweiten tetraedrischen Intermediats. Die direkt anschließende Protonierung des Ser-Sauerstoffatoms führt zur Auflösung des Intermediates und zur Freisetzung der phenolischen Säure oder anderer Produkte [15]. Die negative Ladung des Carbonyl-Sauerstoffatoms des tetraedrischen Intermediats wird durch die Ausbildung eines Oxyanion-Lochs stabilisiert. Diese Stabilisierungsstruktur wird durch das Stickstoffatom des Aminosäurerückrats der Aminosäuren Thr68 und Leu134 gebildet [101].

Obwohl das Interesse an der wirtschaftlichen Nutzung von FAEs weiterhin wächst, liegen nur rudimentäre Erkenntnisse über die Enzymstruktur vor. Wenige Strukturen von FAEs wurden bis dato beschrieben; AnFaeA und AoFaeB, beide aus der Gattung *Aspergillus*, sind wohl die bekanntesten [101-103].



**Abbildung 1.4: Struktur von AnFaeA.** A: 3D-Modell, repräsentiert die  $\alpha$ -Helices und  $\beta$ -Faltblätter. B: Sekundärstruktur des Enzyms mit deklarierenden  $\alpha$ -Helices und  $\beta$ -Faltblättern. Der Deckel, welcher die Aushöhlung des aktiven Zentrums begrenzt, ist jeweils dunkelblau gekennzeichnet.

Kristallographische Analysen zeigten, dass bislang alle FAEs eine  $\alpha/\beta$ -Hydrolase-Faltstruktur aufweisen, welche den pilzlichen Lipasen gleicht [102, 104]. Die  $\alpha/\beta$ -Hydrolase-Faltstruktur von AnFaeA besteht aus einem zentralen neun-strängigen  $\beta$ -Faltblatt, welche von sieben  $\alpha$ -



Helices und zwei zusätzlichen Doppel- $\beta$ -Faltblättern umgeben wird (Abb. 1.4) [102]. Das aktive Zentrum des Enzyms ist eingekerbt wie eine Art Aushöhlung und wird durch einen Deckel, eine Helix, begrenzt (Abb. 1.4). Entgegen der verwandten Lipase-Struktur weist die Deckelstruktur einen hydrophilen Charakter auf. Besonders Tyr scheint für die FAE-Aktivität von Bedeutung zu sein, da nach Austausch von Phe100 zu Tyr im aktiven Zentrum einer Lipase eine FAE-Aktivität zu beobachten war [105]. Ferulasäure interagiert mittels der Hydroxylgruppe am C4-Atom und dem Sauerstoff an der Ether-Funktion an C3 mit der Hydroxylgruppe von Tyr80. Die Carboxyl-Funktion hingegen ist nahe dem Oxyanion-Loch lokalisiert [101, 106]. Durchgeführte Ligand-Dockinganalysen zeigten den Grund, wieso CA-ME nicht als Substrat der TypA FAE AnFaeA dient. Die Substratbindung ist in einer entgegengesetzten, nicht-katalytischen Orientierung und so energetisch begünstigt angeordnet [107]. Unterschiede in den Aminosäureresten innerhalb der Schleifen und Domänen, die in unmittelbarer Nähe der katalytischen und den Substratbindungsregion lokalisiert sind, ermöglichen verschiedenen FAEs, verschiedene Substrate umzusetzen [97, 102, 103].

### 1.6.2. Industrielle Applikation von FAEs

Pflanzliche Nebenströme, wie sie bei verschiedenen industriellen Produktionen entstehen, beinhalten ein nicht ausgeschöpftes Potential an Rohmaterialien. Das Pflanzenmaterial besteht aus einer Reihe von kovalent verknüpften konjugierten Polymeren wie Pektin, Lignin, Cellulose und Hemicellulose. Die untergeordneten Strukturen wie bspw. Arabinoxylan bestehen aus einem Polysaccharid-Rückgrat wie Xylose und sind durch andere Zuckerreste wie Arabinose substituiert, wodurch der Zugang zu dem Zuckerrückgrat limitiert ist. Wie in 1.3 erwähnt, können die einzelnen Polysaccharid-Rückgrate durch phenolische Säuren verestert werden, was zu einer Ausbildung von Polysaccharid-Polysaccharid-Quervernetzungen führt. Daher wird für den Abbau des Polysaccharidsystems ein Enzymspektrum benötigt, welches synergistisch und kollektiv interagiert, um die Polysaccharide aus dem Netzwerk des Rohmaterials freizusetzen. Zunächst katalysieren akzessorische Enzyme wie z. B. FAEs die Hydrolyse der veresterten Quervernetzungen der Polysaccharid-Ketten, brechen so die strukturgebenden Formationen auf und gewährleisten den Zugang von hauptkettenabbauenden Enzymen zum Polysaccharid-Rückgrat [108]. Diese Enzymreaktion ist eine Schlüsselreaktion bei dem Abbau von Pflanzenbiomasse, was die FAEs zu einem vielseitigen und bedeutsamen Enzym für die biomassenverarbeitende Industrie macht. Zusätzlich erweisen sich Enzyme aufgrund ihrer hohen Spezifität bezüglich biologischer Substratumwandlung als eine geeignete Alternative gegenüber chemischen Prozessen.

Bei der Herstellung von qualitativ hochwertigen Fasern für die Industrie stellt die Entfernung von Lignin während der Verarbeitung eine große Herausforderung dar. Lignin ist in ein Netzwerk von Cellulose und Hemicellulose eingebettet und ist für die dunkle Farbe der Pulpe verantwortlich. Um diese dunkle Färbung zu beseitigen, wird der *Kraft*-Prozess angewandt, wobei bei dieser chemischen Behandlung Chlorine für das Bleichen und Entfernen des Lignins verwendet werden. Die daraus entstehenden Produkte stellen krebserregende und umweltverschmutzende Komponenten wie Dioxine und Chlorolignine dar. Eine enzymkatalysierte Faserbleichung unter Verwendung von AnFaeA in Kombination mit einer Peroxidase (EC 1.11.1.13) bzw. Xylanase erzielte ein Bleichen des Rohprodukts sowie die Freisetzung von phenolischen Komponenten, die nachfolgend weiterverarbeitet werden könnten [109-111]. Des Weiteren stellt die Bekömmlichkeit bzw. Verdaulichkeit ein wichtiges Kriterium für die Produktion von Tiernahrung dar. Die Vorbehandlung von Pflanzenbiomasse mittels FAEs verbessert die Faser-Verdaulichkeit, die Bioverfügbarkeit und fördert so das Tierwachstum [91]. Eine weitere Anwendung stellt die Freisetzung von fermentierbaren Oligosacchariden unter Anwendung eines FAE-enthaltenden Enzymcocktails dar, um nachfolgend Bioethanol zu produzieren [112]. Auch hier ergibt sich der Vorteil des Einsatzes von FAEs, da als Nebenprodukt Hydroxycimtsäurederivate freigesetzt werden, welche ebenfalls wertvoll für eine weiterführende industrielle Verarbeitung sind. Als akzessorisches Enzym zeigte eine Chlorogensäureesterase mit FAE Nebenaktivität teigverändernde Eigenschaften, sodass FAEs auch als Backmittel eingesetzt werden können [99]. Darüber hinaus resultierte der Zusatz einer Typ C FAE aus *Talaromyces stipitatus* zum Teig in ein erhöhtes Brotvolumen und eine verbesserte Krumenweichheit und Krustenfarbe [113]. Neben den FAEs können auch die freigesetzten Hydroxycimtsäuren, wie bspw. Ferulasäure wirtschaftlich genutzt werden.

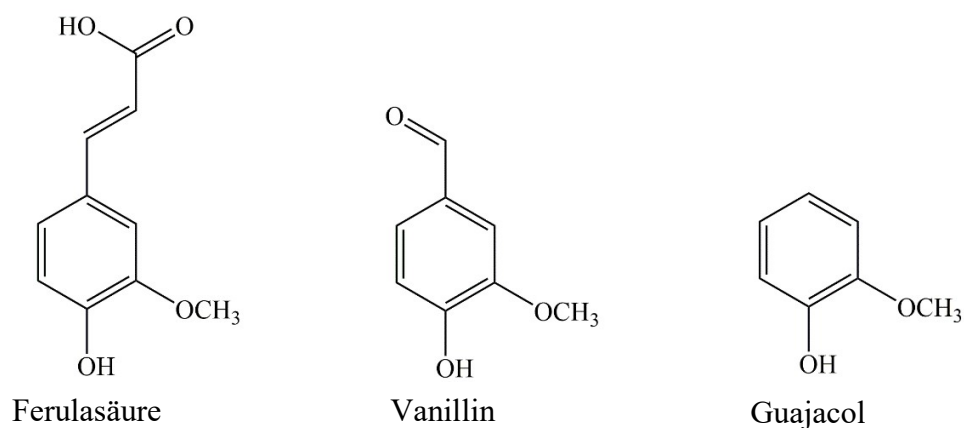


Abbildung 1.5: Ferulasäure als Aromavorstufe für Vanillin und Guajacol.

Zum einen fungiert FA als Antioxidans und wirkt so als Radikalfänger [114]. Zum anderen zeigt FA UV-absorbierende Eigenschaften, wonach die Säure als Additiv in Sonnencremes zugesetzt werden kann [115]. Als Tyrosinase-Inhibitor finden Hydroxyzimtsäure-Derivate Einsatz als Depigmentierungs-Agens, um der Bildung von Melanin vorzubeugen [116]. Für die Aromastoffindustrie ist FA als Aromavorstufe für Vanillin und Guajacol von Bedeutung (Abb. 1.5) [117, 118]. Zudem zeigt FA antimikrobielle, entzündungshemmende, anti-diabetische, anti-kanzerogene, anti-thrombotische und Cholesterin senkende Eigenschaften [91].

### 1.7. Ziele der Arbeit

Der Konsum von Backwaren und die Nachfrage nach neuen Produkten steigen stetig. Um den wirtschaftlichen, ökologischen sowie den qualitativen Anforderungen gerecht zu werden, wurden in der Vergangenheit Strategien entwickelt, welche das Hinzufügen von Backmitteln innerhalb des Backprozesses beinhaltet. Während chemische Additive teilweise von natürlichen enzymatischen Zusätzen abgelöst wurden, ist hier weiterhin ein großer Forschungsbedarf vorhanden, da Enzyme im Bereich der Substratspezifität und Selektivität, Nachhaltigkeit sowie der Kundenakzeptanz überlegen sind.

FAEs stellen aufgrund ihrer zahlreichen Anwendungspotentiale in der Pharma- und Lebensmittelindustrie eine bedeutsame Enzymklasse dar. Neben den bereits bekannten Einsatzgebieten und zahlreichen Publikationen wurden allerdings bisher nur sehr wenige FAEs mit einer Applikation in der Backindustrie beschrieben. Als akzessorisches Enzym hält diese Enzymklasse jedoch ein hohes Potential inne, um die Teigeigenschaften nachhaltig zu beeinflussen. In Vorarbeiten zeigte der Kulturüberstand aus *Streptomyces werraensis* eine hohe FAE-Aktivität, sodass es ein Ziel dieser Arbeit war, die FAE (SwFAED) aus dem Überstand zu reinigen und nachfolgend die Gensequenz zu identifizieren. Ferner sollte das Enzym auf molekularer sowie biochemischer Ebene charakterisiert werden. Um eine größere Menge des Proteins und eine leichte Zugänglichkeit zu gewährleisten, sollte das Enzym heterolog in *Escherichia coli* exprimiert werden. Abschließend galt es, den Einfluss der enzymatischen Aktivität auf das Weizengebäckvolumen zu untersuchen und zu evaluieren.

Ein weiterer Fokus dieser Arbeit lag auf der Produktion einer Prolyl-spezifischen Endopeptidase aus *Flammulina velutipes* (FvpP). Diese sollte prolinhaltige Peptide spalten können, da gesundheitliche Aspekte wie die Zöliakie oder andere Gluten-assoziierte Krankheiten die Backindustrie vor neue technologische Herausforderungen stellt, bei denen eine verstärkte individuelle Ernährungsweise der Konsumenten im Fokus steht. Vorherige biochemische Charakterisierungen zeigten ein breites Substratspektrum der Hydrolyse von komplexen prolinhaltigen Proteinen, welche stetig in der Lebensmittelindustrie verwendet werden.

Vor diesem Hintergrund konnte mittels Spaltstellenanalyse eines Zöliakie-Epitop-Polypeptids die potentielle industrielle Anwendung als Backmittel für die Gluten-Reduzierung bestätigt werden. Folglich sollte für das Enzym eine geeignete und neuartige Expressionsmethode entwickelt werden. Ferner sollten bioinformatische Analysen genutzt werden, um die Sequenzvergleiche zwischen der FvpP und anderen Prolyl-spezifischen Peptidasen durchzuführen.

## **2. Vorwort zur Publikation „A type D ferulic acid esterase from *Streptomyces werraensis* affects the volume of wheat dough pastries”**

Die Enzymklasse der FAEs besitzt aufgrund ihrer Fähigkeit, Esterbindungen in pflanzlichen Zellwandpolysacchariden zu hydrolysieren und somit Phenolsäuren freizusetzen, ein großes industrielles Potential [15]. Es ist erwiesen, dass Veränderungen von Nicht-Stärke-Polysacchariden in Mehlerzeugnissen einen Einfluss auf die Teigeigenschaften im Backprozess haben [21].

Umso erstaunlicher war es, dass zu Beginn dieser Forschungsarbeiten nur sehr wenige Publikationen über FAEs als Backmittel sowie deren Einfluss auf die Teigeigenschaften zu finden waren. Begründet ist dies in der limitierten Zugänglichkeit von FAEs, sodass nur sehr wenige FAEs auf dem Markt kommerziell erhältlich sind. Darüber hinaus stellt der Einsatz von Enzymen als Backmittel eine Alternative zu chemischen Additiven dar, da diese meist nicht mehr aktiv im finalen Produkt vorliegen und somit nicht als Zusatzstoff deklariert werden müssen.

Die nachfolgende Publikation beschreibt die Reinigungsstrategie einer FAE aus dem Kulturüberstand von *S. werraensis* (SwFAED) und die Generierung der isolierten FAE als aktives Enzym mittels des gewählten Expressionssystem pCOLD I DNA in *E. coli*. Hierbei konnte die Ausbeute an löslichem Protein mittels einer Co-Expression der Chaperone groES-groEL um den Faktor zwei erhöht werden. Folgend sollte das Enzym biochemisch sowie auf genetischer Ebene charakterisiert werden. Mit dem isolierten Enzym wurde ein umfassendes Substratscreening durchgeführt, wobei nicht nur artifizielle Zimtsäure- und Benzoesäureester-Derivate verwendet wurden, sondern ebenfalls natürlich feruloylierte Saccharide als Substrate dienten. Die publizierten Assays beschränken sich dagegen meist auf das synthetische Substrat Ferulasäuremethylester, da dieses kommerziell erhältlich ist. Um die potentielle biotechnologische Applikation des Enzyms in der Backindustrie zu untersuchen, wurden Backstudien in Hinblick auf eine Gebäckvolumenvergrößerung durchgeführt und anschließend bewertet.

Anteilig an diesem Forschungsprojekt waren Ann-Karolin Scheu und José L. Copa-Patiño, welche den Kulturüberstand von *S. werraensis* zur Verfügung gestellt haben. Ebenfalls waren David Thiesing und Lutz Popper beteiligt, welche die erforderlichen Backversuche durchführten. Annabel Nieter steuerte zu der Projektidee bei, sowie Ralf G. Berger, der als Arbeitsgruppenleiter für die finanziellen Mittel und die Betreuung im Rahmen der Promotion verantwortlich war.

### 3. A type D ferulic acid esterase from *Streptomyces werraensis* affects the volume of wheat dough pastries

Kathrin Schulz; Annabel Nieter; Ann-Karolin Scheu; José L. Copa-Patiño; David Thiesing, Lutz Popper; Ralf G. Berger

#### 3.1. Abstract

A type D ferulic acid esterase (FAE) was identified in the culture supernatant of *Streptomyces werraensis*, purified, sequenced, and heterologously produced in *E. coli* BL21(DE3)Star by co-expressing chaperones groES-groEL (69 U L<sup>-1</sup>). The unique enzyme with a mass of about 48 kDa showed no similarity to other FAEs, and only moderate homology (78.5 %) to a *Streptomyces*  $\beta$ -xylosidase. The purified reSwFAED exhibited a temperature optimum of 40 °C, a pH optimum in the range from pH seven to eight and a clear preference for bulky natural substrates, such as 5-O-*trans*-feruloyl-L-arabinofuranose (FA) and  $\beta$ -D-xylopyranosyl-(1→2)-5-O-*trans*-feruloyl-L-arabinofuranose (FAX), compared to the synthetic standard substrate methyl ferulate. Treatment of wheat dough with as little as 0.03 U or 0.3 U kg<sup>-1</sup> reSwFAED activity resulted in a significant increase of the bun volume (8.0 or 9.7 %, resp.) after baking when combined with polysaccharide degrading enzymes from *Aspergillus*. For the first time, the long-standing, but rarely proven positive effect of a FAE in baking was confirmed.

#### 3.2. Keywords

Ferulic acid esterase; baking; *Streptomyces werraensis*; heterologous expression

### 3.3. Introduction

Ferulic acid esterases (FAE, EC 3.1.1.73) constitute a subclass of carboxylic acid esterases, which release phenolic acids, such as ferulic acid (FA), from lignocellulosic plant biomass by hydrolyzing ester bonds between hydroxycinnamic acids and plant polysaccharides. Due to claimed anti-inflammatory, antioxidant, anticarcinogenic and UV absorbing activities, ferulic acid and its releasing enzyme FAE are of high interest to the cosmetic and pharmaceutical industry [114, 115, 119, 120]. Furthermore, FAEs may help valorizing side-streams of food processing, support bioethanol production and the preparation of animal feed [109, 112, 121, 122]. As a precursor of vanillin, FA and consequently FAEs are also of interest to the flavor industry [117]. Moreover, enzymatic dimerization of ferulic acid resulted in the formation of dehydrodiferulic acid, a precursor of bioactive lignans [123] which exhibit possible taste improving qualities in bitter foods, such as coffee and tea [124].

FAEs were also supposed to improve dough rheology when added as a supplement in the baking process [125]. Improvements in dough preparation comprise machinability, stability, flexibility and increased bun volume. Wheat flour, the main component of many bakery products, contains a variety of covalently conjugated polymers and polycondensates including lignin, pectin, cellulose and hemicelluloses, such as arabinoxylans. Arabinoxylan is a prime target of dough improvement and is composed of a soluble water-extractable (WE-AX) and insoluble water-unextractable arabinoxylan (WU-AX). Both contribute to the physicochemical properties of dough [16]. WU-AX has a high water-absorbing capacity; consequently, the cell wall material has an impact on the dough characteristics which can be modified by enzymatic degradation [126]. Arabinoxylans as heterogeneous macromolecules are ester or ether linked by phenolic acids, such as ferulic acid or *p*-coumaric acid and contribute to a complex polysaccharide network [14, 127]. To break down the network, degrading enzymes need to work synergistically. As an accessory enzyme, FAE plays a key role in enhancing the accessibility of main-chain- polysaccharides to degrading enzymes [13].

The treatment of dough with xylanase led to an increased bun volume and the formation of finer and more uniform crumbs [49]. However, xylanases are only capable of degrading the main chain of polysaccharides and cannot destruct phenolic acid linkages within the polysaccharide network. Thus, by breaking the cross-links of cell wall polysaccharides, FAEs might be useful in baking. In this study, the purification, heterologous expression and biochemical characterization of a ferulic acid esterase from *S. werraensis* (SwFAED) is described. Evidence for a synergistic interaction with polysaccharide degrading enzymes of the purified heterologous enzyme and a significant effect on bun volume is presented.

### 3.4. Material and Methods

#### 3.4.1. Chemicals, reagents and substrates

All chemicals used were purchased from Carl Roth (Karlsruhe, Germany), Merck (Darmstadt, Germany), Fluka (Buchs, Switzerland), or Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Germany), unless otherwise noted. Methyl and ethyl ferulates were obtained from Alfa Aesar (Karlsruhe, Germany). Methyl caffeate, *p*-coumarate, and sinapate were synthesized according to methods described by Borneman et al. [128]. Feruloylated saccharides [5-O-trans-feruloyl-L-arabinofuranose (F-A),  $\beta$ -D-xylopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)-5-O-trans-feruloyl-L-arabinofuranose (F-AX), and  $\alpha$ -L-galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-xylopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)-5-O-trans-feruloyl-L-arabinofuranose (F-AXG)], were prepared from de-starched corn bran as described previously [100, 129]. PCR primers were synthesized by Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Germany).

#### 3.4.2. Purification of the native SwFAED

Lyophilisate of *S. werraensis* strain UAH-SH (DSM 19007; DSMZ, Braunschweig, Germany) culture supernatant, pre-analyzed for FAE activity, was provided by J. L. Copa-Patiño and J. Soliveri (Universidad de Alcalá, Madrid, Spain). The crude lyophilisate was dissolved in 10 mM Tris/HCl buffer pH 8.5, and interfering proteins were separated by adding stepwise solid ammonium sulfate. Precipitated proteins were separated by centrifugation. After reaching a saturation of 60 % (w/v), the precipitates were re-suspended in 10 mM Tris/HCl pH 8.5 and analyzed for FAE activity. The active fraction was desalted by using an ultrafiltration module (10 kDa cut-off, PES; Sartorius, Göttingen, Germany). The sample was loaded onto a diethylaminoethyl (DEAE) sepharose fast-flow column (7  $\times$  25 mm, GE Healthcare, Buckinghamshire, England), previously equilibrated with buffer A (10 mM Tris/HCl buffer pH 8.5). The FAE was eluted with a step elution of 10 % buffer B (buffer A with 1 M NaCl). Active fractions were pooled, adjusted to 0.7 M ammonium sulfate and applied onto a butyl sepharose high performance column (7  $\times$  25 mm, GE Healthcare, Buckinghamshire, England), previously equilibrated with buffer C (50 mM Bis-Tris pH 7.0 with 0.7 M ammonium sulfate). Fractions were collected after gradient elution with buffer D (buffer C without ammonium sulfate) and analyzed for FAE activity. Fractions eluted with 69 to 93 % buffer D were loaded onto a sodium dodecyl sulfate (SDS)-polyacrylamide gel.



### 3.4.3. Measurement of FAE activity

The standard reaction mixture contained 25 µl of sample, 10 µl Tris buffer (500 mM, pH 7.5) and 65 µl of substrate (3 mM). Methyl ferulate was used as standard substrate. After incubation for one hour at 37 °C, the reaction was terminated by adding acetonitrile to reaction volume 1:1 (v/v). The release of the corresponding free acids was analyzed by high performance liquid chromatography (HPLC-UV/Vis) [130]. The hydrolysis of other benzoic and cinnamic acid ester derivatives as well as feruloylated saccharides was measured at the respective  $\lambda_{\max}$ . All measurements were performed in triplicates.

### 3.4.4. Denaturing SDS-PAGE

The molecular mass and purity of the enzyme was determined by SDS-PAGE using a 12 % polyacrylamide separation gel [40]. Samples were prepared by mixing protein solution and loading buffer (0.1 M Tris-HCl, pH 6.8, 0.2 M dithiothreitol, 4 % SDS, 20 % glycerol, 0.2 % bromophenol blue) and boiled for 10 min. Samples were applied on the gel, as well as a protein standard (BioRad, Munich, Germany). The protein electrophoresis was performed at 13 mA.

### 3.4.5. Peptide mass fingerprinting

Amino acid sequences of tryptic peptides of SwFAED were deduced by electrospray ionization-tandem mass spectrometry (ESI-MS/MS) using a maXis quadrupole time of flight (QTOF) mass spectrometer (Bruker, Bremen, Germany) [100]. Homology searches were performed with the obtained amino acid sequences using public software (NCBI BLAST, blastp program).

### 3.4.6. DNA isolation and amplification of the *swfaed* gene

*S. werraensis* cells were disrupted in breaking buffer (2 % Triton X 100, 1 % SDS, 100 mM NaCl, 10 mM Tris pH 8.0, 1 mM EDTA) using a precllys24 bead homogenizer (peqlab, Göttingen, Germany). Genomic DNA was isolated via phenol-chloroform-isoamyl alcohol precipitation and served as a template for amplification of the *swfaed* gene [131]. Amplification of the sequence was achieved by using untranslated-region (UTR) primers *swfaed\_for* (5' aaccctcctgtccaccacac 3') and *swfaed\_rev* (5' agtctgacggcaactctgagcat 3'), derived from the genome of *Streptomyces griseorubens* strain JSD-1. PCRs were performed using a standard protocol (Phusion High-Fidelity DNA polymerase, Thermo Scientific, St. Leon-Rot, Germany) and a thermocycler (pegSTAR 2X Gradient Thermocycler, Peqlab, Erlangen, Germany). The thermal cycler profile was as follows: Denaturation at 98 °C for one minute, 35 cycles at 98 °C

for 10 s, 57 °C for 30 s, at 72 °C for 1.5 min followed by a final extension step at 72 °C for 10 min. After product extraction from 1 % agarose gels using the NucleoSpin Extract II Kit (Macherey & Nagel, Düren, Germany), the appropriate insert fragment was ligated into a pUC57 vector (Thermo Scientific, St. Leon-Rot, Germany) previously linearized by the blunt end cutter *EcoRV*, using the T4 Ligase (Thermo Scientific, St. Leon-Rot, Germany). The plasmid DNA was propagated in *Escherichia coli* TOP10, isolated with a NucleoSpin Plasmid Kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany), and sequenced by SeqLab, Göttingen, Germany.

Subsequently, *swfaed* was re-amplified from pUC57-*swfaed*-construct using the primers *swfaedexp\_for* (5' atgcaggagctcatggccatgaacagcgct 3'), *swfaedexpwS\_for* (5' aatatagagctctcctcgetcgccccggc 3') and *swfaedexp\_rev* (5' gtaatgggatcctcagacgttgacgaggtcg 3') with and without internal signal sequence. Signal peptide was identified using SignalP4.0 [132]. The forward primers included a digestion site for *SacI*, the reverse primer contained a *BamHI* digestion site (underlined) to ligate the amplified DNA in frame with the N-terminal His-tag epitope of the vector. After purification of PCR fragments by gel electrophoresis and extraction from the gel, the DNA as well as the plasmid pCOLD I DNA were digested with *SacI* and *BamHI* (Thermo-Scientific, St. Leon-Rot, Germany). The ligation resulted in the expression vector pCOLD I DNA -*swfaed*, which was subsequently transformed into *E. coli* BL21(DE3)Star. The *E. coli* BL21(DE3)Star cells containing the empty pCOLD I DNA vector were propagated analogously and served as the negative control.

#### 3.4.7. Heterologous expression of the *swfaed* gene in *E. coli* and purification of the recombinant protein

SwFAED was produced heterologously in *E. coli* strain BL21(DE3)Star (Invitrogen, Karlsruhe, Germany) using the cold shock expression vector pCOLD I DNA (TaKaRa Mobitec, Göttingen, Germany). Additionally, different chaperons [*dnaK-dnaJ-grpE*; *groES-groEL*; *groES-groEL-tig*; *tig*; (TaKaRa Mobitec, Göttingen)] were co-expressed in the same strain. For expression, a shaking culture was inoculated from an overnight culture to an OD<sub>600</sub> 0.05 in LB-media with 50 µg mL<sup>-1</sup> ampicillin, 20 µg mL<sup>-1</sup> chloramphenicol and 1 mg mL<sup>-1</sup> arabinose or 5 ng mL<sup>-1</sup> tetracycline, respectively. The culture was incubated at 37 °C until ~OD<sub>600</sub> 0.5 was reached. 0.1 mM isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG) was added to the culture, and the cells were cultivated at 17 °C and 200 rpm for 20 h, harvested, re-suspended in 50 mM BisTris pH 7.0 prior homogenization by the precellys24 bead homogenizer (peqlab, Göttingen, Germany), and the cell debris separated from the lysate via centrifugation.

The purification of the recombinant protein was conducted via Ni-NTA. The lysate was incubated for one hour in binding buffer (0.5 M NaCl, 20 mM Tris pH 7.9 and 5 mM imidazole) at 4 °C while shaking. The sample was washed four times with increasing imidazole concentration up to 45 mM. After elution with 500 mM imidazole, the recombinant protein was desalted by using Sephadex G-25 Medium (GE healthcare, Freiburg, Germany). For further characterization, the samples were stored at -20 °C.

#### 3.4.8. Nucleotide sequence accession number

The sequence of SwFAED has been deposited in the GenBank database under accession no. LN871453.

#### 3.4.9. Biochemical characterization of recombinant SwFAED (reSwFAED)

##### 3.4.9.1. Determination of temperature and pH optimum and stability

All enzyme stabilities and optima were determined using the above method with the heterologous enzyme (cf. Measurement of FAE activity). ReSwFAED was incubated at different pH values: Glycine (pH 2.0 to 3.5; pH 9.0 to 9.5); acetate (pH 4.0 to 5.5); BisTris (pH 6.0 to 7.0); Tris (pH 7.5 to 8.5). For pH stability determination, 75 µl reSwFAED were incubated with 4.5 µl of 500 mM buffer solution at various pH at 37 °C for one hour. 20 µl of this reaction were mixed with 25 µl of 500 mM Tris buffer pH 7.5 and 60 µl of 3 mM substrate and incubated at 37 °C for one hour. The residual enzyme activity was analyzed. For temperature optimum determination, an activity assay was conducted at different incubation temperatures between 20 and 90 °C. Temperature stability was determined by incubating reSwFAED at different temperatures for one hour prior to activity assay. All enzyme incubations were carried out in a thermocycler (pegSTAR 2X Gradient Thermocycler, Peqlab, Erlangen, Germany) and carried out as triplicates. The activity assay was performed as described above (cf. Measurement of FAE activity).

##### 3.4.9.2. Substrate specificity and kinetic parameters

ReSwFAED substrate specificity was examined using the substrates listed in Table 3.1. To determine the kinetic constants, ferulic acid methyl ester, sinapinic acid methyl ester and F-A were used as substrates. ReSwFAED was incubated using different concentrations of substrate (0.01 mM, 0.015 mM, 0.03 mM, 0.1 mM, 0.15 mM, 0.3 mM, 1 mM, 1.5 mM and 3 mM). Kinetic constants were defined by SigmaPlot 12.5 (Systat Software Inc., Chicago, IL, USA). Blank experiments were carried out for all assays by using water instead of reSwFAED. All

reactions were carried out as triplicates. The activity assay was performed as described above (cf. Measurement of FAE activity).

#### 3.4.9.3. Release of diferulic acid from wheat bran

For the identification of diferulic acid release from wheat bran, 100  $\mu\text{l}$  of reSwFAED corresponding to 191 mU were incubated with 100  $\mu\text{l}$  of different xylanase mixtures [(*Trichoderma viride*, Fluka (Buchs, Switzerland), *Bacillus* spp., *Aspergillus niger* (Sternzym, Hamburg, Germany)], corresponding to one unit each, 100  $\mu\text{l}$  ddH<sub>2</sub>O, 100  $\mu\text{l}$  500 mM Tris buffer pH 7.5 and 20 mg wheat bran for 40 h at 37 °C and 650 rpm. The reaction was terminated by adding 400  $\mu\text{l}$  of acetonitrile. Blanks were carried out using water instead of reSwFAED. High performance liquid chromatography coupled to a triple quadrupole mass analyzer was used to detect diferulic acid (Varian 212 LC pump, Pro Star 325 UV-Vis detector, 320 TQ-MS mass spectrometer). The MS was operated simultaneously in the ESI positive and negative mode with a scan range of  $m/z$  110–500. The MS parameters for ESI(+)/ESI(–) were: capillary voltage +30 V/–60 V, needle voltage 5000 V/–4500 V, nebulizer gas (N<sub>2</sub>) 379 kPa, drying gas 207 kPa at 350 °C. For HPLC, water and acetonitrile (MS-grade), both containing 0.1 % formic acid, were used as the mobile phase, and a linear gradient was run: 10 % acetonitrile for three minutes, up to 90 % acetonitrile within 20 min, hold for 27 min and back to start conditions within 5 min. The separation was performed on an RP-18 HD column (Eurosphere 100-C18-5-HD, 250  $\times$  4 mm, 5  $\mu\text{m}$ , Macherey-Nagel) at a flow rate of 0.3 mL per minute.

#### 3.4.10. Influence of reSwFAED on dough volume

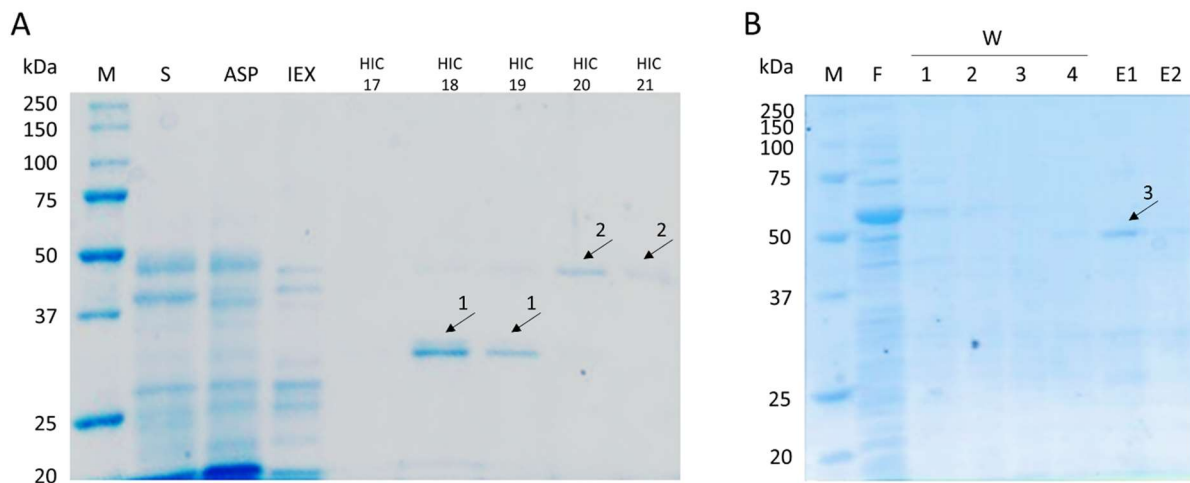
A dough consisting of 1 kg flour, 1.5 % instant yeast, 1.8 % salt, 1.5 % Biskin (sun flower oil, palm oil and palm kernel oil, partially hardened; Peter Kölln GmbH & Co. KGaA, Elmshorn, Germany), 40 ppm ascorbic acid, and 0.6 L water was prepared. Furthermore, 1955 U kg<sup>-1</sup> of  $\alpha$ -amylase from *Aspergillus oryzae* (Sternzym A 5070), 100 U kg<sup>-1</sup> of hemicellulase from *Aspergillus niger* with xylanase activity (Sternzym HC), and reSwFAED (0.03 U kg<sup>-1</sup>; 0.3 U kg<sup>-1</sup>; 3 U kg<sup>-1</sup>) respectively, were added to the mixture. The dough was kneaded for 2 min at 25 Hz and 6 min at 50 Hz using a spiral kneader (DIOSNA SP 12, DIOSNA Dierks & Söhne GmbH, Osnabrück, Germany). The dough was allowed to rest for 10 min and dough pieces with a mass of 250 g were placed onto a griddle and allowed to rest again for 20 min. Subsequently, the dough were placed in a fermentation chamber at 32 °C for 80 min then baked at 220 °C for 30 min. The bun volume was determined by rape seed displacement (AACC

standard 10-05.01) and the ratio volume/mass (specific volume) was calculated. Dough without reSwFAED addition served as a reference. All baking trials were performed in quadruple.

### 3.5. Results

#### 3.5.1. Purification of the native SwFAED and amplification of the *swfaed* gene

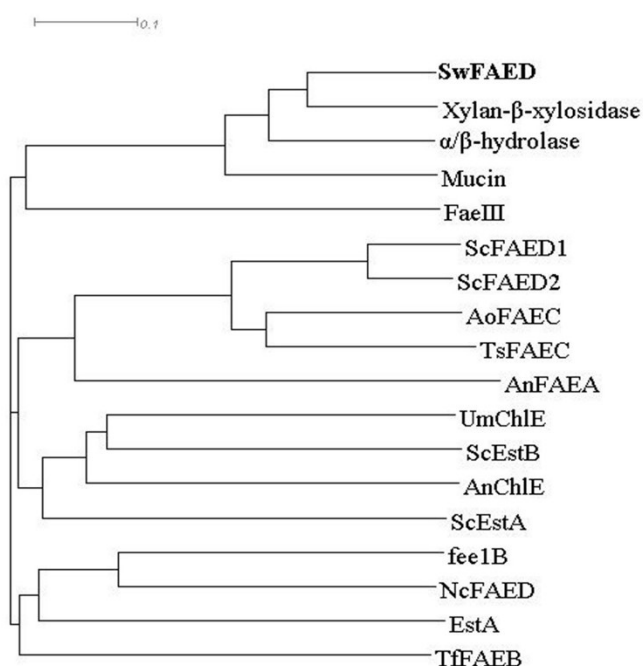
Three subsequent steps including ammonium sulfate precipitation (ASP), anion exchange- and hydrophobic interaction chromatography (HIC) achieved SwFAED purification from the crude lyophilisate of *S. werraensis* culture supernatant. The predicted molecular mass of SwFAED was 46.33 kDa (Expasy), a value typical of FAEs. Purification progress was monitored by denatured SDS-PAGE which showed two protein bands in three HIC fractions (69 to 93 % of buffer D) with molecular masses of about 29 kDa (arrow 1) and 48 kDa (arrow 2), respectively (Fig. 3.1 A).



**Figure 3.1 A) Purification of the native SwFAED.** Coomassie blue-stained SDS-PAGE gel. Lane S: *S. werraensis* culture supernatant. Lane ASP: *S. werraensis* culture supernatant after ammonium sulfate precipitation (60 % saturation). Lane IEX: FAE active fractions after ASP and anion exchange chromatography. Lane HIC 17-21: FAE active fractions after ASP, IEX and hydrophobic interaction chromatography. Lane M: Precision Plus Protein Unstained Standard (Bio-Rad). Arrow 1: 29 kDa SwFAED. Arrow 2: 48 kDa SwFAED. **B) Purification of the reSwFAED.** Coomassie blue stained SDS-PAGE gel. Lane F: Column flow through. Lanes W1 – W4: wash fractions; lane W1: 5 mM imidazole; lane W2: 15 mM imidazole; lane W3: 30 mM imidazole; lane W4: 45 mM imidazole. Lane E1: Fraction after elution with 500 mM imidazole. Lane E2: Fraction after second elution with 500 mM imidazole. Lane M: Precision Plus Protein Unstained Standard (Bio-Rad). Arrow 3: 50 kDa reSwFAED.

Both bands were identified as a hypothetical protein from *S. griseorubens* with putative conserved domains of the esterase-lipase superfamily. Parallel studies on the enzymes in *S. werraensis* culture supernatant showed the presence of active peptidases (data not shown). It was thus speculated that the smaller band at 29 kDa resulted from a partial degradation of the full-length enzyme during the work-up. Bioinformatic analyses revealed the characteristic G-

X-S-X-G motif of the serine esterase family which is typical of ferulic acid esterases [92]. Here, the conserved motif was represented by a G-H-S-L-G pentapeptide. The amino acid sequence showed only moderate similarity (78.5 %) and identity (71.1 %) to a  $\beta$ -xylosidase from *Streptomyces xiamenensis* and some  $\alpha/\beta$ -hydrolases and mucins, but no homology to any other FAE. The encoding gene sequence of a ferulic acid esterase of *S. werraensis* (accession no. LN871453) was identified. Moreover, a signal peptide of 30 amino acids was predicted using SignalP4.0 [132]. On the basis of amino acid sequences, a phylogenetic analysis were performed, using proteins with the highest found homology and other FAEs (Fig. 3.2).



**Figure 3.2: Phylogenetic analysis of SwFAED.** The phylogenetic tree constructed with Dendroscope (version 3.5.9.): Neighbour-joining method was used for phylogenetic analysis of 17 amino acid sequences, related to ferulic acid esterases and SwFAED. Xylan- $\beta$ -xylosidase from *Streptomyces xiamenensis* [AKG42034.1];  $\alpha/\beta$ -hydrolase from *Glycomyces tenuis* [WP\_026930788.1]; Mucin from *Streptomyces rapamycinicus* [AGP52122.1]; FaeIII from *Cellulosilyticum ruminicola* [JF414105.1]; ScFAED1 from *Schizophyllum commune* [CEP25530.1]; ScFAED2 from *Schizophyllum commune* [CEP25532.1]; AoFAEC from *Aspergillus oryzae* [XP\_001819091]; TsFAEC from *Talaromyces stipitatus* [CAD44531.1]; AnFAEA from *Aspergillus niger* [CAA70510.1]; UmChIE from *Ustilago maydis* [CDO67308.1]; ScEstB from *Streptomyces cinnamoneus* [AB921570.1]; AnChIE from *Aspergillus niger* [ABK62698.1]; ScEstA from *Streptomyces cinnamoneus* [AB921569.1]; fee1B from *Cellvibrio japonicus* [ACE85652.1]; NcFAED from *Neurospora crasse* [Q7RWX8]; EstA from *Piromyces equi* [Q9Y871.1]; TfFAEB from *Talaromyces funiculosus* [Q9HE18.1].

Pairwise alignment of FAEs showed no greater similarity than 30 %. All analyzed proteins can be grouped into three phyla, whereas only *Cellulosilyticum ruminicola* FaeIII was grouped in the same phylum as SwFAED (Fig. 3.2). Pairwise sequence alignment showed low similarity (24.7 %) and identity (14.1 %). Other type D FAEs branched on different phyla compared to

SwFAED. The type D FAE ScFaeD1 from *Schizophyllum commune* showed highest similarity (29 %) and identity (20.5 %) among the FAEs compared. Relatively low similarity to other FAEs underline the uniqueness of SwFAED.

### 3.5.2. Heterologous expression and purification of the SwFAED in *E. coli*

To express the *swfaed* gene in *E. coli* BL21(DE3)Star, the gene was cloned with and without the sequence encoding the native signal peptide into the expression vector pCOLD I DNA. A distinctive feature of the expression vector used was the low-temperature expression promoter  $P_{cspA}$  of *E. coli* which allowed the cultivation at lower temperatures, increasing the stability of the produced proteins. The vector coded for an N-terminal hexahistidine-tag. Expression was observed using *E. coli* BL21(DE3)Star cells containing the pCOLD I DNA-*swfaed* vector. Moreover, co-expression of different chaperons was performed for promoting the yield of soluble reSwFAED. Positive effects on solubility were found, for example, in the production of a valencene dioxygenase from *Pleurotus sapidus* [133]. After cultivation and cell lysis, the FAE activity, examined using methyl ferulate as substrate, was detected in the lysate indicating the successful expression of the *swfaed* gene. Variants with or without the signal sequence showed no differences in enzyme activity. Co-expression of *reswfaed* with groES-groEL chaperons resulted in a doubling of the FAE-activity compared to an expression without additional chaperons. No FAE activity was detected in negative controls. For further work, reSwFAED bearing the native signal sequence was used.

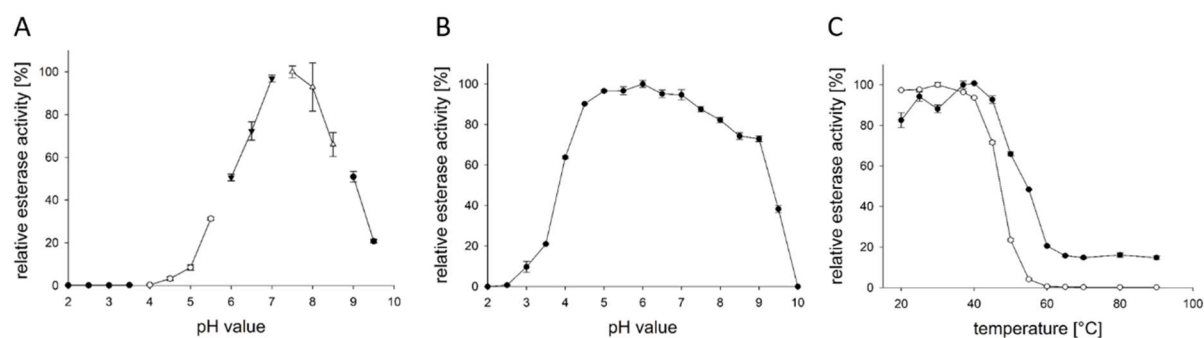
Measurement of the FAE after separation of reSwFAED showed some activity in the flow through and following washing steps, whereas the main activity was detected in the eluate. Subsequent denatured SDS-PAGE confirmed the purity of the target protein (Fig. 3.1 B). A single band at about 50 kDa (arrow 3) was detected in the elution fraction corresponding to the predicted molecular mass of His-tag fused reSwFAED of 48.7 kDa and was excised for mass spectrometric protein sequencing.

### 3.5.3. Biochemical characterization, substrate specificity and kinetic properties of reSwFAED

The reSwFAED enzyme showed highest hydrolytic activity at pH 7.5 (Fig. 3.3 A). A residual activity of 80 % was observed in a pH range of 7.0 to 8.0. Within a wide range of pH values from pH 6.0 to pH 9.0 more than 50 % residual activity was found. The pH stability of the enzyme was determined in a pH range from 4.5 to 8.0 with 80 % residual activity, using methyl ferulate as substrate (Fig. 3.3 B). Maximum enzyme activity was recorded at 40 °C (Fig. 3.3 C).

## A type D ferulic acid esterase from *Streptomyces werraensis* affects the volume of wheat dough pastries

The enzyme exhibited over 80 % residual activity within the temperature range from 20 to 45 °C, whereas temperatures above 45 °C decreased the activity strongly. After pre-incubation from 20 to 40 °C, reSwFAED retained 80 % of its activity, whereas the activity decreased rapidly above 40 °C (Fig. 3.3 C).



**Figure 3.3: Effect of pH and temperature on reSwFAED activity.** **A):** The pH optimum was determined using 50 mM glycine buffer (filled circles), 50 mM acetate buffer (open circle), 50 mM Bis-Tris buffer (filled triangle), and 50 mM Tris buffer (open triangle); **B):** pH stability; **C):** The temperature optimum (filled circles) and thermostability (open circles) was determined by incubating reSwFAED at different temperatures from 20 to 90 °C. Relative enzyme activity [%] is defined as the percentage of activity detected with respect to the maximum observed esterase activity in each experiment. Values are the averages of data from triplicate experiments, with standard deviations shown as error bars.

The substrate specificity of the purified reSwFAED was evaluated using a set of synthetic and natural substrates including benzoic and cinnamic acid ester as well as F-A, F-AX, F-AXG and chlorogenic acid. Among all natural substrates, F-A was hydrolyzed most efficiently (1.72 U mg<sup>-1</sup>) and set to 100 % (Table 3.1).

**Table 3.1: Substrate specificity of purified recombinant SwFAED.**

Substance	Relative esterase activity	Specific esterase activity
	[%] (SE)	[U mg <sup>-1</sup> ]
F-A	100 (0.36)	1.72
F-AX	75.29 (0.28)	1.29
F-AXG	66.37 (2.6)	1.14
Methyl sinapate	47.13 (1.04)	0.81
Methyl ferulate	36.28 (0.59)	0.62
Ethyl ferulate	14.39 (0.07)	0.25
Methyl <i>p</i> coumarate	8.7 (0.95)	0.15
Methyl cinnamate	7.35 (0.14)	0.13



A type D ferulic acid esterase from *Streptomyces werraensis* affects the volume of wheat dough pastries

Methyl caffeate	5.28 (0.11)	0.09
Ethyl cinnamate	1.13 (0.08)	0.02
Methyl benzoate	0.91 (0.13)	0.02
Methyl 4-hydroxy benzoate	0.82 (0.12)	0.01
Methyl 3-hydroxy benzoate	0.6 (0.13)	0.01
Propyl 4-hydroxy benzoate	0.34 (0.14)	0.01
Ethyl 4-hydroxy benzoate	0.25 (0.14)	0.01
Chlorogenic acid	ND	ND
Ethyl benzoate	ND	ND
Butyl 4-hydroxy benzoate	ND	ND
Methyl gallate	ND	ND
Methyl salicylate	ND	ND
Methyl vanillate	ND	ND
Ethyl vanillate	ND	ND

Purified reSwFAED was incubated with 1.95 mM of different substrates for one hour at 37 °C, in 50 mM Tris buffer pH 7.5. Relative enzyme activities were calculated based on the substances most preferred by reSwFAED, F-A, which was set to 100 %. Numbers in parentheses are estimated standard error. Abbreviations: F-A: 5-O-*trans*-feruloyl-L-arabinofuranose; F-AX:  $\beta$ -D-xylopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)-5-O-*trans*-feruloyl-L-arabinofuranose; F-AXG:  $\alpha$ -L-galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-xylopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)-5-O-*trans*-feruloyl-L-arabinofuranose; ND: Not detectable.

Comparing relative activities, the reSwFAED preferred bulky natural feruloylated saccharides over synthetic substrates. The enzyme hydrolyzed F-AX and F-AXG with a relative activity of 75.29 % and 66.37 %, respectively. Among all cinnamic acid ester derivatives, methyl sinapate was hydrolyzed most rapidly (47.13 %). The model substrates methyl ferulate, methyl *p*-coumarate and methyl caffeate were hydrolyzed with decreasing relative rate (Table 3.1). According to Crepin *et al.*, ferulic acid esterases may be grouped into four different subclasses due to the utilization of methyl ferulate, methyl sinapate, methyl-*p*-coumarate and methyl caffeate [85]. As the reSwFAED hydrolyzed all of the four substrates, the enzyme belonged to type C or D. To distinguish between both, the release of diferulic acid from de-starched wheat bran in the presence of xylanase was analyzed to confirm that reSwFAED released diferulic acid. The measurement showed that the reSwFAED activity decreased with increasing length of the alkyl chain of the ester function [ethyl ferulate (14.39 %), methyl and ethyl cinnamate (7.35 %, 1.13 %)]. Remarkably, reSwFAED showed a low activity on benzoate derivatives.

A type D ferulic acid esterase from *Streptomyces werraensis* affects the volume of wheat dough pastries

Chlorogenic acid, ethyl and butyl 4-hydroxy benzoate, methyl gallate, methyl salicylate, and methyl and ethyl vanillate were not accepted as substrates.

Kinetic constants were determined from initial hydrolysis rates of the most preferred synthetic substrates methyl ferulate, methyl sinapate, and the natural substrate FA (Table 3.2).

**Table 3.2: Kinetic constants of purified recombinant SwFAED.**

Substrate	$K_m$ [mM]	$k_{cat}$ [ $s^{-1}$ ]	$k_{cat}/K_m$ [ $mM^{-1}s^{-1}$ ]
Methyl ferulate	0.23	1.98	8.73
Methyl sinapate	0.12	0.89	7.67
FA	0.1	1.08	10.46

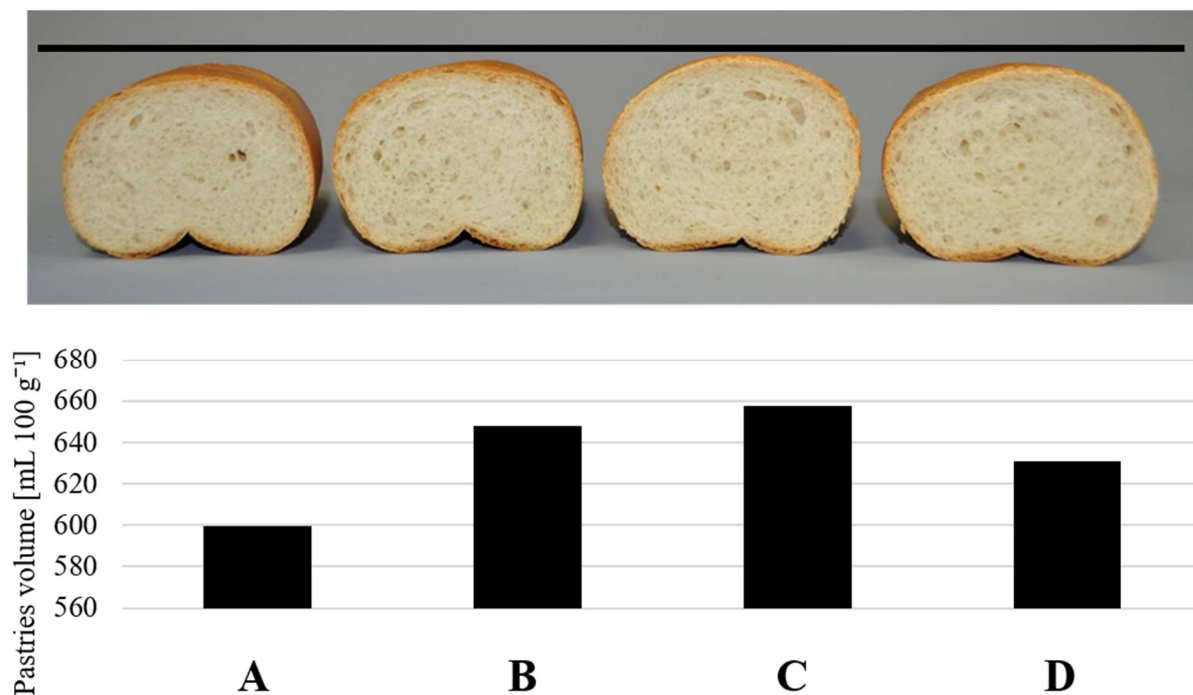
ReSwFAED was incubated using different concentrations of substrate (0.0065 mM, 0.00975 mM, 0.0195 mM, 0.065 mM, 0.0975 mM, 0.195 mM, 0.65 mM, 0.975 mM and 1.95 mM) for kinetic parameters determination. Abbreviations: F-A: 5-O-*trans*-feruloyl-L-arabinofuranose.

According to the  $K_m$  values the reSwFAED showed almost the same affinity to FA as to the most preferred synthetic substrate, methyl sinapate. The recombinant enzyme showed the highest affinity towards methyl sinapate as synthetic substrate, followed by methyl ferulate (methyl sinapate: 810 mU  $mg^{-1}$ ; methyl ferulate: 620 mU  $mg^{-1}$ ).

#### 3.5.4. Baking trials with reSwFAED

Xylanase addition was shown to affect dough development and bun volume in previous works [134, 135]. A synergistic interaction between ferulic acid esterases and xylanases in releasing ferulic acid from natural substrates was reported [136]. Ferulic acid release from de-starched wheat bran was enhanced, when both enzymes were incubated simultaneously in comparison to a separate incubation [98, 136]. Based on that, a synergistic collaboration of FAE and xylanase was supposed to be beneficial during the baking process.

A set of baking trials was performed to determine the effect of reSwFAED in combination with an  $\alpha$ -amylase and a hemicellulase with xylanase activity on bun volume. All added reSwFAED activities had a positive effect on bun volume, when the synergistic *Aspergillus* enzymes were present. Using 0.3 U  $kg^{-1}$  reSwFAED the pastries volume increased from 5.997 mL  $g^{-1}$  to 6.576 mL  $g^{-1}$ , a volume increase of 9.65 % compared to the blank sample (Fig. 3.4). When 0.03 U  $kg^{-1}$  and 3.0 U  $kg^{-1}$  were added to the dough, a somewhat smaller volume increase of 8.02 % and 5.19 %, respectively, occurred. Longer fermentation times did not lead to an additional volume increase (data not shown).



**Figure 3.4: Single and synergistic effect of reSwFAED and xylanase on bun volume.** A: Blank; No addition of reSwFAED. B: 0.03 U kg<sup>-1</sup> reSwFAED. C: 0.3 U kg<sup>-1</sup> reSwFAED. D: 3 U kg<sup>-1</sup> reSwFAED. To every sample 1955 U kg<sup>-1</sup> of  $\alpha$ -amylase and 100 U kg<sup>-1</sup> of hemicellulase with xylanase activity was added.

### 3.6. Discussion

A type D ferulic acid esterase from *S. werraensis* was purified to homogeneity, and the encoding gene sequence was identified. SwFAED was cloned with its native signal peptide into the expression vector pCOLDI DNA. The protein was successfully co-expressed with chaperon groES-groEL, purified and fully biochemically characterized.

The molecular mass determined for SwFAED by SDS-PAGE was 48 kDa and was similar to other type D FAE from *Piromyces equi* (55.5 kDa) and *S. commune* (54 kDa, 63 kDa) [137, 138]. Other type D ferulic acid esterase, such as NcFAED from *Neurospora crassa*, exhibited lower molecular masses of 32 kDa or even as low as 18.6 kDa [89, 139]. Among all FAEs, conserved amino acids were identified [92]. Here, the conserved motif was exposed in a G-H-S-L-G pentapeptide similar to type A FAEs of *Aspergillus spp.* [140]. However, other type D FAEs from *N. crassa*, *Sorangium cellulosum* and *S. commune* showed different peptides, such as G-F-S-Y-G, G-W-S-Y-G and G-C-S-T-G, respectively [89, 138, 141]. Pairwise sequence alignments among selected FAEs showed highest identity (20.5 %) and similarity (29 %) to *S. commune* ScFaeD1, but this enzyme is classified in another phylum than SwFAED. Type C or D FAEs show sequence similarity to chlorogenic acid esterase [15]. However, analyzed chlorogenic acid esterase from *U. maydis* and *A. niger* were grouped into a different sub branch

as SwFAED (Fig. 3.2). SwFAED showed homology only to a *S. xiamenensis*  $\beta$ -xylosidase and possessed no homology to any other FAE indicating a novel and unique sequence.

After co-expressing SwFAED in the heterologous host *E. coli*, the enzyme was purified and biochemically analyzed. The temperature and pH optima (40 °C and pH 7.5) of reSwFAED were in the range of other described FAEs and type D FAEs [138, 139, 141-143]. However, compared to most FAEs, exhibiting pH optima from 4.0 to 7.6, reSwFAED showed a relatively high pH optimum [15, 137]. FAE from *Clostridium stercorarium* showed a pH optimum of pH 8.0, and FaeII and FaeIII from *C. ruminicola* showed a pH optimum between pH 8.0 and 9.0 [144, 145]. Other type D FAEs from *Cellvibrio japonicas*, *Coptotermes formosanus*, *Rusa unicolor*, *S. cellulosum* and *S. commune* showed pH optima of 6.5, 7.0, 7.5 and the one from *Equus burchelli* of pH 8.0, respectively [138, 139, 141-143]. pH and temperature stability of reSwFAED (pH 4.5 to 8.0 and 20 to 40 °C) showed values similar to other FAE's thermal and pH stabilities. Higher pH stability of type D FAEs was only observed with the enzyme from *C. japonicus* in a pH range of 4.0 to 9.5 [143]. Moreover, other type D FAEs showed higher thermostability (until 45 °C), respectively [141, 143]. Only *S. cellulosum* type D FAE was stable up to a temperature of 55 °C [141]. The low temperature stability of reSwFAED may turn advantageous in industrial applications, because the enzyme activity will be reliably inactivated during the thermal (baking) process.

A substrate profile was recorded using a variety of natural and synthetic substrates. The reSwFAED hydrolyzed F-A best, and F-AX and F-AXG with a relative activity of 75.29 % and 66.37 %, respectively. This preference of F-AX after FA as natural substrate was in accordance with *A. oryzae* FAEs [146]. However, *S. commune* ScFaeDs activity decreased in the order of F-AX, F-AXG to F-A [138]. Due to ability of reSwFAED to release diferulic acid, the enzyme was identified as a type D FAE. Furthermore, it was shown that reSwFAED activity decreased by alkyl chain lengthening of the ester function in the substrate. In contrast, PeFaeA of *Pleurotus eryngii* and TsFaeC from *Talaromyces stipitatus* showed no or even an increasing impact of the alkyl chain length on FAE activity [88, 98]. Moreover, reSwFAED showed a low activity on benzoate derivatives. Again, an influence of the alkyl chain length of the ester function was found. Apart from ScFaeD1 and ScFaeD2, no other type D ferulic acid esterase showed activity on benzoate derivatives [138]. Also, a hydroxyl group in *para* or *meta*-position of the benzene ring was important; no enzyme activity was detected, if a hydroxyl group was present in *ortho* position (methyl salicylate). Similar results were reported for a type C ferulic acid esterase from *T. stipitatus* [88].

Four substrates were used for measuring kinetic constants of hydrolysis (Table 3.2). The  $K_m$  values determined displayed values within the range of other reported  $K_m$  data [15]. In contrast, the TsFAEC from *T. stipitatus* showed a  $K_m$  value of 0.04 mM, and FaeIII from *C. ruminicola* showed a value of 0.03 mM [88, 144]. Other type D FAEs from *S. cellulosum* showed the same (0.22 mM) or higher  $K_m$  values (0.74 mM) as reSwFAED, whereas reSwFAED exhibited a 20fold higher affinity for methyl ferulate than putative type D or C FAEs from *Streptomyces* species ( $K_m$ : 5 mM and 4.4 mM) [141, 147]. Potential type C/D FAE from *Streptomyces* species exhibited  $K_m$  values of 9.4 mM and 0.55 mM for methyl sinapate [147]. Regarding specific activities, reSwFAED exhibited 22 to 31fold higher specific activities than potential type D FAEs from *Streptomyces* species and type D FAEs from *C. japonicus* regarding methyl ferulate as a substrate [143, 147]. Even higher values were obtained analyzing methyl sinapate as substrate. 1.1 – 10.5 mU mg<sup>-1</sup> specific activity were detected for other type D or potential type D FAEs, which resulted in a 74 to 726 higher specific activity [143, 147]. In contrast, *S. cellulosum* showed 10 U mg<sup>-1</sup> specific activity for methyl sinapate as substrate [141]. Methyl ferulate hydrolysis efficiency of type D FAEs varied with  $k_{cat}/K_m$  values from 11 to 37 mM<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup> and methyl sinapate hydrolysis efficiency from 22 to 36 mM<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup>. For both substrates, hydrolysis was up to fivefold less efficient than with the type D FAE from *S. cellulosum* [141]. For application studies, the bun volume was assessed after treating dough with reSwFAED,  $\alpha$ -amylase and hemicellulase with xylanase activity in different concentrations. An increase of bun volume was observed, when a low activity of this type D FAE was added together with polysaccharide degrading enzymes, indicating a possible application of reSwFAED in baking. The increase of the bun volume was detected after adding low activities (0.3 U kg<sup>-1</sup>) to the dough while preparation, whereas the highest activity applied resulted in a beginning decrease of the pastries' volume. Comparable effects of a decreasing bun volume after passing through a maximum were also shown previously in baking trials using different xylanases [148, 149]. Similar results were reported using a type C ferulic acid esterase TsFaeC from *T. stipitatus*, whereas a chlorogenic acid esterase with a FAE side activity led to a decrease of the bun volume [99, 150]. Differences in baking trials are explained by the low homology of the amino acid sequence, as the pairwise sequence alignments indicated. Enhancement of pastry volume might be attributed to the synergistic collaboration of reSwFAED and xylanase in degrading the arabinoxylans. The TsFaeC was more specific for WEAX by releasing ferulic acid in combination with xylanase. Another reason for an increased bun volume after treatment with reSwFAED and polysaccharide degrading enzymes could be the conversion of WUAX into soluble AX. In contrast to WEAX, WUAX negatively affect the baking products, because they

adsorb water and impede the formation of the gluten network [16, 151]. The redistribution of water to other flour components in the course of the action of hydrolytic enzymes is not fully understood yet. Future baking trials may provide conclusive information about the applicability of the reSwFAED or other type D ferulic esterases in the processing of wheat dough. The non-existing homology to other FAEs and the positive effect on the bun volume underline the unique characteristics of the SwFAED.

### **3.7. Acknowledgments**

We thank Mirko Bunzel, Rachel Schendel and Daniel Wefers (KIT, Karlsruhe) for providing feruloylated saccharides. Furthermore, we thank Ulrich Krings for ESI-MS sequencing

#### **4. Vorwort zur Publikation “A prolyl endopeptidase from *Flammulina velutipes* for the possible degradation of celiac disease provoking toxic peptides in cereal proteins”**

Prolyl-spezifische Peptidasen sind im Hinblick auf ihre katalytische Aktivität für die Lebensmittelindustrie von großer Bedeutung. Mit dem Einsatz dieses Enzyms können Lebensmittel, welche einen hohen Prolinanteil aufweisen, nachhaltig modifiziert werden. Die Spaltung vor bzw. nach Prolinresten ist den PEPs vorbehalten, da die zyklische Struktur des Prolins Peptidolyse-Reaktionen stark verlangsamt. Eine kommerziell erhältliche PEP aus *A. niger* (An-Pep) wurde bereits für die Herstellung glutenfreier Backwaren und Entbitterungen von Lebensmitteln untersucht [68, 152]. Bis vor wenigen Jahren waren nur PEPs tierischen, pflanzlichen und bakteriellen Ursprungs bekannt. Erst in den letzten Jahren wurden einige pilzliche Enzyme identifiziert, wobei die isolierten PEPs aus Basidiomyceten eine Minderheit darstellen [55].

In Vorarbeiten wurde der Basidiomycet *F. velutipes* hinsichtlich der Sekretion von Peptidasen in den Kulturüberstand untersucht und eine Prolyl-spezifische Endopeptidase (FvpP) identifiziert. Obwohl das Enzym bis zur elektrophoretischen Reinheit isoliert wurde, konnte das Protein bis dato nicht aktiv heterolog produziert werden (Diss. L. Giesler, LUH 2014).

Eines der Ziele der nachfolgenden Publikation war die heterologe Expression der extrazellulären FvpP. Nachdem die Expression in *E. coli*, *Pichia pastoris* und den Basidiomyceten *Ustilago maydis* keinen Erfolg zeigte, wurde *A. oryzae* als effektives Expressionssystem ermittelt. Darüber hinaus sollte das Enzym auf molekularer sowie biochemischer Ebene charakterisiert werden. Mittels Spaltstellenanalysen sollten ferner die Applikation in der Backindustrie bezüglich des potentiellen Glutenhydrolysevermögens ermittelt werden, um so die Zöliakie-auslösenden Epitope aus Weizengluten zu reduzieren.

An diesem Forschungsprojekt beteiligt war Lucienne Giesler, welche die Reinigung und die biochemische Charakterisierung durchgeführt hat. Diana Linke war an der Projektidee beteiligt, sowie Ralf. G. Berger, der als Arbeitsgruppenleiter und im Rahmen der Promotion für die Betreuung und die Finanzierung verantwortlich war.

## 5. A prolyl endopeptidase from *Flammulina velutipes* for the possible degradation of celiac disease provoking cereal proteins

Kathrin Schulz\*; Lucienne Giesler, Diana Linke, Ralf G. Berger

### 5.1. Abstract

A prolyl endopeptidase, FvpP, was identified in the culture supernatant of the basidiomycete *Flammulina velutipes* and functionally expressed for gene verification in *Aspergillus oryzae*. The wild-type FvpP with a molecular mass of 50 kDa under denaturing conditions, exhibited optima at pH 5, and 45 °C and an isoelectric point of 3.8. Five mM Fe<sup>2+</sup> and Fe<sup>3+</sup> activated the prolyl endopeptidase, while it was not affected by 10 mM CaCl<sub>2</sub>, EDTA, and Pepstatin A. Five mM Cu<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup> and low Z-Pro-prolinal concentrations decreased the enzyme activity. Concluded from comparative RP-HPLC and high-resolution QTOF-MS/MS analyses of the hydrolytic cleavage products of gliadin, casein and gelatin, FvpP possessed a P1-P1'-substrate specificity similar to the prolyl endopeptidase from *Aspergillus niger* (An-Pep), although the sequence similarity was only 39 %. FvpP and An-Pep (S28.004; MEROPS) are unique in the serine peptidase family S28, because they share more sequence similarity with Pro-X carboxypeptidase (S28.001; MEROPS) and dipeptidyl peptidase II (S28.002; MEROPS) than with prolyl oligopeptidases of the serine peptidase family S09. As a potential degrader of the antigenic epitopes of  $\alpha$ -gliadin, FvpP might provide an efficient tool for the processing of wheat and other gluten containing cereals to better digestible foods for celiac patients.

### 5.2. Key words

Prolyl endopeptidase, S28 family, celiac disease, *Flammulina velutipes*, *Aspergillus oryzae*



### 5.3. Introduction

With an annual world production of around 750 million tons, wheat is grown on more agricultural area than any other food crop and is the main source of plant protein in human nutrition [153, 154]. Wheat is composed of 8-15 % protein, from which 85-90 % is gluten [5]. The unique viscoelastic and adhesive properties of gluten facilitate the production of porous bakery products. These are consumed as staple foods in many parts of the world and contribute to the “westernization” of the diet. Less obvious sources of gluten and gluten hydrolysates are convenience foods and cosmetics where they serve as stabilizing and binding agents [155].

Gluten, even if consumed only once a day, may trigger a lifelong autoimmune disorder, called celiac disease, from which one percent of the world’s population is supposed to suffer [5]. So far, celiac disease is treated by a strict gluten free diet, implying that those affected are strongly limited in their choice of food. The causative components of wheat gluten, the so-called gliadins, occur as a group of storage proteins ( $\alpha$ -/ $\beta$ -,  $\gamma$ - and  $\omega$ -forms distinguished by solubility) not only in wheat, but also in barley, rye, oats and spelt and show a high abundance of glutamyl and prolyl peptides [8]. Due to the particular cyclic structure of proline, most peptidases do not efficiently cleave the peptide bonds of proline-rich proteins, such as gluten, casein, collagen and gelatin [52]. As a result, the hydrolysis of food proteins remains not only incomplete, but may also lead to the release of stable, proline-rich bitter peptides [73]. To overcome these problems, enzymes able to hydrolyze proline-rich peptides might offer a new strategy for celiac disease therapy and bitterness reduction.

Prolyl-specific endopeptidases (EC 3.4.21.26) belong to the serine peptidase family and exhibit the unique property of hydrolyzing peptides at the carboxy terminus of internal proline residues [54]. The endopeptidases occur in a number of organisms, including bacteria, fungi and insects [55]. Peptides causing an inflammatory response were detoxified by the treatment with a prolyl endopeptidase from *Flavobacterium meningosepticum* [35]. A prolyl-specific endopeptidase was applied in brewing and in the debittering of casein hydrolysates [68]. Due to the long tradition in food fermentation processes, e.g. soy sauce, sake, miso, and shochu production, some strains of *Aspergillus* are generally recognized as safe and are thus attractive candidates for generating new prolyl endopeptidases. A prolyl endopeptidase from *Aspergillus niger* (An-Pep) belonging to peptidase family S28.004 showed a debittering effect on hydrolysates when incubated with  $\beta$ -casein [68]. Several studies confirmed that An-Pep efficiently degraded gluten *in vitro* under conditions similar to those present in the gastrointestinal tract indicating that co-administration of An-Pep with a gluten-containing meal might help reducing gluten toxicity

[152]. *Aspergillus oryzae* was noted to produce a prolyl endopeptidase with a high affinity to longer peptides compared to Ala-Pro-pNA and hydrolyzing intact casein [156].

Edible basidiomycetes (mushrooms) are another potent source of prolyl endopeptidases. *Agaricus bisporus* and *Coprinopsis clastophylla* secreted extracellular prolyl endopeptidases in liquid culture [157, 158]. During the screening of prolyl-specific peptidase-producing organisms, *Flammulina velutipes* emerged as a promising candidate [159]. The aim of this study was to purify this novel extracellular prolyl-specific endopeptidase (FvpP) from a submerged culture, identify the gene sequence and verify the presumed catalytic activity by heterologous expression in *A. oryzae*. A further target, was to biochemically characterize and to compare properties and applicability with the commercially available standard enzyme An-Pep.

## 5.4. Materials and methods

### 5.4.1. Chemicals and reagents

All chemicals used were purchased from Carl Roth (Karlsruhe, Germany), Merck (Darmstadt, Germany), Fluka (Buchs, Switzerland), or Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Germany), unless otherwise noted. An-Pep was purchased from DSM, (Delft, Netherlands).

### 5.4.2. Cultivation of fungal strains and *Escherichia coli*

Cultivation of *F. velutipes* was carried out in shaking-flasks (250 mL) at 24 °C and 150 rpm as described before [160]. For plasmid replication, *E. coli* strain TOP10 was grown in 10 mL LB medium with ampicillin (50 µg mL<sup>-1</sup>) overnight at 37 °C and 200 rpm. The gene sequence *fvpp* was heterologously expressed in *A. oryzae* strain NSAR1 (genotype *niaD*<sup>-</sup>, *sC*<sup>-</sup>,  $\Delta$  *argB*, *adeA*<sup>-</sup>) and maintained on DPY-agar (2 % dextrin from potato starch, 1 % polypeptone, 0.5 % yeast extract, 0.5 % KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.05 % MgSO<sub>4</sub>, 2.5 % agar)[161]. For transformation, *A. oryzae* was inoculated in 50 mL GN media (2 % glucose, 0.43 % meat peptone, 0.43 % casein peptone, 0.64 % sodium chloride, pH 7.3) overnight at 28 °C and 150 rpm. After transformation, *A. oryzae* strain was grown on CZD/S media (3.5 % Czapek Dox broth, 1 M sorbitol, 0.05 % adenine, 0.15 % methionine, 0.1 % ammonium sulfate, 1.5 % agar, pH 7.3). For *fvpp* expression, *A. oryzae* was grown in 150 mL CMP media (3.5 % Czapek Dox broth, 2 % maltose, 1 % polypeptone).

#### 5.4.3. Peptidase activity

Proline-specific peptidolytic activity was measured as follows: 120  $\mu\text{L}$  of 25 mM sodium acetate buffer pH 5.5, 10  $\mu\text{L}$  benzyloxycarbonyl-glycine-proline-*para*-nitroanilide (Z-Gly-Pro-pNA; 2 mM in dimethyl sulfoxide) and 20  $\mu\text{L}$  enzyme preparation. The molar extinction coefficient of *para*-nitroaniline was determined at  $\epsilon^* = 4,567 \mu\text{L} \mu\text{M}^{-1}$  at 405 nm in a BioTek Synergy 2<sup>TM</sup> microtiter plate reader (Bad Friedrichshall, Germany). The absorption was measured at 37 °C and 405 nm for 90 min. Blanks were prepared with water instead of the enzyme solution; inactivated enzyme solution was turbid. One unit of peptidolytic activity was calculated as the concentration of enzyme required to produce 1  $\mu\text{M}$  *para*-nitroaniline per minute. One katal implies 1 mol s<sup>-1</sup> substrate conversion. For visualization of the peptidolytic activity, zymography after native polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) was performed with an incubation time of 17 h at 37 °C in 25 mM sodium acetate buffer, pH 5, with 0.3 % gelatin co-polymerized into the gel [162].

#### 5.4.4. Purification of the wild-type FvpP

The *F. velutipes* culture supernatant was harvested after seven days at the time of maximal activity and concentrated using an ultrafiltration module (3 kDa cut-off, PES; Sartorius, Göttingen, Germany). The purification was performed by preparative PAGE (model 491 Prep Cell Biorad; Hercules, United States). Three milliliter of the concentrated sample were mixed with three milliliter of sample buffer (0.1 M Tris/HCl; pH 6.8, 4 % SDS, 20 % glycerol, 0.2 % bromophenol blue) and separated on a 12 % gel (8.2 cm<sup>2</sup> gel surface area), at 12 W constant power, 4 °C with a flow rate of 0.8 mL min<sup>-1</sup> of 25 mM sodium acetate buffer pH 5.5, as elution buffer for 10 h. Active fractions were collected, concentrated (MWCO 3 kDa) and pooled (Table 5.1).

#### 5.4.5. Denaturing SDS-PAGE

The molecular mass and purity of the enzyme was determined by SDS-PAGE using a 12 % polyacrylamide separation gel [163]. Samples were prepared by mixing protein solution and loading buffer (0.1 M Tris-HCl, pH 6.8, 0.2 M dithiothreitol, 4 % SDS, 20 % glycerol, 0.2 % bromophenol blue) and boiled for ten minutes. Electrophoresis was performed at 13 mA. For determination of molecular mass, a protein standard (Precision Plus Protein Standards Dual Color and unstained; BioRad, Munich, Germany) was used.

#### 5.4.6. Peptide mass fingerprinting

The purified protein band of FvpP was excised from SDS polyacrylamide gel, dried, consecutively incubated with dithiothreitol and iodine acetamide, and finally digested with trypsin (sequencing grade modified trypsin; Promega, Madison, WI, USA). The peptides of FvpP were deduced by electrospray ionization tandem mass spectrometry (ESI-MS/MS) using a maXis quadrupole time-of-flight (QTOF) mass spectrometer (Bruker, Bremen, Germany) as described previously [164].

#### 5.4.7. cDNA synthesis and amplification of *fvpp* gene

RNA was prepared from mycelium using the NucleoSpin<sup>®</sup> RNA Plant Kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany). cDNA synthesis was performed as described [164]. For amplification, degenerated primers were designed from peptide sequences identified by ESI-MS/MS and a standard PCR protocol was performed using the Dream<sup>™</sup>TaqDNA Polymerase (Thermo Scientific, St. Leon-Rot, Germany). For the 5' - and 3'-RACE a modified protocol was used and the template-switch oligo for the 5' RACE was synthesized [165, 166]. Once the complete sequence was assembled, specific primers were designed for the amplification of the whole *fvpp* gene sequence (SM. 1; fvpP\_for; fvpP\_rev). The partial and the whole sequences were cloned into a pUC57 vector [163]. For gene expression, *fvpp* gene sequence (Accession no. LN999508) was cloned via exponential megaprimer polymerase chain reaction (EMP) into the *A. oryzae* expression vector pTAex3, using specific primer (SM. 1; fvpP\_emp\_for; fvpP\_emp\_rev). All PCRs were performed using a standard protocol (Phusion High-Fidelity DNA polymerase, Thermo Scientific, St. Leon-Rot, Germany) and a thermocycler (pegSTAR 2X Gradient Thermocycler, Peqlab, Erlangen, Germany). The thermal cycler profile was as follows: denaturation at 98 °C for one minute, 35 cycles at 98 °C for 10 s, 65 °C for 30 s, at 72 °C for one minute followed by a final extension step at 72 °C for 10 min. An insert fragment with appropriate length was extracted from 1 % agarose gels using the NucleoSpin Extract II Kit (Macherey & Nagel, Düren, Germany). The amplified product was used in a second PCR reaction as a megaprimer and specific primer (SM. 1; pTAex3) to amplify the target vector construct pTAex3\_FvpP. For the reaction 250 ng megaprimer and 50 ng of pTAex3 vector was used and the cycler profile was as follows: denaturation at 98 °C for five minutes, 30 cycles at 98 °C for 30 s, 60 °C for 30 s, 72 °C for 4.5 min followed by a final extension step at 72 °C for ten minutes. To remove the template vector, 1 µl *DpnI* restriction enzyme (Thermo Scientific, St. Leon-Rot, Germany) was added to the PCR reaction product and incubated for 45 min at 37 °C. The reaction mixture was heat shock inactivated at 80 °C for five minutes. The vector

## A prolyl endopeptidase from *Flammulina velutipes* for the possible degradation of celiac disease provoking cereal proteins

---

was extracted from 1 % agarose gels using the NucleoSpin Extract II Kit (Macherey & Nagel, Düren, Germany). For the phosphorylation reaction 10 U (167 nkat) of T4 polynucleotide kinase (Thermo Scientific, St. Leon-Rot, Germany), 2 µl adenosine triphosphate (ATP; 10 mM) and 2 µl buffer A (Thermo Scientific, St. Leon-Rot, Germany) were added to constructed vector mixture in a total reaction volume of 20 µl. The reaction was incubated at 37 °C for one hour. The phosphorylated vector was ligated overnight at 8 °C using the T4 ligase (Thermo Scientific, St. Leon-Rot, Germany) after adding 2 µl ATP to the reaction mixture. The plasmid DNA was propagated in *E. coli* TOP10, isolated with a NucleoSpin Plasmid Kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany) and sequenced by SeqLab, Göttingen, Germany.

### 5.4.8. Transformation of *A. oryzae* and production of recombinant FvpP (reFvpP) for gene verification

*A. oryzae* spores were inoculated in GN media overnight at 28 °C and 150 rpm, and the mycelium was collected by filtration (Miracloth, Merck, Darmstadt, Germany). Protoplasts were prepared with lysing enzymes from *Trichoderma harzianum* (Sigma Aldrich; 15 mg mL<sup>-1</sup> in 0.8 M NaCl) and were shaken for three hours at 50 rpm at room temperature. Protoplast pellets were separated from conidia by filtration and centrifuged at 3000 xg for five minutes. Pellets were re-suspended in solution 1 (0.8 M NaCl, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 50 mM Tris-HCl, pH 7.5) and mixed with 10 µg of pTAex3\_FvpP and an empty pTAex3 vector as negative control respectively, and incubated for 20 min on ice. Four times 250 µl of solution 2 (60 % polyethylene glycol 3500 (w/v), 0.8 M NaCl, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 50 mM Tris-HCl, pH 7.5) were added drop by drop to the reaction mixture and incubated for 20 min at room temperature. Five milliliters of fluent CZD/S media (supplemented with 0.8 % agar) was added to transformation reaction, plated on CZD/S plates which were incubated at 28 °C for four days. Single clones were transferred onto fresh CZD/S plates and incubated at 28 °C for four days again. Colonies were inoculated onto DPY plates and incubated at 28 °C until a sizeable culture was visible. For *fvpP* expression, transformed *A. oryzae* were inoculated in 150 mL CMP media and incubated at 28 °C for six days at 150 rpm. The addition of 2 % maltose to the medium induced the *amyB* promotor on the plasmid. Samples of the culture supernatant were collected daily and analyzed for FvpP activity.

#### 5.4.9. Activity gel staining

Recombinant prolyl-specific activity was determined by gel staining according to Božić with some modifications [167]. Samples were prepared by adding sample buffer 1:1 (v/v) (0.05 M Tris/HCl; pH 6.8, 2 % SDS, 10 % glycerol and 0.1 % bromophenol blue). A semi native PAGE (12 %) was performed at 10 mA at 8 °C. Gel was washed with water and with 2.5 % Triton X-100 twice before equilibrating with 25 mM sodium acetate pH 5.5. For substrate turnover, the gel was incubated in 0.13 mM Z-Gly-Pro-pNA, dissolved in 25 mM sodium acetate pH 5.5 for one hour at 37 °C. The gel was washed with water and incubated in 0.1 % (w/v) sodium nitrite, dissolved in 1 M HCl for two minutes at room temperature. To remove NaNO<sub>2</sub>, the gel was immersed in 1 % (w/v) urea and afterwards in 0.025 % (w/v) 1-naphthylamine solved in 22 % (v/v) ethanol. Active enzyme appeared as a broad pink band as a result of the extended incubation time.

#### 5.4.10. Biochemical characterization

Because of its ample availability the purified wild type enzyme was used for further characterization. For pH and temperature optimum Z-Gly-Pro-pNA was used as standard substrate. Determination of the pH optimum was carried out using Britton-Robinson buffer (40 mM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>; 40 mM H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>; 40 mM CH<sub>3</sub>COOH; 20 mM NaOH to adjust pH; ranging from pH 3 to 9.5). Temperature optimum was investigated in 5 °C intervals between 20 °C and 50 °C. Thermal stability was examined by incubating the enzyme preparation for 20 h at 4 °C, 25 °C and 45 °C in 25 mM sodium acetate buffer pH 5.

Inhibition studies examined various metal ions, solvents and inhibitors, as listed in Table 5.2. Reagents were added to the FvpP or to commercial An-Pep (DSM, Delft, Netherlands), each 0.1 U mL<sup>-1</sup> (1.67 nkat mL<sup>-1</sup>), incubated for 10 min at 37 °C followed by enzyme assay under standard conditions at pH and thermal optima. Enzyme activities were expressed as relative values (%), and the sample without any metal ion or reagent was used as the control (100 %). To determine the kinetic constants of the purified wild type enzyme, FvpP was incubated under optimal assay conditions using Z-Gly-Pro-pNA as a substrate in the range of 0.3-1.3 mM. The kinetic constants were evaluated by SigmaPlot 10.0 (Systat Software Inc., Chicago, IL, USA). Isoelectric focusing was performed as described in Linke *et al.* [164]. Biochemical characterization was performed using the wild-type enzyme.

#### 5.4.11. Hydrolysis of chromogenic substrates

The purified wild type FvpP and the commercial An-Pep were tested against different chromogenic peptide substrates (*N*-Succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-*p*NA, *N*-Succinyl-Gly-Gly-Leu-*p*NA, Ala-*p*NA and Leu-*p*NA; 2 mM; dissolved in DMSO). The activity assay was performed as described above (cf. Peptidase activity). Experiments were carried out using the wild-type FvpP.

#### 5.4.12. Hydrolysis of natural substrates and analysis of the products

Hydrolysis experiments were carried out with short peptides, e.g. Arg-Pro, Pro-Gly-Leu (Bachem, Bubendorf, Switzerland), oxidized insulin chain B, Angiotensin I (Ang I) and dry sterilized (130-135 °C, 8 h) wheat gluten, gliadin, myoglobin or  $\beta$ -casein (10 g L<sup>-1</sup>) over 20 h at 800 rpm, 45 °C and pH 5 in 25 mM sodium acetate buffer with either wild type FvpP or An-Pep. The enzyme reaction was stopped by addition of 1 M acetic acid. The products of hydrolysis of oxidized insulin chain B, Arg-Pro, Pro-Gly-Leu, gliadin and  $\beta$ -casein were measured by reverse high performance liquid chromatography (RP-HPLC) using a Nucleodur C18 ec column (250 x 4 mm, 5  $\mu$ m, Macherey-Nagel, Düren, Germany) and following gradient system at 35 °C with 0.1 % trifluoroacetic acid in water (A) and 0.1 % trifluoroacetic acid in acetonitrile (B): 0-3 min 5 % B, 3-10 min 30 % B, 10-35 min 100 % B, 35-40 min 100 % B, 40-45 min 5 % B and 45-50 min 5 % B at a flow rate of 1 mL min<sup>-1</sup> detection at 220 nm, followed by amino acid analysis to predict the cleavage sites [160]. The hydrolysis of angiotensin I was detected by RP-HPLC coupled with mass spectrometry (MS) with electrospray ionization (ESI) source using a Nucleodur Pyramid C18 column (250 x 4 mm, 5  $\mu$ m, Macherey-Nagel, Dueren, Germany) under the following conditions: injection volume 10  $\mu$ L, column temperature 40 °C, flow rate 0.3 mL min<sup>-1</sup>, solvent A was 0.1 % formic acid in water and B 0.1 % formic acid in acetonitrile. The following linear gradient was applied: 0-7 min 4 % B, 7-15 min 20 % B, 20-22 min 100 % B, 22-25 min 4 % B and 25-30 min 4 % B. Absorbance was measured at 220 and 280 nm. Positive mode electrospray ionization was performed using a capillary temperature of 320 °C, a source voltage of 4.5 kV, a capillary voltage of 40 eV, and a maximum injection time of 30 ms. Full-scan mass spectra were acquired in the *m/z* range of 100-1000 Da at a frequency of one spectrum every second. Targeted MS/MS analysis was performed using a relative collision energy of 25 eV. The separation of intact proteins of the  $\alpha$ -gliadin, gluten and  $\beta$ -casein hydrolysate was carried out with RP-HPLC using a Aeris Widepore C4 column, 150 x 4.6 mm, 3.6  $\mu$ m (Phenomenex, Aschaffenburg, Germany) using the following gradient system at 35 °C with 0.1 % trifluoroacetic acid in water (A) and

A prolyl endopeptidase from *Flammulina velutipes* for the possible degradation of celiac disease provoking cereal proteins

---

0.1 % trifluoroacetic acid in acetonitrile (B): 0-3 min 3 % B, 3-23 min 65 % B, 23-25 min 100 % B, 25-28 min 100 % B, 28-30 min 3 % B and 30-35 min 3 % B at a flow rate of 1.2 mL min<sup>-1</sup> and detection at 220 and 280 nm. Hydrolysis experiments were performed with the wild-type enzyme.

#### 5.4.13. Statistical analysis

All data presented are averages of duplicate measurements. Numerous experiments were conducted and single parameters, such as enzyme activity, were changed to distinguish critical from insignificant factors; for the bulk of these measurements the standard deviation of repetitions was typically below 5 %.

### 5.5. Results and discussion

#### 5.5.1. Purification of the wild-type extracellular prolyl endopeptidase FvpP

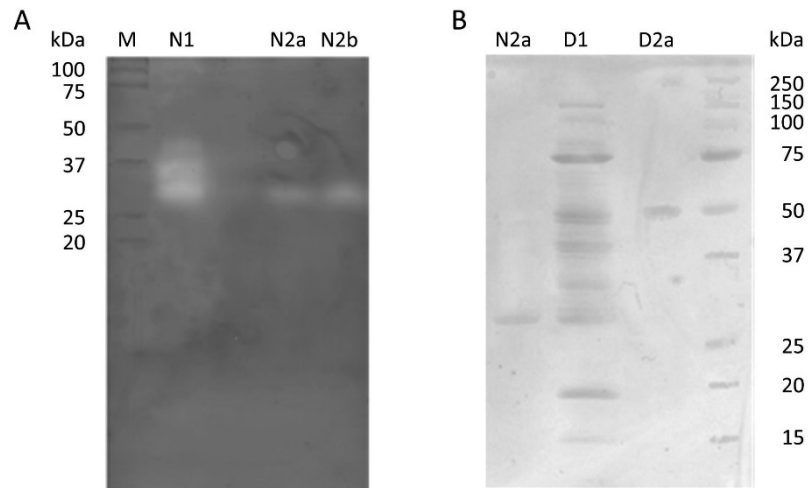
Submerged cultivation of *F. velutipes* in minimal medium supplemented with 4 % wheat gluten resulted in a visible solubility of gluten. Zymography of the supernatant of *F. velutipes* showed major bands at around 27, 32-37 and 50 kDa [159]. A peptidase activity of 1.2 U L<sup>-1</sup> (20 nkat L<sup>-1</sup>) was found after seven days of cultivation. The prolyl-specific peptidase, called FvpP, was separated from other interfering proteins by a two-step purification from the concentrated culture supernatant (Table 5.1).

**Table 5.1: Purification table of wild type FvpP.**

Purification step	Volume [mL]	Total activity [U/mkat]	Protein concentration [mg mL <sup>-1</sup> ]	Specific Activity [U/mkat mg <sup>-1</sup> ]	Purification	Yield [%]
Supernatant	2.0	1.6/2.67	9.2	0.1/1.67	1.0	100.0
Fraction 56-62	7.0	0.6/1	0.03	3.1/5.17	35.7	40.7
Ultrafiltration (3 kDa)	5.0	1.4/2.34	0.1	5.5/9.17	63.3	82.9

First, the enzyme was partially purified by preparative gel electrophoresis over 10 h; fractions 56-62 showed prolyl-specific activity. Subsequently, the fractions were pooled and ultrafiltered using a 3 kDa cut-off membrane. FvpP, was purified 63-fold in 83 % yield from the concentrated *F. velutipes* supernatant. The molecular mass of denatured FvpP was determined by SDS-PAGE to 50 kDa (Fig. 5.1).





**Figure 5. 1: Zymography (A) and SDS-PAGE (B) of the purified wild type FvpP from *Flammulina velutipes*.**

Lane M: Precision Plus Protein Unstained Standard (Bio-Rad); N: Native sample; D: Denatured sample; 1: *Flammulina velutipes* supernatant; 2a: Purified after preparative PAGE and ultrafiltration. FvpP fraction 56; 2b: Purified after preparative PAGE and ultrafiltration. FvpP fraction 62.

Not considering the signal peptide, which will be cleaved off while secretion, the molecular mass of denatured FvpP corresponded to the predicted molecular mass of 56 kDa (ExpASY). Subsequent zymography resulted also in a single protein band at 27 kDa, which was in accordance with the intact native protein band after native SDS-PAGE (Fig. 5.1). Since native SDS-PAGE is not suitable for protein mass prediction, no indication can be given at this point, why the denatured and native protein masses differed under these conditions. Denatured FvpP showed a molecular mass similar to other prolyl-specific peptidases [55]. The peptidase from *Aeromonas caviae* showed a molecular mass of 29.5 kDa and the S9 family peptidase from *Bacillus tequilensis* one of 29 kDa [55, 168].

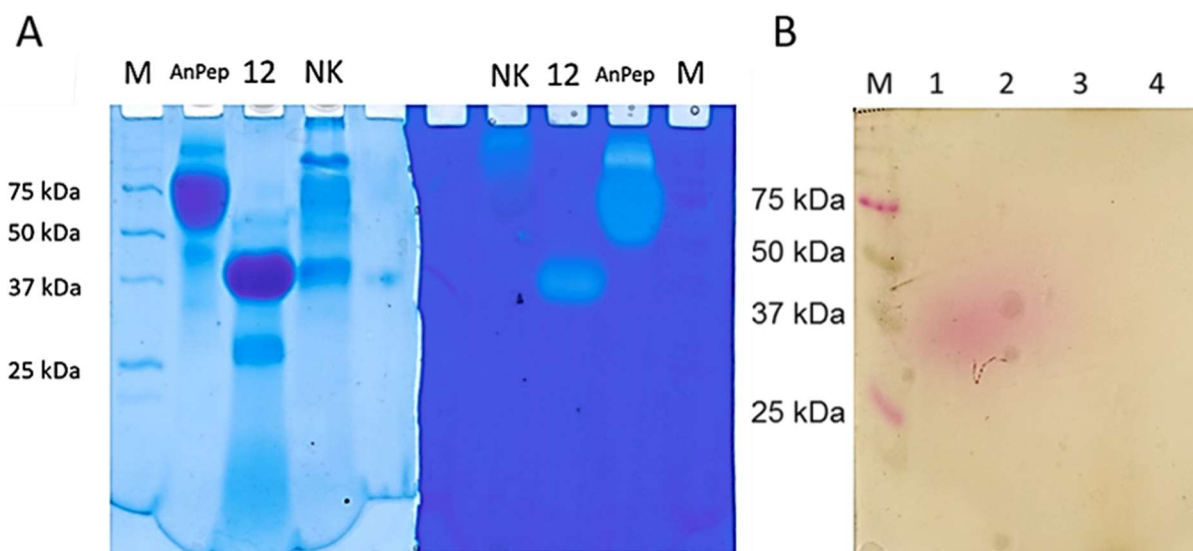
### 5.5.2. Identification of the *fvpp* gene sequence and verification of FvpP activity

After purification, electrospray ionization tandem mass spectrometry identified three tryptic peptides (KATFGLSDVTHLDDAAGALRN, WILVGGSSYSGA and RLVNVETNYDARQ) of the protein band excised from the denaturing SDS-PAGE gel. Bioinformatic analysis (NCBI Blast, program blastp) identified the enzyme as a member of the S28 peptidase family like An-Pep (S28.004; MEROPS). Most frequent and best ranked hits were a peptidase S28 from the corticioid basidiomycete *Cylindrobasidium torrendii* (order: *Agaricales*; Accession no.: KIIY73984.1) and from *Armillaria gallica* (a species of honey mushrooms of the same order; Accession no.: PBL00389.1).

For gene identification and to verify the supposed endopeptidase activity, RNA was isolated

from *F. velutipes*, the presumed *fvpp* gene sequence amplified and then heterologously produced in *A. oryzae* using the maltose and starch inducible promotor amyB. The *F. velutipes* native signal peptide was used for *fvpp* expression. For the recombinant FvpP (reFvpP) production selected clones were cultivated in DPY-media and tested for reFvpP activity every 24 h. Additionally, a negative control, an *A. oryzae* strain transformed with the empty pTAex3 expression vector, was cultivated for comparison. Isolation of genomic DNA and following PCR confirmed the insertion of *fvpp* gene in *A. oryzae* using specific primers for *fvpp* gene amplification. No amplification of the *fvpp* gene was found in any negative control. For control of all genomic DNA PCRs, the housekeeping gene *alpha tubulin* was also amplified. In the reFvpP expression strain, as well as in the negative control, a DNA fragment of the size of alpha tubulin confirmed the PCR controls (data not shown).

On day six the *fvpp* gene containing *A. oryzae* cultures were harvested after measuring an extracellular reFvpP activity of  $1.4 \text{ U L}^{-1}$  ( $23.34 \text{ nkat L}^{-1}$ ) in the culture supernatant. The supernatant was concentrated via ultracentrifugation and partially purified by preparative PAGE. Subsequent semi native SDS-PAGE of active fractions was followed by a zymography to conclude on in-gel hydrolysis of gelatin by reFvpP. One clear hydrolysis zone of gelatin at about 37 kDa was observed after 16 h incubation of partially purified reFvpP (Fig. 5.2 A).

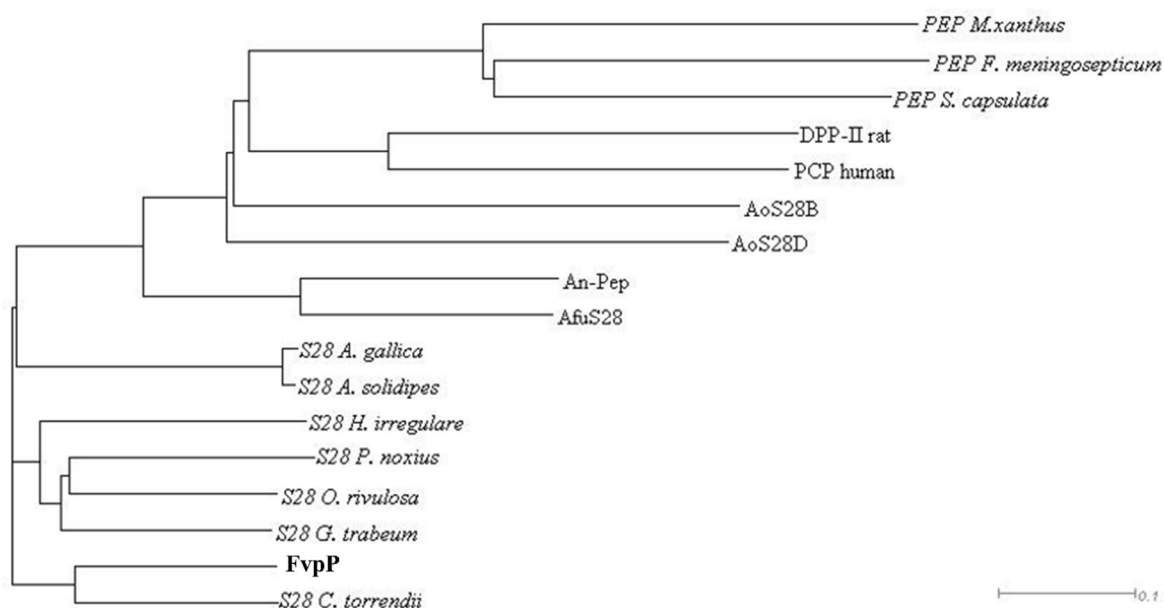


**Figure 5.2: Semi native SDS-PAGE and zymography (A) and activity gel staining (B) of the recombinant FvpP.** Lane M: Precision Plus Protein Unstained Standard or All Blue Prestained Protein Standards (Bio-Rad); 12: Partially purified recombinant FvpP; NK: *Aspergillus oryzae* negative control; 1: Culture supernatant containing recombinant FvpP; 2: Culture supernatant containing recombinant FvpP in a 1:10 dilution; 3: Culture supernatant of *Aspergillus oryzae* negative control; 4: Culture supernatant of *Aspergillus oryzae* negative control in a 1:10 dilution.

Under the same reaction conditions, gelatin hydrolysis at about 50-100 kDa occurred when An-Pep was applied on the gel. To investigate prolyl-specific peptidase activity in the culture supernatant of recombinant *A. oryzae*, a semi-native PAGE was performed with subsequent specific gel staining using Z-Gly-Pro-pNA as substrate. Moreover, a negative control was applied on the gel as well. A formation of a pink azo dye was detected at about 37 kDa in the concentrated culture supernatant, indicating the position of the recombinant FvpP activity (Fig. 5.2 B). However, no colorization was obtained with the culture supernatant of the negative control. The pink azo dye band formed appeared on the same height as the partially purified heterologously produced reFvpP on the gelatin zymography. The higher molecular mass of the recombinant FvpP compared to wild-type FvpP was attributed to post-translational modifications. Similar results were observed when expressing the basidiomycetous laccase gene *ppulcc* in *P. pastoris* and the prolyl peptidase *aos28d* in *A. oryzae* [169, 170].

As the recombinant gene sequence in *A. oryzae* resulted in a distinct prolyl-specific activity, the encoding gene of the prolyl-specific endopeptidase from *F. velutipes* (Accession no.: LN999508) was regarded identified. Three peptides identified after purification in the wild type enzyme were found again in the whole gene sequence of FvpP (SM. 2).

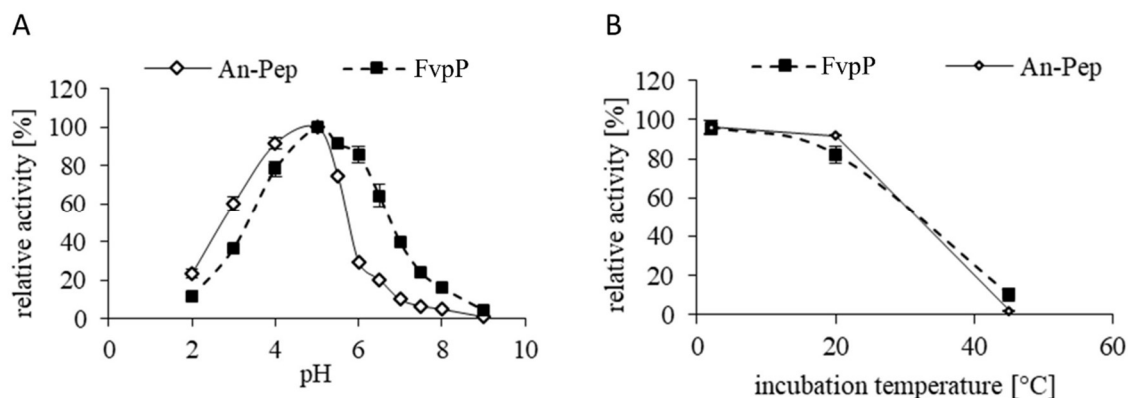
The gene resulted in 1575 bp sequence, and the translated sequence of 525 amino acids showed 54 % identity and 39 % similarity, respectively, to the prolyl-specific endopeptidase from *A. niger* (An-Pep). This surprisingly low similarity might be attributed to the supposed evolutionary drift of basidiomycetes from the older ascomycetes. A signal peptide of 19 amino acids was predicted using SignalP4.0. On the basis of amino acid sequences, phylogenetic analyses were performed using proteins with the highest similarity and some other prolyl-specific peptidases (Fig. 5.3). All analyzed proteins were grouped into three phyla, but the S28 peptidase from *C. torrendii* was the only one grouped in the same phylum as FvpP. Pairwise sequence alignment showed a moderate identity (66 %) and similarity (75 %). The lowest homology showed the prolyl-specific endopeptidase from *Flavobacterium meningosepticum* with a similarity of 5 % and only 3 % identity. For further work, the wild-type *F. velutipes* FvpP was used.



**Figure 5.3: Phylogenetic analysis of FvpP.** The phylogenetic tree constructed with Dendroscope (version 3.5.9.): Neighbour Joining method was used for phylogenetic analysis of 16 amino acid sequences, related to prolyl-specific endopeptidases and FvpP. Some fungal sequences were identified through genome or gene analysis. Sequences annotated as “hypothetical” were not used. Prolyl endopeptidase (PEP) from *Myxococcus xanthus* [AAD31004.1]; PEP from *Flavobacterium meningosepticum* [P27028.1]; PEP from *Sphingomonas capsulata* [AB010298.1]; DPP-II (Dipeptidyl peptidase II) from *Rattus norvegicus* [BAB13500.1]; Prolylcarboxypeptidase (PCP) from human [P42785.1]; AoS28B from *Aspergillus oryzae* [XP\_001820001.2]; AoS28D from *Aspergillus oryzae* [XP\_001822322.1]; An-Pep from *Aspergillus niger* [AX458699]; AfuS28 from *Aspergillus fumigatus* [XP\_749261.2]; Peptidase S28 from *Armillaria gallica* [PBL00389.1]; Peptidase S28 from *Armillaria solidipes* [PBK76609.1]; Peptidase S 28 from *Heterobasidion irregulare* [XP\_009543406.1]; Peptidase S 28 from *Phellinus noxius* [PAV21368.1]; Peptidase S 28 from *Obba rivulosa* [OCH84125.1]; Peptidase S 28 from *Gloeophyllum trabeum* [XP\_007862257.1]; Peptidase S 28 from *Cylindrobasidium torrendii* [KIY73984.1]

### 5.5.3. Comparison of FvpP and An-Pep

The wild-type FvpP from *F. velutipes* as well as An-Pep from *A. niger* showed highest hydrolytic activity at around pH 5, a relatively low pH optimum compared to other prolyl-specific peptidases (pH 3.7-10.5; Fig. 5.4 A) [55]. 100 % FvpP activity corresponds to  $0.5 \text{ U mL}^{-1}$ ; ( $8.34 \text{ nkat mL}^{-1}$ ) under optimal conditions. In the entire range from pH 5 > to < 9 the FvpP showed a higher initial activity than An-Pep (at pH 7, for example, 40 % (FvpP) of initial activity *versus* 10 % (An-Pep)). After incubation at pH 3 in contrast, about 60 % residual activity of An-Pep remained, while FvpP lost about two third of its maximum activity. However, only few foods show such low pH-values.



**Figure 5.4: Effect of pH and temperature on commercial An-Pep or wild type FvpP activity (each 0.5 U mL<sup>-1</sup>; 8.34 nkat mL<sup>-1</sup>).** (A) pH optimum was determined using Britton-Robinson buffer ranging from pH 3.0 to 9.5. (B) Thermal stability was determined by incubating the enzymes at different temperatures from 4 to 50 °C for 20 h at pH 5. Relative enzyme activity [%] is defined as the percentage of activity detected with respect to the maximum observed peptidase activity in each experiment.

Maximum enzyme activity of the prolyl-specific peptidase FvpP was recorded at 45 °C, which was in accordance with other prolyl-specific peptidases [55]. Higher temperature optima of prolyl-specific peptidases (60 °C) were observed in *A. oryzae* and *A. niger* as well as lower optima in *A. bisporus* (37 °C) and *Cyprinus carpio* (35 °C). [71, 157, 171, 172]. The thermal stability of FvpP and An-Pep was examined at 4, 20 and 45 °C for 20 h. There was no loss of activity at 4 °C for both enzymes but a residual activity within the temperature range from 4 °C to 20 °C of more than 90 % for An-Pep and 80 % for FvpP (Fig. 5.4 B). A higher decrease of hydrolytic activity was observed when the enzymes were incubated at 45 °C. About 95 % loss of hydrolytic activity of An-Pep and up to 90 % of FvpP was measured due to heating. The prolyl endopeptidase from *A. oryzae* showed a residual activity of 70 % after 30 min at 50 °C [156].

Isoelectric focusing of the purified FvpP indicated an isoelectric point around pH 3.8 and differed slightly from the calculated value (4.3; ExpASy), but was similar to the prolyl endopeptidase from *A. niger* (An-Pep, 66 kDa, pI 4.2) [68]. Kinetic constants were determined from initial hydrolysis rates of the substrate Z-Gly-Pro-pNA. As An-Pep was a commercial preparation, the kinetic data determined should be regarded as apparent values. According to the  $K_m$  values, An-Pep exhibited a higher affinity for Z-Gly-Pro-pNA (apparent  $K_m = 0.49$  mM,  $k_{cat} = 0.109$  s<sup>-1</sup>,  $V_{max} = 99.4$  mU mg<sup>-1</sup>; 1.66 mkat mg<sup>-1</sup>) in comparison to FvpP ( $K_m = 0.86$  mM,  $k_{cat} = 0.119$  s<sup>-1</sup>,  $V_{max} = 115.8$  mU mg<sup>-1</sup>; 1.93 mkat mg<sup>-1</sup>). The  $K_m$  value for the prolyl endopeptidase of *A. oryzae* was even lower (0.26 mM), whereas FvpP exhibited almost a four-fold higher affinity than the peptidase from the basidiomycete *C. clastophylla* (3.42 mM) [156,

158]. Biochemical similarities of enzymes in spite of dissimilar primary structures, as in the case of FvpP and An-Pep, are not an uncommon observation.

#### 5.5.4. Effect of various metal ions, inhibitors and solvents

The sensitivity of the purified wild-type prolyl endopeptidase from *F. velutipes* and the commercial prolyl endopeptidase An-Pep towards various metal ions and inhibitors was investigated (Table 5.2).

**Table 5.2:** Effect of metal ions, inhibitors and solvents on the activity of FvpP and An-Pep [initial activity 0.1 U mL<sup>-1</sup> each], tested with the substrate Z-Gly-Pro-pNA at pH 5 and 37 °C.

Concentration [mM or %]	Substance	Relative FvpP activity [%]	Relative An-Pep activity [%]
5	FeCl <sub>3</sub>	133 ± 3	127 ± 3
5	FeSO <sub>4</sub>	135 ± 18	153 ± 10
5	KCl	84 ± 1	111 ± 13
5	Cu(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	64 ± 1	56 ± 10
5	NiSO <sub>4</sub>	87 ± 6	82 ± 11
5	CoCl <sub>2</sub>	87 ± 8	84 ± 8
5	ZnSO <sub>4</sub>	70 ± 3	84 ± 13
5	MnSO <sub>4</sub>	88 ± 2	85 ± 1
5	LiCl	95 ± 2	113 ± 11
5	MgCl <sub>2</sub>	92 ± 1	86 ± 8
5	SDS	11 ± 2	64 ± 7
0.66	EDTA	96 ± 1	105 ± 4
0.014	EDTA	100 ± 1	98 ± 2
0.66	PMSF	47 ± 2	45 ± 0
0.014	PMSF	94 ± 2	95 ± 4
0.12	Pepstatin A	96 ± 1	40 ± 1
0.012	Pepstatin A	100 ± 1	80 ± 6
50	Z-Pro-Prolinal	7 ± 2	7 ± 1
5	Z-Pro-Prolinal	35 ± 1	20 ± 2
0.5	Z-Pro-Prolinal	42 ± 0	22 ± 1
0.05	Z-Pro-Prolinal	58 ± 2	34 ± 3
0.005	Z-Pro-Prolinal	69 ± 1	40 ± 0
0.5	NaCl	102 ± 2	100 ± 1
1	NaCl	102 ± 3	99 ± 2
5	NaCl	103 ± 4	99 ± 0
15	NaCl	101 ± 1	96 ± 3
25	NaCl	103 ± 1	93 ± 1
0.5	CaCl <sub>2</sub>	89 ± 3	76 ± 2
1	CaCl <sub>2</sub>	94 ± 9	64 ± 2
5	CaCl <sub>2</sub>	94 ± 3	48 ± 2
10	CaCl <sub>2</sub>	100 ± 4	43 ± 4
25	CaCl <sub>2</sub>	67 ± 1	34 ± 1
50	CaCl <sub>2</sub>	39 ± 2	30 ± 1

A prolyl endopeptidase from *Flammulina velutipes* for the possible degradation of celiac disease provoking cereal proteins

Concentration [mM or %]	Substance	Relative FvpP activity [%]	Relative An-Pep activity [%]
7 %	EtOH	18 ± 3	34 ± 3
40 %	EtOH	0 ± 0	2 ± 1
67 %	EtOH	0 ± 0	0 ± 0
7 %	MeOH	26 ± 4	56 ± 1
40 %	MeOH	0 ± 0	13 ± 1
67 %	MeOH	0 ± 0	0 ± 0
7 %	DMSO	28 ± 1	48 ± 7
40 %	DMSO	7 ± 1	2 ± 1
67 %	DMSO	13 ± 4	5 ± 1

100 % FvpP activity corresponds to 0.1 U mL<sup>-1</sup>; (1.67 nkat mL<sup>-1</sup>). Na<sup>+</sup>, Li<sup>+</sup> and Mg<sup>2+</sup> did not show any considerable effect on the peptidase activities, whereas Cu<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup> and Co<sup>2+</sup> exhibited different inhibitory effects on the activity of both enzymes. Similar results (strong inhibition by Cu<sup>2+</sup> and slight by Mn<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>) were obtained for the extracellular prolyl oligopeptidase from the basidiomycete *C. clastophylla* [158]. K<sup>+</sup> ions slightly inhibited FvpP, but did not affect An-Pep activity (Table 5.2). FvpP was not affected by 10 mM CaCl<sub>2</sub>. In contrast, the peptidase activity of An-Pep decreased significantly, whereas the presence of 10 mM Ca<sup>2+</sup> ions increased the prolyl peptidase activity of *A. oryzae* [156]. Higher concentrations as 50 mM CaCl<sub>2</sub> had a decreasing effect on both An-Pep and FvpP. The activity of both peptidases was enhanced by Fe<sup>2+</sup> and Fe<sup>3+</sup>, which differed from most other reported serine peptidases, indicating that these ions play a yet unknown but important role for the enzymes. Similar effects were found in a serine peptidase in human erythrocyte membranes which was stimulated by Fe<sup>2+</sup> [173]. Iron ions may trigger the peptidases to form a more compact structure or help to maintain the activity during the reaction.

The activities of An-Pep and FvpP were not affected by the EDTA (0.7 mM), whereas more than 50 % of activity was inhibited by the serine peptidase inhibitor PMSF (0.7 mM). No influence on FvpP activity was observed in the presence of Pepstatin A, an inhibitor of aspartyl peptidases, in any tested concentration. In contrast, An-Pep exhibited 40 % residual activity after incubation with Pepstatin A (0.1 mM) (Table. 5.2). The prolyl-specific endopeptidase from *A. niger* and two prolyl endopeptidases of basidiomycetes showed similar results concerning EDTA, PMSF and Pepstatin A [158, 171, 174]. Z-Pro-prolinal, known as potent inhibitor of prolyl endopeptidases, caused an activity decrease over 90 % for both peptidases. Complete inhibition of FvpP was achieved with 40 % EtOH or MeOH, respectively. While An-Pep showed a residual activity of 13 % at 40 % methanol, DMSO caused a slighter decrease of activity for both peptidases compared to the other tested solvents (Table. 5.2).

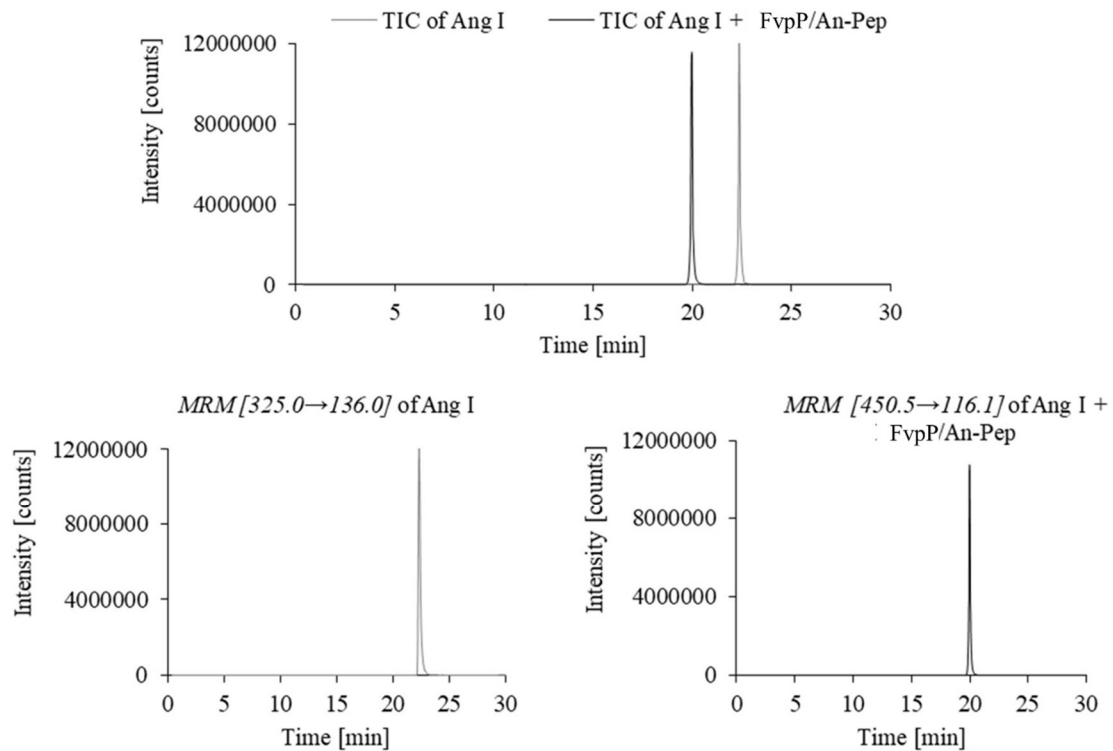
### 5.5.5. Substrate specificity of FvpP and An-Pep

The substrate specificity of FvpP and An-Pep (both  $0.5 \text{ U mL}^{-1}$ ;  $8.34 \text{ nkat mL}^{-1}$ ) was evaluated using a set of chromogenic substrates: Z-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA, Z-Gly-Gly-Leu-pNA, Leu-pNA and Ala-pNA. For both peptidases no release of pNA was observed confirming that they did not accept substrates without a terminal proline residue. An-Pep showed hydrolytic activity post Ala residues [68]. To distinguish, whether FvpP inhibited exo- or Endopeptidase activity, the enzyme was incubated with different peptides, such as Arg-Pro, Pro-Gly-Leu, oxidized insulin chain B and angiotensin I. The cleavage products were detected using RP-HPLC or LC-MS/MS. The absence of free amino acids after the incubation of Arg-Pro and Pro-Gly-Leu with either FvpP or An-Pep, as shown by RP-HPLC experiments of the intact peptides after 20 h, confirmed a lack of exo-peptidase specificity.

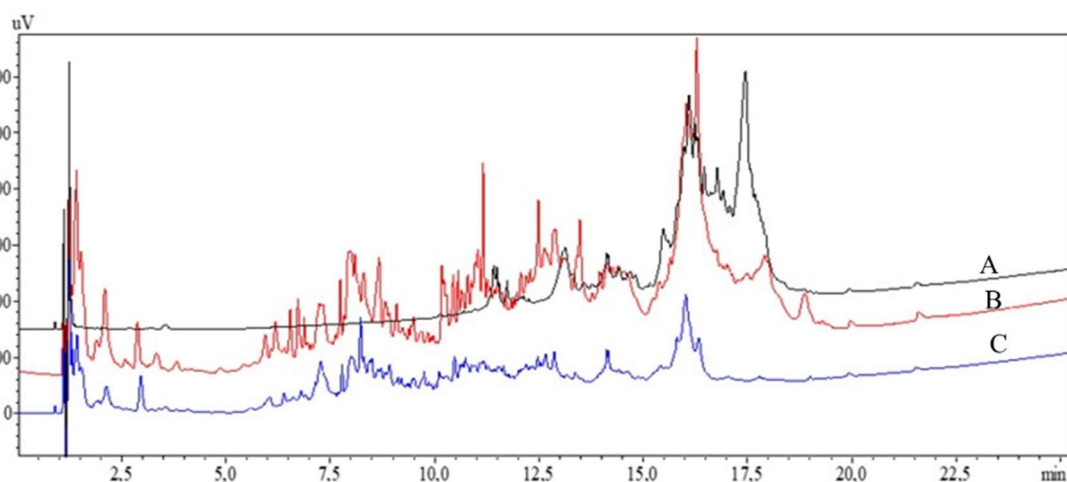
Oxidized insulin chain B (Phe-Val-Asn-Gln-His-Leu-Cys(SO<sub>3</sub>H)-Gly-Ser-His-Leu-Val-Glu-Ala-Leu-Tyr-Leu-Val-Cys(SO<sub>3</sub>H)-Gly-Glu-Arg-Gly-Phe-Phe-Tyr-Thr-**Pro-Lys**-Ala) was cleaved between -Pro-Lys- by both FvpP and An-Pep [171]. The substrate Angiotensin I (Ang I), a decapeptide (Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-**Pro-Phe**-His-Leu, Mw: 1296.5 Da), was hydrolyzed by the *A. niger* prolyl endopeptidase [56, 76]. Ang I is a precursor of the vasoconstrictor Ang II, while the cleavage product of Ang I after treatment with prolyl endopeptidases, Angiotensin 1-7 (Ang 1-7) reduces mitogenicity, counteracts angiogenesis and act as vasodilator [76, 175]. Ang 1-7 (Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro, Mw: 899.0 Da) was detected by LC-MS/MS after 20 h of incubation with FvpP confirming FvpP as a prolyl-specific endopeptidase (Fig. 5.5). Ang I (retention time: 23 min) was completely hydrolyzed to Ang 1-7 (retention time: 20 min) by both prolyl endopeptidases (Fig. 5.5). The identification was realized with two MRM transitions, Ang I  $m/z$  325.0  $[M+4H]^{4+} \rightarrow m/z$  110.0 and  $m/z$  136.0 and for Ang 1-7  $m/z$  450.5  $[M+2H]^{2+} \rightarrow m/z$  110.3 and  $m/z$  116.1. FvpP also hydrolyzed  $\alpha$ -gliadin into small, less hydrophobic peptides after 20 h incubation (Fig. 5.6).



A prolyl endopeptidase from *Flammulina velutipes* for the possible degradation of celiac disease provoking cereal proteins



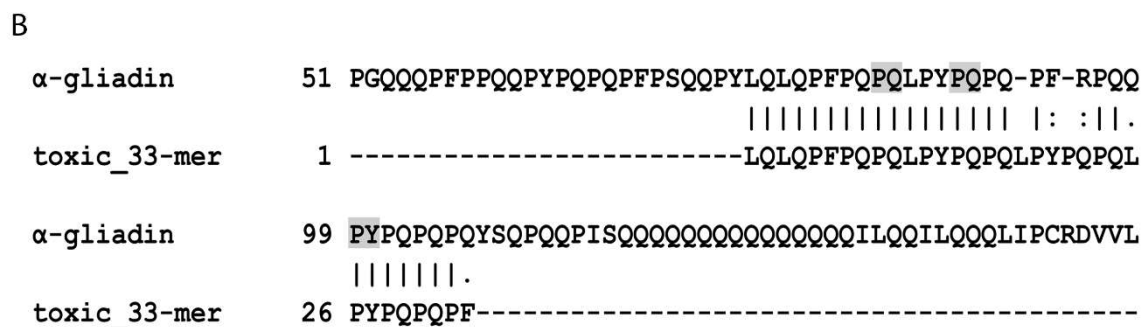
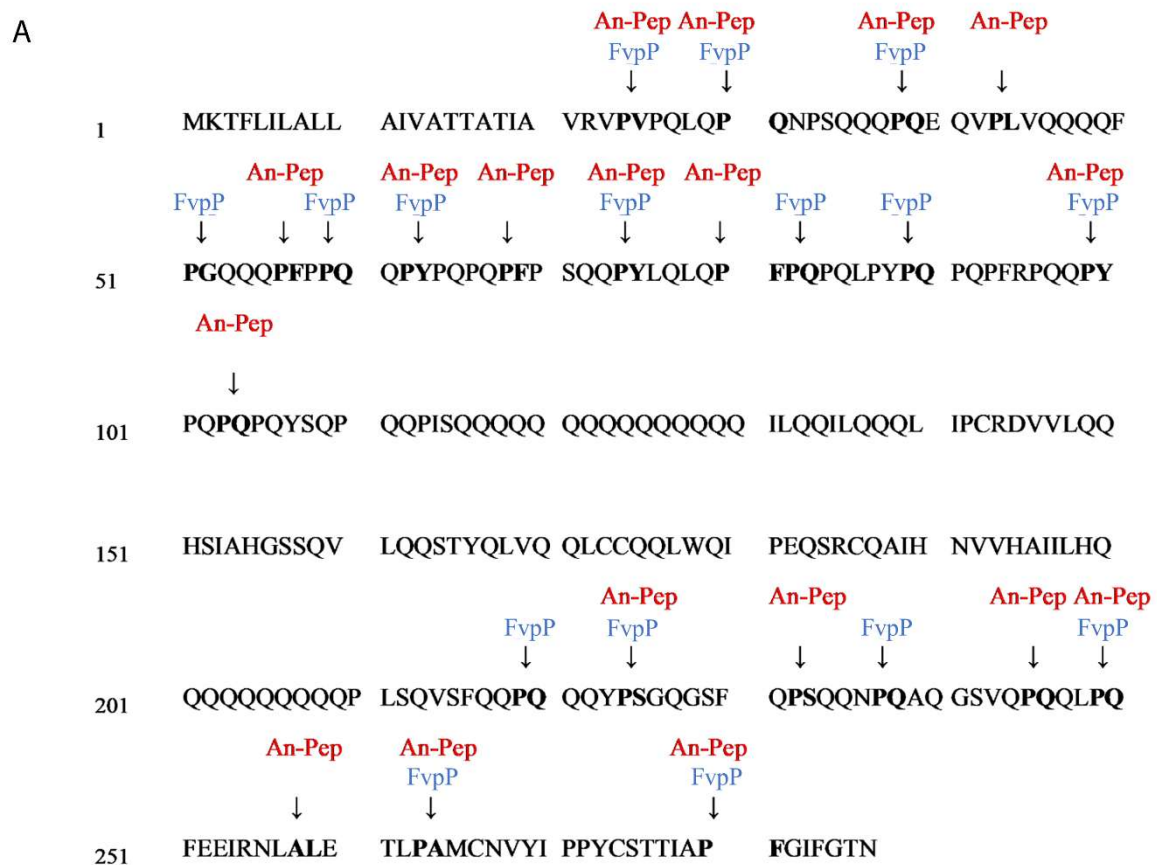
**Figure 5.5: LC-MS/MS chromatograms of the hydrolysis of Angiotensin I (Ang I).** Substrate blank in grey; Ang I incubated with wild type FvpP or An-Pep (each  $0.5 \text{ U L}^{-1}$ ;  $8.34 \text{ nkat mL}^{-1}$ ) after 20 h (black chromatogram); Total ion current (TIC) presented above and specified multiple reaction monitoring for the qualification of Ang I and the cleavage product Ang 1-7. Retention time Ang I: 23 min (grey); Retention time Ang 1-7: 20 min (black).



**Figure 5.6:  $\alpha$ -gliadin hydrolysates.** Analyzed by RP-HPLC using an Aeris C4 Widepore and UV detection at 220 nm, (A) gliadin blank, no enzyme was added; (B) hydrolysate with An-Pep and (C) hydrolysate with wild type FvpP.  $\alpha$ -gliadin: retention time: 15-20 min; Hydrolysis products after enzyme incubation (red and blue): retention time 2-12.5 min.

A prolyl endopeptidase from *Flammulina velutipes* for the possible degradation of celiac disease provoking cereal proteins

Gliadin (retention time from 15 to 20 min) was degraded, while new peaks with shorter retention times appeared. Similar results were obtained incubating An-Pep with the same substrate. The exact cleavage sites were revealed by LC-MS (QTOF) (Fig. 5.7 A). According to expectations, FvpP and An-Pep hydrolyzed most of the –Pro-X– bonds. In addition, a hydrolysis of the peptide bond between –Ala-Leu– was observed for An-Pep. The same cleavage sites were previously reported for An-Pep [69].



**Figure 5.7: Cleavage sites of prolyl endopeptidases.** A: α-gliadin. Cleavage sites in α-gliadin from *Triticum aestivum*, (gi| 21932416) as analyzed by LC-MS (QTOF) indicated by arrows; An-Pep (red) and wild type FvpP (blue). B: Pairwise sequence alignment of a partial sequence of α-gliadin and the toxic 33-mer. Highlighted amino acids show the potential cleavage sides of FvpP within the 33-mer.

Gliadins are the main undesired component of gluten [8]. A 33-mer (LQLQFPFPQQLPY PQQQLPYYPQQQLPYYPQQPF and PQQQLPYYPQQQLP) derived from  $\alpha$ -gliadin was identified to play an immune-dominant role, causing T-cell response to gluten in coeliac sprue [35]. These epitopes are highly resistant to gastric, pancreatic peptidases and to digestion by intestinal brush border membrane peptidases. It was also identified in analogous peptides from other subfamilies of gliadin proteins, such as the  $\gamma$ -gliadins and in other families of grains, such as barley and rye [176]. To examine, if FvpP would cleave the so-called toxic 33-mer, a pairwise sequence alignment of the analyzed  $\alpha$ -gliadin and the 33-mer was performed. The two peptides showed high sequence similarities. Three cleavage sites of FvpP were identified in this region. It is supposed that FvpP will potentially hydrolyse the same sites of the toxic 33-mer-peptide according to *in silico* comparison (Fig. 5.7 B). *In situ* analysis has to be performed to prove this hypothesis. A peptidase from *B. tequilensis* belonging to the S9 peptide family nearly completely hydrolysed gliadin peptides [168]. Two similar bacterial prolyl endopeptidases from *F. meningosepticum* and *Myxococcus xanthus* were also able to degrade this polypeptide [177]. Consequently, prolyl endopeptidases were able to hydrolyze the sticky and hydrophobic gluten substrate and may therefore potentially offer a solution for treating celiac disease.

RP-HPLC analyses confirmed that An-Pep and FvpP also cleaved  $\beta$ -casein, myoglobin and gluten into smaller hydrophilic peptides. The same results were obtained for An-Pep previously [178]. It was postulated that a hydrolysis of gluten using An-Pep was not sufficient for the quantitative elimination of the undesired peptides [69], but both the immunoreactivity and the ELISA measurements of the key-epitopes were reduced to almost zero by a prolyl endopeptidase treatment of the gluten in beer [179]. Using these peptidases with an acidic pH optimum as a food supplement seems to be a potential remedy for celiac disease patients. It was also mentioned that the effect cannot be definitively assessed until all epitopes involved have been unambiguously identified [179].

An-Pep (S28.004) and FvpP are unique in the serine peptidase family S28, because the enzymes showed endopeptidase activity, but shared more sequence similarity with lysosomal Pro-X carboxypeptidase (S28.001) and dipeptidyl peptidase II (DPP-II, S28.002) than with prolyl oligopeptidases of the serine peptidase family S09. Both peptidases families, S09 and S28, have the same active site residues in the order Ser, Asp, His. The exo- or endo-acting scheme is not conserved in the primary amino acid sequence of the peptidases which explains why An-Pep and FvpP showed an endo-substrate specificity unlike other peptidases of the S28 family which possess an exo-specificity [68]. It was suggested that prolyl endopeptidases of basidiomycete origin have five extended substrate binding sites, S3, S2, S1, S1' and S2', which are involved in

the binding and catalytic process, while S2, S1, and S1' are also highly stereospecific [157, 174]. The enzyme specificity is limited by the substrate accessibility to the proline-specific endopeptidase activity site instead of the chain length specificity [52]. The prolyl oligopeptidases of the S09 peptidase family contain a peptidase domain, and the catalytic triad is covered by the central tunnel of a seven-bladed  $\beta$ -propeller. This oscillating propeller makes the enzyme an oligopeptidase, while excluding large structured proteins from the active site [180]. However, no detailed structural description of the S28 family proteins exists beside the common  $\alpha/\beta$ -hydrolase domain [181].

In spite of their dissimilar primary sequence, the peptidase from *F. velutipes* (FvpP) and the peptidase from *A. niger* (An-Pep) share a number of biochemical properties. Exhibiting an almost identical P1-P1'-peptide bond specificity, both are able to degrade large proline-rich proteins. With its acidic pH optimum, FvpP has an essential advantage over the prolyl endopeptidases of the S09 family with their neutral or basic pH optimum. Altogether, FvpP worked well at pH and salt conditions as they typically exist in cereal based foods, showed a moderate temperature stability facilitating heat-inactivation after use (Fig. 5.4 and Table. 5.2), and, most important, possessed the required prolyl-specific cleaving activity (Fig. 5.5 to 5.7). Hence, it might constitute a new tool for the production of foods from wheat or other crops of the tribes *Triticeae* and *Aveneae*. With an incidence of one in one hundred and an estimated 80 % of cases remaining undiagnosed in the developed countries, the enzymatic mitigation of celiac disease possesses a high health-political relevance, not to mention the relief of individual suffering. Beyond the processing of foods, highly specific peptidases are welcome for the production of specific peptides in biomedical applications, as therapeutic targets, or for debittering protein hydrolysates.

## 5.6. Acknowledgement

We thank Ulrich Krings for nLC-ESI-QTOF-MS/MS sequencing. Furthermore, the authors gratefully acknowledge Elizabeth Skellam for providing the pTAex3 vector and the *Aspergillus oryzae* strain.

## 5.7. Supplementary material

### SM1.

Specific primers for *fvpP* amplification for various amplification methods.

Whole *fvpP* gene sequence:

*fvpP*\_for: 5' atggcaccgcctggtctcg 3'

*fvpP*\_rev: 5' tcaagcgctgcttgaattcagc 3'

Cloning of *fvpP* via EMP into the *A. oryzae* expression vector pTAex3. EMP step 1:

*fvpP*\_emp\_for: 5' atggcaccgcctggtctcgtt 3'

*fvpP*\_emp\_rev: 5' cttcacgagctactacagatcccctcagtggtgatggtgatgagc 3'

EMP step 2:

pTAex3: 5' ggtaccgagctcgaattcgg 3'

### SM2.

MAPPGLVALLALSASLVNARLQDGRPHGNAPPIPVLVVEVLDSRTEAFQFSGSSIPPY  
NTVYYFDQLIDHDDASKGTFSQRYWHTWEFYQPGGPIILMTPGEANAAPYFGYLTNT  
SITGLIAQQEHGATIVLEHRFYGLSNPYPDLTPESLKYHTIQQAIDDLEYFANNVALPM  
PNGTGVTDPKAPWILVGGSSYSGALTSWTMVNKPGLFWAGYASSAVVEAITDFWTYFE  
PIRQNMPVNCSADVAAVIAYVDETFSGENTTAIDELKATFGLSDVTHLDDAAGALRNN  
LWDWQSLQTNSGPGTQFTKFCDALEVKDGEVAGEEGWGLENALASWGGYWRDTY  
YSLLCGDANAEDCFGSYNASQEIYTNTDIDNTWRSWFWIVCNEVGYYQDGPPLGVDI  
KPIVTRLVNVETNYDARQCQLMYQDTYASPLPDVERTNTVYKGDVSIERLFFANG  
LRDPWREATMNAEGVEIQSTDRQPIVLSDFHCSDLAARGASDASIGALHKQALES  
MHNWLAFTSSA

**Figure: SM 2: Comparison of detected peptides after FvpP purification and whole FvpP amino acid sequence**

## 6. Ausblick

Im Zuge der vorliegenden Arbeit wurden zwei potenzielle Backenzyme aus dem Kulturüberstand von Mikroorganismen isoliert, auf biochemischer und genetischer Ebene charakterisiert und anschließend in pro- bzw. eukaryotischen Expressionssystemen produziert. Abschließende Applikationsstudien verdeutlichten die etwaige Anwendung in der Lebensmittelindustrie. Der bis dato wissenschaftliche Kenntnisstand eröffnet neue Forschungsschwerpunkte, welche verbleiben, um eine erfolgreiche industrielle Anwendung zu realisieren.

Im Rahmen der ersten Studie zeigte die Ferulasäureesterase SwFAED aus *S. werraensis* eine Gebäckvolumenvergrößerung von nahezu 10 %. Nachfolgend sollten weiterführende Studien durchgeführt werden, um den Einfluss des Enzyms auf die verbleibenden Teig- und Gebäckigenschaften zu untersuchen. Zusätzlich sollte die Applikation des Enzyms in anderen Backprodukten getestet werden. Darüber hinaus wären Analysen bezüglich der Synergie der SwFAED mit weiteren Enzymen und dessen Auswirkungen auf die Teigeigenschaften sinnvoll. Durch den Nachweis des aufgezeigten Potentials der SwFAED wäre auch ein *Scale up* der heterologen Produktion auf den technischen Maßstab denkbar. Zum anderen könnten neue Applikationsbereiche wie bspw. die Papier- und Zellstoffindustrie, neben der Backindustrie erforscht werden. Da die SwFAED zu Beginn der Arbeit keine Ähnlichkeit auf molekularer Ebene zu anderen publizierten FAEs aufwies, wäre es bedeutsam, einen möglichen Zusammenhang zwischen der Aminosäuresequenz und den biochemischen Eigenschaften aufzuzeigen. Hierfür wäre eine 3D-Kristallstruktur des Enzyms notwendig, um diese mit vorhandenen zu vergleichen. Insbesondere der Vergleich von FAEs mit verschiedenen Backeigenschaften wäre erstrebenswert.

Des Weiteren wurde mit der FvpP ein zweites Backenzym aus der Enzymklasse der Prolyl-spezifischen Peptidasen aus *F. velutipes* charakterisiert. Nachfolgende Spaltstellenanalysen wiesen auf ein hohes Potential des Enzyms bezüglich des Einsatzes zum Glutenabbau hin, da ein kritisches toxisches 33-mer häufiger mittels der FvpP hydrolysiert wurde als durch ein kommerziell erwerbliches Enzym. Auch hier wäre eine Analyse auf die Auswirkungen der Teig- und Gebäckigenschaften wünschenswert. Ferner verbleiben *in situ* und immunologische Analysen, um das volle Potential des isolierten Enzyms zu erforschen. Neben der Anwendung in der Backindustrie sollte die Applikation in anderen Lebensmittelindustriebereichen nicht unbeachtet bleiben. Prolinreiche Hydrolysate bzw. Peptide weisen einen bitteren Geschmack auf, der bei bestimmten Lebensmittelprodukten, wie bspw. in Gouda-Käse, nicht wünschenswert ist. Demzufolge ist ein Einsatz in diesem Industriezweig denkbar, was

Pilotstudien bezüglich der Sensorik des enzymbehandelten Produktes erfordert. Längerfristig könnten sich zukünftige Projekte mit medizinischen Applikationsstudien der FvpP befassen. Abschließend könnten Screenings nach weiteren neuartigen Backenzymen, Asparaginasen, Lipasen, etc. durchgeführt werden, um das Set an dieser Art von Enzymen zu erweitern.

## **7. Vorwort zum Abschnitt “A unique asparaginase from *Flammulina velutipes* catalyses transpeptidation”**

Neben der hauptsächlichen Arbeit, welche die heterologe Produktion und Charakterisierung von potenziellen Backenzymen zum Ziel hatte, wurde die enzymatische Generierung von geschmacksmodifizierenden Peptiden beforscht. Als Modellenzym diente eine in Vorarbeiten aus dem Kulturüberstand von *F. velutipes* isolierte und gereinigte neuartige Asparaginase (FvNase). Asparaginase (EC 3.5.1.1) katalysieren die Hydrolyse von Asparagin zu Asparaginsäure. Zusätzlich zeigte die FvNase eine Glutaminase-Nebenaktivität, sodass sowohl Asparagin als auch Glutamin als Substrat genutzt werden können und die entsprechenden Säuren als Produkt hervorgehen [182]. In der Lebensmittelindustrie werden Asparaginase vorrangig bei stärkehaltigen und stark erhitzten Lebensmitteln zur Vermeidung der Acrylamidbildung eingesetzt [183]. Darüber hinaus wirkt diese Enzymklasse als Zytostatikum zur Behandlung von akuter lymphatischer Leukämie und Subtypen des Non-Hodgkin-Lymphoms [184].

Geschmack leistet einen wesentlichen Beitrag bei der Auswahl von Lebensmitteln. Einige Glutamyl-Peptide weisen kokumi-Geschmack-verleihende Eigenschaften auf. Dies äußert sich in der Modifizierung des Grundgeschmacks, sowie der Vollmundigkeit der Lebensmittel. Aufgrund dessen besteht eine hohe Nachfrage nach Enzymen, welche die geschmacksverstärkenden Peptide synthetisieren können.

Die Motivation des nachfolgenden Manuskripts war der erstmalige Nachweis einer Transpeptidase-Aktivität einer Asparaginase. Ferner sollte ein geeignetes Expressionssystem für die rekombinante Produktion des Enzyms etabliert werden. Nach erfolgreichen Pilotexpressionsstudien in *E. coli* BL21(DE3)Star wurde die gewünschte Transpeptidase-Aktivität erstmals im Lysat nachgewiesen. Weiterführend sollte eine ausreichende Produktion des Proteins für nachstehende Untersuchungen der Nebenaktivität sichergestellt werden. Nachdem zwei alternative Expressionssysteme, *P. pastoris* und *A. oryzae* nur mäßigen Erfolg zeigten, wurde eine Optimierung der Produktion von aktivem Enzym in *E. coli* Rosetta-gami erzielt. In Applikationsstudien sollte außerdem analysiert werden, ob die Asparaginase über die Modellsubstrate Asparagin, Asparaginsäure, Glutamin und Glutaminsäure hinaus weitere Aminosäuren als Substrate für die Peptidsynthese nutzen kann.

Beteiligt an diesem Forschungsprojekt war Christoph J. Behrens, der das Vektorkonstrukt für nachfolgende Arbeiten bereitstellte. Diana Linke steuerte zu der Projektidee bei sowie Ralf G. Berger, der als Arbeitsgruppenleiter für die finanziellen Mitteln und die Betreuung im Rahmen der Promotion verantwortlich war.



## 8. A unique asparaginase from *Flammulina velutipes* catalyses transpeptidation

Kathrin Schulz\*, Diana Linke, Christoph Jan Behrens, Ralf G. Berger

### 8.1. Abstract

A potential transpeptidase side activity of an asparaginase was shown for the first time. The unique enzyme (FvNase) originating from the basidiomycete *Flammulina velutipes* was heterologously produced in *Escherichia coli*. The expression of recombinant FvNase was optimized by changing the expression host to the *E. coli* Rosetta-gami strain, favorable for the expression of eukaryotic genes. The recombinant soluble protein was detected after 20 h incubation at 20 °C upon induction with 1 mM IPTG. Various dipeptides, such as Gln-Arg, Glu-Phe, Glu-Met, Asn-Arg, Asn-Phe, Asn-His, Asn-Asn and Asn-Trp showed up in extracted ion chromatogram after reFvNase incubation with corresponding amino acids. The substrate peak decreased for Met as substrate up to 25 % indicating transpeptidolytic activity. As an enzyme exhibiting transpeptidase activity, FvNase can potentially be used for generating taste active peptides.

### 8.2. Key words

*Flammulina velutipes*, asparaginase, transpeptidase activity, kokumi

### 8.3. Introduction

L-asparaginase (L-asparagine amino hydrolase, E.C.3.5.1.1) catalyzes the hydrolytic deamidation of L-asparagine to L-aspartic acid and ammonium. Asparaginases occur in bacteria, fungi and mammals and play an important role as a therapeutic agent to treat lymphoblastic leukemia and other diseases [185-187]. Moreover, the enzyme is used as a food processing aid in fried food and in the baking industry to inhibit the formation of acrylamide during the Maillard reaction, originated by the reaction between asparagine and reducing sugars [183]. Besides the release of free L-aspartic acid from L-asparagine, some types of asparaginases are able to catalyze the hydrolytic cleavage of L-glutamate and ammonia from L-glutamine as a side activity [188]. The product L-glutamate contributes to the umami taste, if the concentration is above the taste threshold of about 1 mM [189]. Beside the basic taste flavors umami, sweet, sour, bitter and salty another flavor called kokumi taste is described. This taste is characterized by mouthfulness, continuity and richness and is provoked by  $\gamma$ -glutamyl peptides. Six dipeptides were identified as key compounds in the kokumi taste:  $\gamma$ -Glu-Glu,  $\gamma$ -Glu-Gly,  $\gamma$ -Glu-Gln,  $\gamma$ -Glu-Met,  $\gamma$ -Glu-Leu and  $\gamma$ -Glu-His [190]. Such dipeptides are usually synthesized by  $\gamma$ -glutamyl-transferase (EC 2.3.2.2) or  $\gamma$ -Glu-Cys synthetase (EC 6.3.2.2) [189]. Nevertheless, the formation of  $\gamma$ -[Glu]<sub>n</sub>-Phe peptides was catalyzed by glutaminases (EC 3.5.1.2) of *Bacillus amyloliquefaciens* and *Aspergillus oryzae*, and other transferring reactions of glutaminases were shown from *Pseudomonas nitroreducens* and *Pseudomonas aeruginosa* [191-194]. However, no asparaginases showed transpeptidase activity so far. Moreover, not only glutamyl peptides showed taste active qualities, but also arginyl peptides contribute to salt taste perception [195]. The enzymatic hydrolytic product of asparagine, aspartate, correlates also with the salty taste in food [196]. Furthermore, the hydrophobic amino acids Phe, Val, Leu and His exhibit a bitterness when occurring as single amino acids in food, but lose their bitterness when coupled to  $\gamma$ -glutamyl dipeptides [189]. Some time ago, an asparaginase was isolated from the basidiomycete *Flammulina velutipes*. The biochemical characterization showed that the enzyme not only was active on L-asparagine, but also active on L-glutamine, expressing a glutaminase side activity [182]. In the present study, the heterologous expression, the first proof of a transpeptidase activity and following purification of the recombinant asparaginase from *F. velutipes* is presented.

## 8.4. Material and methods

### 8.4.1. Chemicals, reagents and substrates

All chemicals used were purchased from Carl Roth (Karlsruhe, Germany), Merck (Darmstadt, Germany), Fluka (Buchs, Switzerland), or Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Germany), unless otherwise noted.

### 8.4.2. Measurement of enzyme activity

Recombinant glutaminase side activity was determined by gel staining as described in Eisele *et al.* [182].

### 8.4.3. Denaturing SDS-PAGE

The molecular mass and purity of the enzyme was determined by SDS-PAGE using a 12 % polyacrylamide gel [40]. Samples were prepared by mixing protein solution and loading buffer (0.1 M Tris-HCl, pH 6.8, 0.2 M dithiothreitol, 4 % SDS, 20 % glycerol, 0.2 % bromophenol blue) and boiled for 10 min. Samples were applied on the gel, as well as a protein standard (BioRad, Munich, Germany). The protein electrophoresis was performed at 13 mA.

### 8.4.4. Cloning of the *fynase* gene

For gene expression *fynase* gene sequence (Accession no. FR696374) was amplified using the primers *fynaseexp\_for* (5' GAGGGCAAAGATTTTCATTTCCATGGATATAT 3') and *fynaseexp\_rev* (5' ATATATCTCGAGAGCAAAGTCGATGAAGGC 3') with its native signal sequence. The forward and reverse primer contained a digestion site (underlined; for: NcoI; rev: XhoI) to ligate the amplified DNA in frame with the C-terminal His-tag epitope of the pET-32a(+) vector. As a feature of the expression vector the *fynase* coding sequence was fused to a 109 amino acid thioredoxin protein, which increases the solubility of the protein [197]. After the PCR product was extracted from a 1 % agarose gel using the innuPREP PCRpure Kit (Analytic-Jena, Jena, Germany), the DNA as well as the expression vector was digested with NcoI and XhoI (Thermo Scientific, St. Leon-Rot, Germany). The following ligation resulted in the expression vector pET-32a(+)-*fynase*, which was subsequently transformed into *E. coli* BL21(DE3)Star (Invitrogen, Karlsruhe, Germany) or *E. coli* Rosetta-gami 2(DE3) (Merck, Darmstadt, Germany). The *E. coli* BL21(DE3)Star or Rosetta-gami 2(DE3) cells, respectively containing the empty pET-32a(+) vector were propagated analogously and served as the negative control.

#### 8.4.5. Heterologous expression of the *fynase* gene in *E. coli* and purification of the recombinant protein

FvNase was produced heterologously in *E. coli* BL21(DE3)Star and Rosetta-gami 2(DE3) using the high level expression vector pET-32a(+). For expression, a shaking culture was inoculated from an overnight culture to an OD<sub>600</sub> 0.05 in LB-media with 50 µg mL<sup>-1</sup> ampicillin and 25 µg mL<sup>-1</sup> chloramphenicol when Rosetta-gami 2(DE3) cells were used. The culture was incubated at 37 °C and 200 rpm until OD<sub>600</sub> ~0.6 was reached. 1 mM isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) was added to the culture and the cells were cultivated at 21 °C and 200 rpm for 20 h, harvested, resuspended in NPI 10 (50 mM NaHPO<sub>4</sub>; 300 mM NaCl; 10 mM imidazole, pH 8) prior homogenization by the precellys24 bead homogenizer (Peqlab, Göttingen, Germany), and the cell debris separated from the lysate via centrifugation (13000 rpm, 4 °C, 20 min).

The purification of the recombinant protein was performed using Ni-NTA (Macherey-Nagel, Düren, Germany) and the lysate was incubated for 1 h with the resins at 4 °C while shaking. The samples were washed five times with increasing imidazole concentrations up to 50 mM. After elution with 500 mM imidazole, the recombinant protein was desalted by using a precast Sephadex G-25 column (GE Healthcare, Freiburg, Germany).

#### 8.4.6. Formation of dipeptides by FvNase

The standard reaction mixture contained 200 mM Glu, Gln or Asn and 75 mM of a various amino acid (Table 8.1) in 50 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> pH 7. For the formation 25 µL of enzyme solution and 50 µL of the standard reaction mixture were mixed and incubated for 15 h at 37 °C. After incubation, the reaction was terminated by heating to 95 °C for 15 min. All enzyme incubations were carried out in a thermocycler (pegSTAR 2X Gradient Thermocycler, Peqlab, Erlangen, Germany). Negative controls were carried out as well, using the *E. coli* BL21(DE3)Star cells containing the empty pET-32a(+) vector or using only buffer system instead of enzyme solution or substrates, respectively.

#### 8.4.7. Detection of Glu-peptide formation

For the identification of peptide formation a high performance liquid chromatography coupled to a triple quadrupole mass analyzer was used (Varian 212 LC pump, Pro Star 325 UV-Vis detector, 320 TQ-MS mass spectrometer). The MS was operated simultaneously in the ESI positive and negative mode with a scan range of *m/z* 115-500. The MS parameters for ESI(+)/ESI(-) were: capillary voltage 30 V/-40 V; needle voltage 5000 V/-4500 V; nebulizer

gas (N<sub>2</sub>) 379 kPa; drying gas 207 kPa at 350 °C; detector 1200 V; dwell time 1000 mS and scan time 2 s. For HPLC, water and acetonitrile (MS-grade) which both contained 0.1 % formic acid, were used as mobile phase and a gradient was run: 5 % acetonitrile for 8 min, within the next 3 min 15 % acetonitrile were reached, 50 % acetonitrile were reached within the following 4 min. This step was followed by 100 % acetonitrile within the next 3 min and hold at 100 % for 5 min and back to start conditions within 5 min. The separation was performed on a Nucleodure C18 pyramid column (250 x 4 mm, 5 µm, Macherey-Nagel) at a flow rate of 0.3 mL min<sup>-1</sup>, whereas the column temperature was 30 °C. Sample application was 5 µl.

## 8.5. Results and discussion

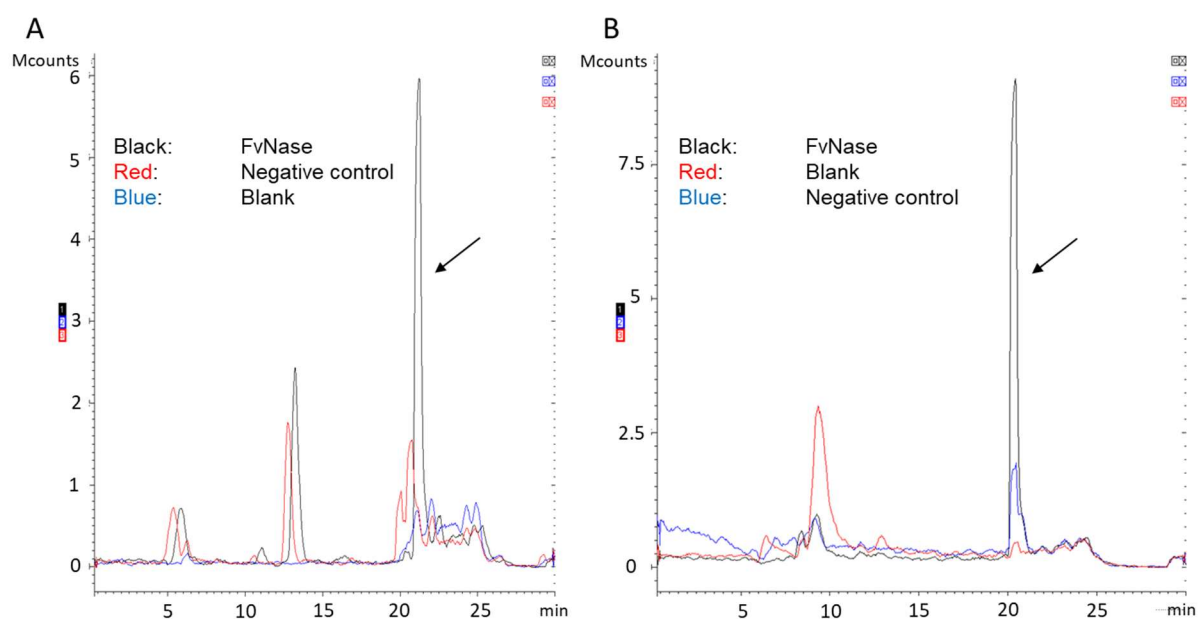
### 8.5.1. Heterologous expression of the recombinant FvNase (reFvNase) in *E. coli* and verification of transpeptidase activity

To express *fvnase* the gene was fused with a thioredoxin protein which is encoded in the pET32a(+) expression vector. The 109 amino acid peptide assists in proper folding and should prevent the reFvNase from precipitation. At first, the protein was produced in the *E. coli* expression strain BL21(DE3)Star, but only little active protein was observed after homogenization in the cell lysate, while inclusion bodies were found in the cell debris. Similar results were observed within the overexpression of an asparaginase from *Aspergillus terreus* in the *E. coli* expression host BL21(DE3) pLysS. The *Aspergillus* enzyme was also only detectable as inclusion bodies upon induction with 1 mM IPTG at 37°C [198]. Modifying the IPTG-induction concentration or incubation temperature as well as the incubation duration did not increase the solubility of FvNase in the *E. coli* cytoplasm (data not shown).

Parallel pilot studies on reFvNase transpeptidolytic activity were performed using the cell lysate of the expression host, containing the recombinant FvNase. As a negative control the lysate of *E. coli* BL21(DE3)Star containing the empty pET-32a(+) vector was used. Both cell lysates were concentrated via ultracentrifugation and treated equally. Subsequent incubation of various amino acids (Table 8.1; two at a time) was followed by MS analysis to conclude on dipeptide formation. After 15 h of incubation, new peaks in extracted ion chromatograms were observed. According to the expected *m/z* ratio several amino acid combinations such as Gln-Arg, Glu-Phe, Glu-Met, Asn-Arg, Asn-Phe, Asn-His, Asn-Asn and Asn-Trp were detected using reFvNase, while none of them were observed in the negative control (Table 8.1). Exemplarily, the filtered extracted ion chromatogram after incubation with reFvNase and the negative control with the amino acid combination Glu/Phe and Glu/Met are presented (Fig. 8.1).

**Table 8.1: Detection of potential dipeptide formation after incubation various amino acids with reFvNase.** Formation is based on the appearance of additional peaks compared to negative control and blank in extracted ion chromatogram and filtered of corresponding m/z.

Amino acid	Gln	Glu	Asn
Arg	×		×
Phe		×	×
Gln			
Gly			
Met		×	
Leu			
His			×
Thr			
Lys			
Asn			×
Trp			×

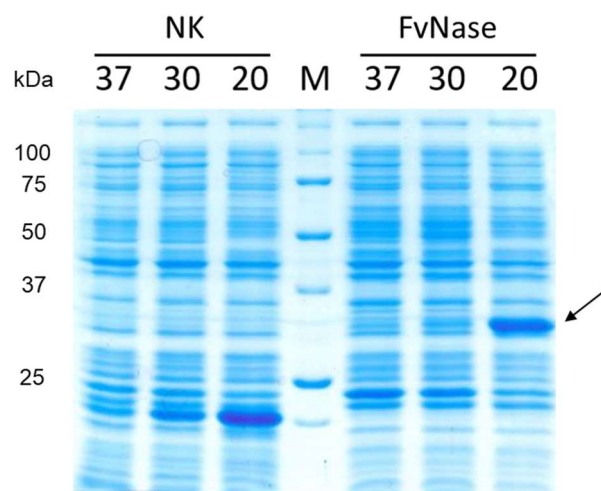


**Figure 8.1: Extracted ion chromatogram of dipeptide formation.** **A:** Filtered m/z= 295. reFvNase (black); negative control (red) after incubation in the presence of Glu and Phe for 15 h. Enzyme was incubated without substrate (blank, blue). **B:** Filtered m/z= 279. reFvNase (black); negative control (blue) after incubation in the presence of Glu and Met for 15 h. Enzyme was incubated without substrate (blank, red). New peak after 21 min is marked by an arrow.

After the incubation of Glu/Phe and Glu/Met, respectively, a new peak appeared after 21 min in the filtered  $m/z$  ratio 295, corresponding to a Glu-Phe dipeptide and 279, corresponding to a Glu-Met dipeptide, in the reFvNase sample (Fig. 8.1). These peaks were not detectable in the negative control or the blank. Furthermore, a relative decrease of the Phe peak area of about 6.7 % was noticed in comparison to the negative control. Glutaminases from *B. amyloliquefaciens* and *A. oryzae* showed comparable transpeptidase activity by generating  $\gamma$ -[Glu]<sub>n</sub>-Phe peptides. The peptides exhibited astringency, imparted a kokumi taste in water, and enhanced the umami intensity of soy sauce [194]. The decrease of the relative substrate peak of Met by 25.3 % was even more pronounced. *B. amyloliquefaciens* glutaminase catalyzed the formation of  $\gamma$ -[Glu]-Val or  $\gamma$ -[Glu]-Met which also exhibited the characteristics of kokumi and umami taste [199]. These results indicate that FvNase potentially possessed transpeptidase activity and catalyzed a peptidyl transfer reaction to gain amino dipeptides.

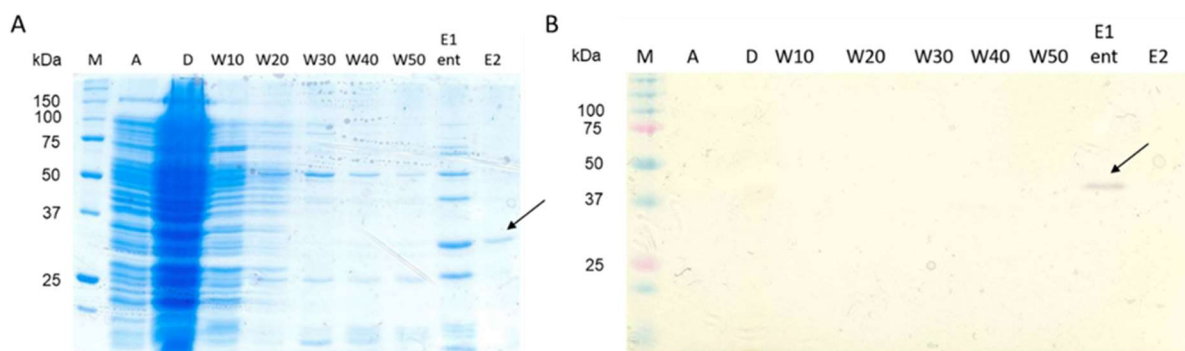
### 8.5.2. Optimization of FvNase expression and purification of the recombinant protein

Since the pilot application studies showed potential dipeptide formation, the aim was to increase the yield of generated soluble active enzyme. After the previous expression studies, the host was changed to Rosetta-gami 2(DE3) leading to a successful expression of the *fvnase* gene as soluble protein in the cell lysate after homogenization (Fig.8.2).



**Figure 8.2: Coomassie blue-stained denatured SDS-PAGE after Expression of *fvnase* by *E. coli* Rosetta-gami.** M: Marker; NK: *E. coli* Rosetta-gami lysate in which the empty pET-32a(+) vector was transformed before; FvNase: *E. coli* Rosetta-gami lysate in which the pET-32a(+)-*fvnase* vector was transformed before. 20: Incubation temperature 20 °C; 30: Incubation temperature 30 °C; 37: Incubation temperature 37 °C; Arrow: Indicates soluble reFvNase.

Cultivation at 20 °C was favorable for the solubility of the enzyme as shown by the appearance of the expected 31 kDa protein band on the SDS-gel. (Fig. 8.2, marked with an arrow). In the negative control, only the thioredoxin was detected with a molecular mass of about 18 kDa. An advantage of the Rosetta-gami strain as host compared to other *E. coli* strains is the enhanced disulfide bond formation. Additionally, an enhanced expression of eukaryotic proteins that contain codons rarely used in *E. coli* is possible, which attributed to the increased production of active and soluble reFvNase. Subsequent denatured SDS-PAGE after Ni-IMAC purification confirmed the purity of the target protein. A single band at about 31 kDa (arrow) was detected in the second elution fraction corresponding to the predicted molecular mass of thioredoxin and 6xHis-tag fused FvNase of 31.2 kDa (Fig. 8.3 A, arrow). The protein band was excised for mass spectrometric protein sequencing confirming the identity of the enzyme.



**Figure 8.3: Purification of reFvNase by IMAC and gel activity staining.** **A:** Coomassie blue-stained denatured SDS-PAGE after IMAC purification. **B:** Activity gel staining analyzing reFvNase glutaminase side activity. M: Marker; A: *E. coli* Rosetta-gami lysate of expressed reFvNase; D: column flow through; W10-W50: wash fractions; 10: 10 mM imidazole; 20: 20 mM imidazole; 30: 30 mM imidazole; 40: 40 mM imidazole; 50: 50 mM imidazole; E1 ent: desalted fraction after elution with 500 mM imidazole; E2: desalted fraction after second elution with 500 mM imidazole. Arrow indicates reFvNase.

A gel staining confirmed the glutaminase side activity of the FvNase in the purified fraction, since a single violet band was detected at about 37 kDa in the elution fraction (Fig. 8.3 B arrow). To ensure the successful separation of the reFvNase from the host asparaginase, a His-tag purification was conducted with a Rosetta-gami strain, in which only the empty pET32a(+) expression vector was transformed. A subsequent activity gel staining showed no colorization in the elution fractions of the negative control (data not shown). The violet dye band indicating reFvNase appeared a bit higher than on the denatured SDS-PAGE. The higher apparent molecular mass of reFvNase is most likely caused by the native gel electrophoresis. However, the molecular mass of *E. coli* asparaginase is 34 kDa, which is not in accordance with the detected violet stain band [200]. Hence, no activity was detected in the negative control, and the formation of the recombinant asparaginase activity was verified.



## **8.6. Conclusion**

The recombinant asparaginase produced by the *E. coli* Rosetta-gami strain showed potential competency for dipeptide formation, generating taste active compounds. These properties might lead to the application of reFvNase in the food industry. Optimization of heterologous production of active enzyme was realized by changing the host strain, optimized for eukaryotic protein expression. Further studies will aim at the observation of transpeptidolytic activity of purified reFvNase and following sensory tests.

## 9. Literaturverzeichnis

- [1] Mondal, A. and A.K. Datta, *Bread baking – A review*. Journal of Food Engineering, 2008. **86**(4): p. 465-474.
- [2] statista. *Food Report 2017 –Bread and Bakery Products*. 2017 [cited 19.06.18; 90].
- [3] statista. *Brot und Backwaren*. 2018 [cited 19.06.18].
- [4] Koutinas, A., A. Pandey, and C. Larroche, *Current topics on bioprocesses in food industry Vol II*. 1 ed. 2008, New Delhi: Asiatech Publishers.
- [5] Biesiekierski, J.R., *What is gluten?* Journal of Gastroenterology and Hepatology, 2017. **32**: p. 78-81.
- [6] Wieser, H., *Chemistry of gluten proteins*. Food Microbiology, 2007. **24**(2): p. 115-119.
- [7] Osborne, T.B., *The vegetable proteins*. 1909, London: Longmans, Green.
- [8] Wieser, H., *The precipitating factor in coeliac disease*. Baillière's Clinical Gastroenterology, 1995. **9**(2): p. 191-207.
- [9] Grosch, W. and H. Wieser, *Redox Reactions in Wheat Dough as Affected by Ascorbic Acid*. Journal of Cereal Science, 1999. **29**(1): p. 1-16.
- [10] Cauvain, S.P., *Breadmaking: Improving Quality*. 2012: Elsevier Science.
- [11] Heredia-Sandoval, G.N., et al., *Microbial Proteases in Baked Goods: Modification of Gluten and Effects on Immunogenicity and Product Quality*. Foods, 2016. **5**(3).
- [12] Hilhorst, R., et al., *Baking Performance, Rheology, and Chemical Composition of Wheat Dough and Gluten Affected by Xylanase and Oxidative Enzymes*. Journal of Food Science, 2008. **64**(5): p. 808-813.
- [13] Williamson, G., P.A. Kroon, and C.B. Faulds, *Hairy plant polysaccharides: a close shave with microbial esterases*. Microbiology, 1998. **144**: p. 2011-2023.
- [14] Mueller-Harvey, I., et al., *Linkage of p-coumaroyl and feruloyl groups to cell wall polysaccharides of barely straw*. Carbohydrate Research, 1986. **148**: p. 71-85.
- [15] Wong, D.W.S., *Feruloyl Esterase*. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2006. **133**: p. 87-112.
- [16] Courtin, C.M. and J.A. Delcour, *Arabinoxylans and Endoxylanases in Wheat Flour Bread-making*. Journal of Cereal Science, 2002. **35**(3): p. 225-243.
- [17] Kim, S.K. and B.L. D'Appolonia, *Bread staling studies. III. Effect of pentosans on dough, bread, and bread staling rate*. Cereal Chemistry, 1977. **54**: p. 225-229.
- [18] Kornbrust, B.A., T. Forman, and I. Matveeva, *19 - Applications of enzymes in breadmaking*, in *Breadmaking (Second Edition)*, S.P. Cauvain, Editor. 2012, Woodhead Publishing. p. 470-498.

- [19] Krishnarau, L. and R.C. Hosene, *Enzymes Increase Loaf Volume of Bread Supplemented with Starch Tailings and Insoluble Pentosans*. Journal of Food Science, 1994. **59**(6): p. 1251-1254.
- [20] Sivam Anusooya, S., et al., *Properties of Bread Dough with Added Fiber Polysaccharides and Phenolic Antioxidants: A Review*. Journal of Food Science, 2010. **75**(8): p. R163-R174.
- [21] Autio, K., *Effects of cell wall components on the functionality of wheat gluten*. Biotechnology Advances, 2006. **24**(6): p. 633-635.
- [22] Wang, M., et al., *Effect of Water Unextractable Solids on Gluten Formation and Properties: Mechanistic Considerations*. Journal of Cereal Science, 2003. **37**(1): p. 55-64.
- [23] Verjans, P., et al., *Selectivity for water-unextractable arabinoxylan and inhibition sensitivity govern the strong bread improving potential of an acidophilic GH11 *Aureobasidium pullulans* xylanase*. Food Chemistry, 2010. **123**: p. 331-337.
- [24] Wang, M., et al., *Interaction of water unextractable solids with gluten protein: effect on dough properties and gluten quality*. Journal of Cereal Science, 2003. **38**(1): p. 95-104.
- [25] Macritchie, F., *Baking Quality of Wheat Flours*, in *Advances in Food Research*, C.O. Chichester, E.M. Mrak, and B.S. Schweigert, Editors. 1984, Academic Press. p. 201-277.
- [26] Cauvain, S., *2 - Breadmaking: an overview*, in *Breadmaking (Second Edition)*, S.P. Cauvain, Editor. 2012, Woodhead Publishing. p. 9-31.
- [27] Bueno, M.M., R.C.S. Thys, and R.C. Rodrigues, *Microbial Enzymes as Substitutes of Chemical Additives in Baking Wheat Flour—Part I: Individual Effects of Nine Enzymes on Flour Dough Rheology*. Food and Bioprocess Technology, 2016. **9**(12): p. 2012-2023.
- [28] Curic, D., et al., *Design of a quality index for the objective evaluation of bread quality: Application to wheat breads using selected bake off technology for bread making*. Food Research International, 2008. **41**(7): p. 714-719.
- [29] Guarda, G., S. Padovan, and G. Delogu, *Grain yield, nitrogen-use efficiency and baking quality of old and modern Italian bread-wheat cultivars grown at different nitrogen levels*. European Journal of Agronomy, 2004. **21**(2): p. 181-192.
- [30] Kahaly, G., L. Frommer, and D. Schuppan, *Celiac Disease and Glandular Autoimmunity*. Nutrients, 2018. **10**(7).

- [31] Lionetti, E., et al., *Celiac disease from a global perspective*. Best Practice & Research Clinical Gastroenterology, 2015. **29**(3): p. 365-379.
- [32] van Heel, D.A. and J. West, *Recent advances in coeliac disease*. Gut, 2006. **55**(7): p. 1037-1046.
- [33] Green, P.H.R. and C. Cellier, *Celiac Disease*. New England Journal of Medicine, 2007. **357**(17): p. 1731-1743.
- [34] Cornell, H.J. and G. Wills-Johnson, *Structure-activity relationships in coeliac-toxic gliadin peptides*. Amino Acids, 2001. **21**(3): p. 243-253.
- [35] Shan, L., et al., *Structural Basis for Gluten Intolerance in Celiac Sprue*. Science, 2002. **297**(5590): p. 2275.
- [36] Gass, J., et al., *Combination Enzyme Therapy for Gastric Digestion of Dietary Gluten in Patients With Celiac Sprue*. Gastroenterology, 2007. **133**(2): p. 472-480.
- [37] König, J., et al., *Aspergillus Niger-Derived Enzyme AN-PEP Efficiently Degrades Gluten in the Stomach of Gluten-Sensitive Subjects*. Scientific Reports, 2016. **35**: p. S152.
- [38] DSM. *Tolerance-G Global leaflet\_August 2017*. 2017 05.09.2018].
- [39] Langen, G., K.-H. Kogel, and D. Wettstein, „*Glutenfreier“ Weizen : Neue Hoffnung für Zöliakiepatienten?* Vol. 28. 2011. 12-19.
- [40] Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 1970. **227**: p. 680-685.
- [41] *VERORDNUNG (EG) Nr. 1333/2008 DES EUROPÄISCHEN PARLAMENTS UND DES RATES vom 16. Dezember 2008 über Lebensmittelzusatzstoffe. Geändert durch VO(EU) 2018/682*. 2018.
- [42] Cauvain, S. and L. Young, *4 - Improvers*, in *Baking Problems Solved*, S. Cauvain and L. Young, Editors. 2001, Woodhead Publishing. p. 52-62.
- [43] Koehler, P., *Effect of Ascorbic Acid in Dough: Reaction of Oxidized Glutathione with Reactive Thiol Groups of Wheat Glutelin*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2003. **51**(17): p. 4954-4959.
- [44] Baltes, W. and R. Matissek, *Lebensmittelchemie*. Vol. 7. 2011, Berlin: Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 613.
- [45] Wassermann, L., *Was-sind-Backmittel?* Wissensforum Backwaren, 2009.
- [46] Stoica, A., et al., *L-cysteine influence on the physical properties of bread from high extraction flours with normal gluten*. Annals. Food Science and Technology, 2010. **11**(2): p. 6-10.

- [47] Brot+Backwaren, *Enzyme-magische Proteine*. Brot+Backwaren, 2008. **05**: p. 32-34.
- [48] *Bundesinstitut für Risikobewertung*. [cited 20.09.2018].
- [49] Butt, M.S., et al., *Xylanases and Their Applications in Baking Industry*. Food Technology and Biotechnology, 2008. **46**: p. 22-31.
- [50] Benedickt, G. and H. Huber, *Die Bestandteile von Backmitteln und Backmischungen fuer Brot und Kleingebaeck*. Wissensforum Backwaren, 2012.
- [51] Goesaert, H., et al., *Antifirming Effects of Starch Degrading Enzymes in Bread Crumb*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2009. **57**(6): p. 2346-2355.
- [52] Gass, J. and C. Khosla, *Prolyl endopeptidases*. Cellular and Molecular Life Sciences, 2007. **64**(3): p. 345-355.
- [53] Levitt, M., *Effect of proline residues on protein folding*. Journal of Molecular Biology, 1981. **145**(1): p. 251-263.
- [54] Walter, R., W.H. Simmons, and T. Yoshimoto, *Proline specific endo- and exopeptidases*. Molecular and Cellular Biochemistry, 1980. **30**(2): p. 111-127.
- [55] Mika, N., H. Zorn, and M. Rühl, *Prolyl-specific peptidases for applications in food protein hydrolysis*. Applied Microbiology and Biotechnology, 2015. **99**(19): p. 7837-7846.
- [56] Besedin, D.V. and G.N. Rudenskaya, *Proline-Specific Endopeptidases*. Russian Journal of Bioorganic Chemistry, 2003. **29**(1): p. 1-17.
- [57] Walter, R., et al., *Leucylglycinamide Released from Oxytocin by Human Uterine Enzyme*. Science, 1971. **173**(3999): p. 827.
- [58] Walter, R., *Partial purification and characterization of post-proline cleaving enzyme: Enzymatic inactivation of neurohypophyseal hormones by kidney preparations of various species*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Enzymology, 1976. **422**(1): p. 138-158.
- [59] Yoshimoto, T. and D. Tsuru, *Proline specific endopeptidase from Flavobacterium*. Agricultural and Biological Chemistry, 1978. **42**(12): p. 2417-2419.
- [60] Rea, D. and V. Fülöp, *Structure-function properties of prolyl oligopeptidase family enzymes*. Cell Biochemistry and Biophysics, 2006. **44**(3): p. 349-365.
- [61] Szeltner, Z. and L. Polgár, *Structure, Function and Biological Relevance of Prolyl Oligopeptidase*. Current Protein and Peptide Science, 2008. **9**(1): p. 96-107.
- [62] Fülöp, V., Z. Böcskei, and L. Polgár, *Prolyl Oligopeptidase: An Unusual  $\beta$ -Propeller Domain Regulates Proteolysis*. Cell, 1998. **94**(2): p. 161-170.

- [63] Polgár, L., *The prolyl oligopeptidase family*. Cellular and Molecular Life Sciences CMLS, 2002. **59**(2): p. 349-362.
- [64] Polgár, L., *Structural relationship between lipases and peptidases of the prolyl oligopeptidase family*. FEBS Letters, 1992. **311**(3): p. 281-284.
- [65] Ollis, D.L., et al., *The  $\alpha/\beta$  hydrolase fold*. Protein Engineering, 1992. **5**(3): p. 197-211.
- [66] Li, M., et al., *An induced-fit mechanism for prolyl endopeptidase*. Journal of Biological Chemistry, 2010. **285**(28): p. 21487-21495.
- [67] Voet, D.V., Judith G. / Pratt, Charlotte W, *Lehrbuch der Biochemie*. 2010: Wiley-VCH, Weinheim.
- [68] Edens, L., et al., *Extracellular Prolyl Endoprotease from Aspergillus niger and Its Use in the Debittering of Protein Hydrolysates*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005. **53**(20): p. 7950-7957.
- [69] Stepniak, D., et al., *Highly efficient gluten degradation with a newly identified prolyl endoprotease: implications for celiac disease*. American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology, 2006. **291**(4): p. G621-G629.
- [70] Toft-Hansen, H., et al., *Treatment of both native and deamidated gluten peptides with an endo-peptidase from Aspergillus niger prevents stimulation of gut-derived gluten-reactive T cells from either children or adults with celiac disease*. Clinical Immunology, 2014. **153**(2): p. 323-331.
- [71] Ding, G.-W., N.-D. Zhou, and Y.-P. Tian, *Over-Expression of a Proline Specific Aminopeptidase from Aspergillus oryzae JN-412 and Its Application in Collagen Degradation*. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2014. **173**(7): p. 1765-77.
- [72] FitzGerald, R.J. and G. O'Cuinn, *Enzymatic debittering of food protein hydrolysates*. Biotechnology Advances, 2006. **24**(2): p. 234-237.
- [73] Ishibashi, N., et al., *Taste of Proline-containing Peptides*. Agricultural and Biological Chemistry, 1988. **52**(1): p. 95-98.
- [74] Matoba, T. and T. Hata, *Relationship between Bitterness of Peptides and their Chemical Structures*. Agricultural and Biological Chemistry, 1972. **36**(8): p. 1423-1431.
- [75] Toelstede, S. and T. Hofmann, *Sensomics Mapping and Identification of the Key Bitter Metabolites in Gouda Cheese*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2008. **56**(8): p. 2795-2804.
- [76] García-Horsman, J.A., P.T. Männistö, and J.I. Venäläinen, *On the role of prolyl oligopeptidase in health and disease*. Neuropeptides, 2007. **41**(1): p. 1-24.

- [77] Nagatsu, T., *Prolyl oligopeptidase and dipeptidyl peptidase II/dipeptidyl peptidase IV ratio in the cerebrospinal fluid in Parkinson's disease: historical overview and future prospects*. Journal of Neural Transmission, 2017. **124**(6): p. 739-744.
- [78] MacKenzie, C.R., et al., *Induction of cellulolytic and xylanolytic enzyme systems in Streptomyces spp.* Applied and environmental microbiology, 1987. **53**(12): p. 2835-2839.
- [79] Faulds, C.B. and G. Williamson, *The purification and characterization of 4-hydroxy-3-methoxycinnamic (ferulic) acid esterase from Streptomyces olivochromogenes*. Journal of General Microbiology, 1991. **137**(10): p. 2339-2345.
- [80] Faulds, C. and G. Williamson, *Purification and characterization of a ferulic acid esterase (FAE-III) from Aspergillus niger: Specificity for the phenolic moiety and binding to microcrystalline cellulose*. Microbiology, 1994. **140**: p. 779-787.
- [81] Latha, G.M., P. Srinivas, and G. Muralikrishna, *Purification and Characterization of Ferulic Acid Esterase from Malted Finger Millet (Eleusine coracana, Indaf-15)*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2007. **55**(23): p. 9704-9712.
- [82] Sancho Ana, I., et al., *Characterisation of feruloyl esterase activity in barley*. Journal of the Science of Food and Agriculture, 1999. **79**(3): p. 447-449.
- [83] Andreasen, M.F., et al., *Esterase Activity Able To Hydrolyze Dietary Antioxidant Hydroxycinnamates Is Distributed along the Intestine of Mammals*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2001. **49**(11): p. 5679-5684.
- [84] Rashamuse, K., et al., *Metagenomic mining of feruloyl esterases from termite enteric flora*. Applied Microbiology and Biotechnology, 2014. **98**(2): p. 727-737.
- [85] Crepin, V.F., C.B. Faulds, and I.F. Connerton, *Functional classification of the microbial feruloyl esterases*. Applied Microbiology and Biotechnology, 2004. **63**(6): p. 647-652.
- [86] de Vries, R.P., et al., *The Aspergillus niger faeB gene encodes a second feruloyl esterase involved in pectin and xylan degradation and is specifically induced in the presence of aromatic compounds*. Biochemical Journal, 2002. **363**(Pt 2): p. 377-386.
- [87] Topakas, E., et al., *Purification and characterization of a type B feruloyl esterase (StFAE-A) from the thermophilic fungus Sporotrichum thermophile*. Applied Microbiology and Biotechnology, 2004. **63**(6): p. 686-690.
- [88] Vafiadi, C., et al., *The feruloyl esterase system of Talaromyces stipitatus: determining the hydrolytic and synthetic specificity of TsFaeC*. Journal of Biotechnology, 2006. **125**(2): p. 210-221.

- [89] Crepin, V.F., C.B. Faulds, and I.F. Connerton, *Identification of a type-D feruloyl esterase from Neurospora crassa*. Applied Microbiology and Biotechnology, 2004. **63**(5): p. 567-570.
- [90] Benoit, I., et al., *Biotechnological applications and potential of fungal feruloyl esterases based on prevalence, classification and biochemical diversity*. Biotechnology Letters, 2008. **30**(3): p. 387-396.
- [91] Dilokpimol, A., et al., *Diversity of fungal feruloyl esterases: updated phylogenetic classification, properties, and industrial applications*. Biotechnology for Biofuels, 2016. **9**(1): p. 231.
- [92] Moukouli, M., E. Topakas, and P. Christakopoulos, *Cloning, characterization and functional expression of an alkalitolerant type C feruloyl esterase from Fusarium oxysporum*. Applied Microbiology and Biotechnology, 2008. **79**(2): p. 245-254.
- [93] Brenner, S., *The molecular evolution of genes and proteins: a tale of two serines*. Nature, 1988. **334**: p. 528.
- [94] Dodson, G. and A. Wlodawer, *Catalytic triads and their relatives*. Trends in Biochemical Sciences, 1998. **23**(9): p. 347-352.
- [95] Udatha, D.B.R.K.G., et al., *The interplay of descriptor-based computational analysis with pharmacophore modeling builds the basis for a novel classification scheme for feruloyl esterases*. Biotechnology Advances, 2011. **29**(1): p. 94-110.
- [96] Carter, P. and J.A. Wells, *Dissecting the catalytic triad of a serine protease*. Nature, 1988. **332**: p. 564.
- [97] Prates, J.A.M., et al., *The Structure of the Feruloyl Esterase Module of Xylanase 10B from Clostridium thermocellum Provides Insights into Substrate Recognition*. Structure, 2001. **9**(12): p. 1183-1190.
- [98] Nieter, A., et al., *A halotolerant type A feruloyl esterase from Pleurotus eryngii*. Fungal Biology, 2014. **118**(3): p. 348-357.
- [99] Nieter, A., et al., *Heterologous production and characterization of a chlorogenic acid esterase from Ustilago maydis with a potential use in baking*. Food Chemistry, 2016. **209**: p. 1-9.
- [100] Linke, D., et al., *An esterase from the basidiomycete Pleurotus sapidus hydrolyzes feruloylated saccharides*. Applied Microbiology and Biotechnology, 2013. **97**(16): p. 7241-7251.
- [101] McAuley, K.E., et al., *Structure of a feruloyl esterase from Aspergillus niger*. Acta Crystallographica Section D, 2004. **60**(5): p. 878-887.



- [102] Hermoso, J.A., et al., *The Crystal Structure of Feruloyl Esterase A from Aspergillus niger Suggests Evolutionary Functional Convergence in Feruloyl Esterase Family*. Journal of Molecular Biology, 2004. **338**(3): p. 495-506.
- [103] Suzuki, K., et al., *Crystal structure of a feruloyl esterase belonging to the tannase family: A disulfide bond near a catalytic triad*. Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics, 2014. **82**(10): p. 2857-2867.
- [104] Mats, H., *Alpha Beta-Hydrolase Fold Enzymes Structures, Functions and Mechanisms*. Current Protein & Peptide Science, 2000. **1**(2): p. 209-235.
- [105] Andersen, A., et al., *Studies on ferulic acid esterase activity in fungal lipases and cutinases*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2002. **26**(1): p. 47-55.
- [106] Faulds Craig, B., et al., *Probing the determinants of substrate specificity of a feruloyl esterase, AnFaeA, from Aspergillus niger*. The FEBS Journal, 2005. **272**(17): p. 4362-4371.
- [107] Hunt, C.J., et al., *Insights into substrate binding of ferulic acid esterases by arabinose and methyl hydroxycinnamate esters and molecular docking*. Scientific Reports, 2017. **7**(1): p. 17315.
- [108] Gopalan, N., et al., *Review on technological and scientific aspects of feruloyl esterases: A versatile enzyme for biorefining of biomass*. Bioresource Technology, 2015. **193**: p. 534-544.
- [109] Record, E., et al., *Overproduction of the Aspergillus niger feruloyl esterase for pulp bleaching application*. Applied Microbiology and Biotechnology, 2003. **62**(4): p. 349-355.
- [110] Sigoillot, C., et al., *Comparison of different fungal enzymes for bleaching high-quality paper pulps*. Journal of Biotechnology, 2005. **115**(4): p. 333-343.
- [111] Tapin, S., et al., *Feruloyl Esterase Utilization for Simultaneous Processing of Nonwood Plants into Phenolic Compounds and Pulp Fibers*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2006. **54**(10): p. 3697-3703.
- [112] Tabka, M.G., et al., *Enzymatic saccharification of wheat straw for bioethanol production by a combined cellulase xylanase and feruloyl esterase treatment*. Enzyme and Microbial Technology, 2006. **39**(4): p. 897-902.
- [113] Crepin, V., *Ferulic Acid Esterases for Effective Processing of Plant Carbohydrates* 2003, University of Nottingham.
- [114] Kikuzaki, H., et al., *Antioxidant Properties of Ferulic Acid and Its Related Compounds*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2002. **50**: p. 2161-2168.

- [115] Graaf, E., *Antioxidant potential of ferulic acid*. Free Radical Biology and Medicine, 1992. **13**: p. 435-448.
- [116] Takahashi, T. and M. Miyazawa, *Tyrosinase inhibitory activities of cinnamic acid analogues*. Die Pharmazie - An International Journal of Pharmaceutical Sciences, 2010. **65**(12): p. 913-918.
- [117] Muheim, A. and K. Lerch, *Towards a high-yield bioconversion of ferulic acid to vanillin*. Applied Microbiology and Biotechnology, 1999. **51**: p. 456-461.
- [118] Linke, D., et al., *Cold generation of smoke flavour by the first phenolic acid decarboxylase from a filamentous ascomycete – Isaria farinosa*. Fungal Biology, 2017. **121**(9): p. 763-774.
- [119] Murakamia, A., et al., *FA15, a hydrophobic derivative of ferulic acid, suppresses inflammatory responses and skin tumor promotion: Comparison with ferulic acid*. Cancer Letters, 2002. **180**: p. 121–129.
- [120] Mori, H., et al., *Chemopreventive effects of ferulic acid on oral and rice germ on large bowel carcinogenesis*. Anticancer research, 1999. **19**: p. 3775-3778.
- [121] Chen, J., et al., *Biodegradation of Cell Wall Components of Maize Stover Colonized by White-Rot Fungi and Resulting Impact on In-Vitro Digestibility*. Science of Food and Agriculture, 1995. **68**: p. 91-98.
- [122] Topakas, E., C. Vafiadi, and P. Christakopoulos, *Microbial production, characterization and applications of feruloyl esterases*. Process Biochemistry, 2007. **42**(4): p. 497-509.
- [123] Esparan, V., R.G. Berger, and U. Krings, *Laccase catalyzed generation of lignans in a biphasic system*. Advances in Food Sciences, 2015. **37**(4): p. 169-176.
- [124] Backes, M., et al., *Specific vanillyl lignans and use thereof as taste improvers*. 2014, SYMRISE AG, Holzminden (DE).
- [125] Panesar, P.S., S.S. Marwaha, and H.K. Chopra, *Enzymes in Food Processing: Fundamentals and Potential Applications*. 1 ed. 2010, New Delhi: I,K, International Publishing House Pvt. Ltd.
- [126] Gruppen, H., F.J.M. Kormelink, and A.G.J. Voragen, *Enzymic Degradation of Water-unextractable Cell Wall Material and Arabinoxylans from Wheat Flour*. Journal of Cereal Science, 1993. **18**: p. 129-143.
- [127] Scalbert, A., et al., *Ether linkage between phenolic acids and lignin fractions from wheat straw*. Phytochemistry, 1985. **24**(6): p. 1359-1362.

- [128] Borneman, W.S., et al., *Feruloyl and p-coumaroyl esterase from anaerobic fungi in relation to plant cell wall degradation*. Applied Microbiology and Biotechnology, 1990. **33**: p. 345-351.
- [129] Allerdings, E., et al., *Isolation and structural identification of complex feruloylated heteroxylan side-chains from maize bran*. Phytochemistry, 2006. **67**(12): p. 1276-1286.
- [130] Nieter, A., et al., *A chlorogenic acid esterase with a unique substrate specificity from Ustilago maydis*. Applied and Environmental Microbiology, 2015. **81**(5): p. 1679-1688.
- [131] Sambrook, J. and D.W. Russell, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3 ed. 2001, Cold Spring Harbour, New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press.
- [132] Petersen, T.N., et al., *SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions*. Nature Methods, 2011. **8**(10): p. 785-786.
- [133] Zelena, K., U. Krings, and R.G. Berger, *Functional expression of a valencene dioxygenase from Pleurotus sapidus in E. coli*. Bioresource Technology, 2012. **108**: p. 231-239.
- [134] Bajaj, B.K. and K. Manhas, *Production and characterization of xylanase from Bacillus licheniformis P11(C) with potential for fruit juice and bakery industry*. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 2012. **1**(4): p. 330-337.
- [135] Collins, T., et al., *Use of glycoside hydrolase family 8 xylanases in baking*. Journal of Cereal Science, 2006. **43**(1): p. 79-84.
- [136] Fillingham, I.J., et al., *A modular cinnamoyl ester hydrolase from the anaerobic fungus Piromyces equi acts synergistically with xylanase and is part of a multiprotein cellulose-binding cellulase-hemicellulase complex*. Biochemical Journal, 1999. **343**: p. 215-224.
- [137] Koseki, T., et al., *Occurrence, properties, and applications of feruloyl esterases*. Applied Microbiology and Biotechnology, 2009. **84**(5): p. 803-810.
- [138] Nieter, A., et al., *Feruloyl esterases from Schizophyllum commune to treat food industry side-streams*. Bioresource Technology, 2016. **220**: p. 38-46.
- [139] Chandrasekharaiah, M., et al., *Expression and biochemical characterization of two novel feruloyl esterases derived from fecal samples of Rusa unicolor and Equus burchelli*. Gene, 2012. **500**(1): p. 134-139.
- [140] Shin, H.D. and R.R. Chen, *A type B feruloyl esterase from Aspergillus nidulans with broad pH applicability*. Applied Microbiology and Biotechnology, 2007. **73**(6): p. 1323-1330.
- [141] Wu, M., et al., *New feruloyl esterases to access phenolic acids from grass biomass*. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2012. **168**(1): p. 129-143.

- [142] Chandrasekharaiah, M., et al., *Molecular cloning, expression and characterization of a novel feruloyl esterase enzyme from the symbionts of termite (Coptotermes formosanus) gut*. BMB Reports, 2011. **44**(1): p. 052-057.
- [143] McClendon, S.D., H.D. Shin, and R.R. Chen, *Novel bacterial ferulic acid esterase from Cellvibrio japonicus and its application in ferulic acid release and xylan hydrolysis*. Biotechnology Letters, 2011. **33**(1): p. 47-54.
- [144] Li, J., et al., *Three feruloyl esterases in Cellulosilyticum ruminicola H1 act synergistically to hydrolyze esterified polysaccharides*. Applied and Environmental Microbiology, 2011. **77**(17): p. 6141-6147.
- [145] Donaghy, J.A., et al., *Purification and characterization of an extracellular feruloyl esterase from the thermophilic anaerob Clostridium stercorarium*. Journal of Applied Microbiology, 2000. **88**: p. 458-466.
- [146] Benoit, I., et al., *Feruloyl esterases as a tool for the release of phenolic compounds from agro-industrial by-products*. Carbohydrate Research, 2006. **341**(11): p. 1820-1827.
- [147] Uraji, M., et al., *Application of two newly identified and characterized feruloyl esterases from Streptomyces sp. in the enzymatic production of ferulic acid from agricultural biomass*. PLoS One, 2014. **9**(8): p. e104584.
- [148] Jiang, Z., et al., *Improvement of the breadmaking quality of wheat flour by the hyperthermophilic xylanase B from Thermotoga maritima*. Food Research International, 2005. **38**(1): p. 37-43.
- [149] Camacho, N.A. and G. Aguilar O, *Production, Purification, and Characterization of a Low-Molecular-Mass Xylanase from Aspergillus sp. and Its Application in Baking*. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2003. **104**: p. 159-171.
- [150] Faulds, C.B., et al., *Specificity of feruloyl esterases for water-extractable and water-unextractable feruloylated polysaccharides: influence of xylanase*. Journal of Cereal Science, 2003. **38**(3): p. 281-288.
- [151] Goesart, H., et al., *Wheat flour constituents: how they impact bread quality, and how to impact their functionality*. Trends in Food Science & Technology, 2005. **16**(1-3): p. 12-30.
- [152] Mitea, C., et al., *Efficient degradation of gluten by a prolyl endoprotease in a gastrointestinal model: implications for coeliac disease*. Gut, 2008. **57**(1): p. 25-32.
- [153] Service, U.F.A. *wheat harvest world wide wheat crop 2016/2017* [04.04.2018].
- [154] Service, U.F.A. *wheat crop area world wide*. 2018 [04.04.2018].

- [155] Mangione, R.A. and P.N. Patel, *Caring for patients with celiac disease: The role of the pharmacist*. Journal of the American Pharmacists Association, 2008. **48**(5): p. e125-e139.
- [156] Kang, C., X.-W. Yu, and Y. Xu, *Purification and characterization of a prolyl endopeptidase isolated from Aspergillus oryzae*. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2014. **41**(1): p. 49-55.
- [157] Sattar, A.K.M.A., et al., *Purification and Characterization of an Extracellular Prolyl Endopeptidase from Agaricus bisporus*. The Journal of Biochemistry, 1990. **107**(2): p. 256-263.
- [158] Chen, J.-T., et al., *Screening, purification, and characterization of an extracellular prolyl oligopeptidase from Coprinopsis clastophylla*. Journal of Microbiology, 2012. **50**(4): p. 652-659.
- [159] Grimath, A., et al., *Koji fermentation based on extracellular peptidases of Flammulina velutipes*. European Food Research and Technology, 2011. **232**(3): p. 415-424.
- [160] Giesler, L., et al., *Hydrolysis of Wheat Gluten by Combining Peptidases of Flammulina velutipes and Electrodialysis*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2013. **61**(36): p. 8641-8649.
- [161] Jin, F.J., et al., *Development of a novel quadruple auxotrophic host transformation system by argB gene disruption using adeA gene and exploiting adenine auxotrophy in Aspergillus oryzae*. FEMS Microbiology Letters, 2004. **239**(1): p. 79-85.
- [162] Eisele, N., et al., *Heterologous expression, refolding and characterization of a salt activated subtilase from Pleurotus ostreatus*. Process Biochemistry, 2011. **46**(9): p. 1840-1846.
- [163] Schulz, K., et al., *A type D ferulic acid esterase from Streptomyces werraensis affects the volume of wheat dough pastries*. Applied Microbiology and Biotechnology, 2018. **102**(3): p. 1269-1279.
- [164] Linke, D., et al., *Carotene-degrading activities from Bjerkandera adusta possess an application in detergent industries*. Bioprocess and Biosystems Engineering, 2015. **38**(6): p. 1191-1199.
- [165] Matz, M., et al., *Amplification of cDNA ends based on template-switching effect and step-out PCR*. Nucleic Acids Research, 1999. **27**(6): p. 1558-1560.
- [166] Shi, X.Z. and S. Kaminskyj, *5' RACE by tailing a general template-switching oligonucleotide*. Biotechniques, 2001. **29**(6): p. 1192-5.

- [167] Božić, N. and Z. Vujčić, *Detection and quantification of leucyl aminopeptidase after native electrophoresis using leucine-p-nitroanilide*. ELECTROPHORESIS, 2005. **26**(12): p. 2476-2480.
- [168] Wagh, S.K., P.P. Gadge, and M.V. Padul, *Significant Hydrolysis of Wheat Gliadin by Bacillus tequilensis (10bT/HQ223107): a Pilot Study*. Probiotics Antimicrobial Proteins, 2017: p. 9331-5.
- [169] Behrens, C.J., et al., *Variants of PpuLcc, a multi-dye decolorizing laccase from Pleurotus pulmonarius expressed in Pichia pastoris*. Protein Expression and Purification, 2017. **137**: p. 34-42.
- [170] Salamin, K., et al., *AoS28D, a proline-Xaa carboxypeptidase secreted by Aspergillus oryzae*. Applied Microbiology and Biotechnology, 2017. **101**(10): p. 4129-4137.
- [171] Kubota, K., M. Tanokura, and K. Takahashi, *Purification and characterization of a novel prolyl endopeptidase from Aspergillus niger*. Proceedings of the Japan Academy, 2005. **Ser. B**(81): p. 7.
- [172] Wang, M.-X., et al., *Study on a prolyl endopeptidase from the skeletal muscle of common carp (Cyprinus carpio)*. Process Biochemistry, 2012. **47**(12): p. 2211-2218.
- [173] Chao, J., L. Chao, and H.S. Margolius, *Identification of a kallikrein-like latent serine protease in human erythrocyte membranes*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1984. **121**(2): p. 722-729.
- [174] Yoshimoto, T., et al., *Studies on Prolyl Endopeptidase from Shakashimeji (Lyophyllum cinerascens): Purification and Enzymatic Properties*. The Journal of Biochemistry, 1988. **104**(4): p. 622-627.
- [175] Welches, W.R., K. Bridget Brosnihan, and C.M. Ferrario, *A comparison of the properties and enzymatic activities of three angiotensin processing enzymes: Angiotensin converting enzyme, prolyl endopeptidase and neutral endopeptidase 24.11*. Life Sciences, 1993. **52**(18): p. 1461-1480.
- [176] Shan, L., et al., *Identification and Analysis of Multivalent Proteolytically Resistant Peptides from Gluten: Implications for Celiac Sprue*. Journal of Proteome Research, 2005. **4**(5): p. 1732-1741.
- [177] Shan, L., et al., *Comparative biochemical analysis of three bacterial prolyl endopeptidases: implications for coeliac sprue*. Biochemical Journal, 2004. **383**(2): p. 311.

- [178] Kang, C., X.-w. Yu, and Y. Xu, *Gene cloning and enzymatic characterization of an endoprotease Endo-Pro-Aspergillus niger*. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2013. **40**(8): p. 855-64.
- [179] Tanner, G., *Gluten, Celiac Disease, and Gluten Intolerance and the Impact of Gluten Minimization Treatments with Prolylendopeptidase on the Measurement of Gluten in Beer*. Journal of the American Society of Brewing Chemists, 2014. **72**: p. 36-50.
- [180] Szeltner, Z., et al., *Electrostatic environment at the active site of prolyl oligopeptidase is highly influential during substrate binding*. The Journal of Biological Chemistry, 2003. **278**.
- [181] Soisson, S.M., et al., *Structural definition and substrate specificity of the S28 protease family: the crystal structure of human prolylcarboxypeptidase*. BMC Structural Biology, 2010. **10**(1): p. 16.
- [182] Eisele, N., et al., *The first characterized asparaginase from a basidiomycete, Flammulina velutipes*. Bioresource Technology, 2011. **102**(3): p. 3316-21.
- [183] Xu, F., M.-J. Oruna-Concha, and J.S. Elmore, *The use of asparaginase to reduce acrylamide levels in cooked food*. Food Chemistry, 2016. **210**(Supplement C): p. 163-171.
- [184] Zuo, S., et al., *Recent research progress on microbial l-asparaginases*. Applied Microbiology and Biotechnology, 2015. **99**(3): p. 1069-1079.
- [185] Lopes, A.M., et al., *Therapeutic l-asparaginase: upstream, downstream and beyond*. Critical Reviews in Biotechnology, 2017. **37**(1): p. 82-99.
- [186] Suld, H.M. and P.A. Herbut, *Guinea Pig Serum and Liver l-Asparaginases: Comparison of serum and papain-digested liver L-asparaginases*. Journal of Biological Chemistry, 1970. **245**(11): p. 2797-2801.
- [187] Fu, C.H. and K.M. Sakamoto, *PEG-asparaginase*. Expert Opinion on Pharmacotherapy, 2007. **8**(12): p. 1977-1984.
- [188] Ito, K., K. Matsushima, and Y. Koyama, *Gene Cloning, Purification, and Characterization of a Novel Peptidoglutaminase-Asparaginase from Aspergillus sojae*. Applied and Environmental Microbiology, 2012. **78**(15): p. 5182-5188.
- [189] Zhao, C.J., A. Schieber, and M.G. Gänzle, *Formation of taste-active amino acids, amino acid derivatives and peptides in food fermentations – A review*. Food Research International, 2016. **89**(Part 1): p. 39-47.

- [190] Toelstede, S., A. Dunkel, and T. Hofmann, *A Series of Kokumi Peptides Impart the Long-Lasting Mouthfulness of Matured Gouda Cheese*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2009. **57**(4): p. 1440-1448.
- [191] Tachiki, T., et al., *Purification and Some Properties of Glutaminase from Pseudomonas nitroreducens IFO 12694*. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 1996. **60**(7): p. 1160-1164.
- [192] Itoh, T., et al., *Production of l-theanine using glutaminase encapsulated in carbon-coated mesoporous silica with high pH stability*. Biochemical Engineering Journal, 2012. **68**(Supplement C): p. 207-214.
- [193] Soda, K., M. Ohshima, and T. Yamamoto, *Purification and properties of isozymes of glutaminase from Pseudomonas aeruginosa*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1972. **46**(3): p. 1278-1284.
- [194] Yang, J., et al., *Synthesis and Sensory Characteristics of Kokumi  $\gamma$ -[Glu] $n$ -Phe in the Presence of Glutamine and Phenylalanine: Glutaminase from Bacillus amyloliquefaciens or Aspergillus oryzae as the Catalyst*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2017. **65**(39): p. 8696-8703.
- [195] Schindler, A., et al., *Discovery of Salt Taste Enhancing Arginyl Dipeptides in Protein Digests and Fermented Fish Sauces by Means of a Sensomics Approach*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2011. **59**(23): p. 12578-12588.
- [196] Careri, M., et al., *Sensory Property Relationships to Chemical Data of Italian-type Dry-cured Ham*. Journal of Food Science, 1993. **58**(5): p. 968-972.
- [197] LaVallie, E.R., et al., *A Thioredoxin Gene Fusion Expression System That Circumvents Inclusion Body Formation in the E. coli Cytoplasm*. Bio/Technology, 1993. **11**: p. 187.
- [198] Saeed, H., et al., *Molecular cloning, structural modeling and production of recombinant Aspergillus terreus L. asparaginase in Escherichia coli*. International Journal of Biological Macromolecules, 2018. **106**(Supplement C): p. 1041-1051.
- [199] Yang, J., et al., *Comparison of kokumi  $\gamma$ -[Glu] $(n>1)$ -Val and  $\gamma$ -[Glu] $(n>1)$ -Met synthesized through transpeptidation catalyzed by glutaminase from Bacillus amyloliquefaciens*. Food Chemistry, 2018. **247**: p. 89-97.
- [200] Maita, T. and G. Matsuda, *The Primary Structure of L-Asparaginase from Escherichia coli*. Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie, 1980. **361**(2): p. 105-117.



## 10. Lebenslauf

### Persönliches

Name: Kathrin Schulz  
Geburtsdatum: 01.03.1988 in Wolfenbüttel

### Ausbildung

Seit Juli 14 Wissenschaftliche Mitarbeiterin / Doktorandin am Institut für Lebensmittelchemie, Leibniz Universität Hannover

Okt. 11-Jan.14 Masterstudium: *Life Science*, Leibniz Universität Hannover  
Abschluss: *Master of Science* (1,6); Masterarbeit: Characterization of the architecture of the Type VII secretion system in *Bacillus subtilis* (1,3)

Okt. 08-11 Bachelorstudium: Life Science, Leibniz Universität Hannover  
Abschluss: *Bachelor of Science* (1,5); Bachelorarbeit: Zweidimensionale dynamische Kultivierung von mesenchymalen Stammzellen (1,0)

Okt. 07-08 *Work and Travel* in Australien und Neuseeland

Jul.01-07 Abitur, Gymnasium Martino-Katharineum, Braunschweig

### Beruflicher Werdegang

Mai 13-Nov.13 Praktikum am Department of Molecular and Cellular Biology an der Harvard University, Arbeitsgruppe: Prof. Dr. Briana Burton, Cambridge, USA (Masterarbeit)

Sept.12-Dez.12 Praktikum am Antimicrobial Discovery Center an der Northeastern University, Arbeitsgruppe: Prof. Dr. Kim Lewis, Boston, USA

Feb.12-Apr.12 Praktikum am Department of Chemistry and Biochemistry an der California Polytechnic State University, Arbeitsgruppe: Prof. Dr. John Marlier, San Luis Obispo, USA