

Neue Peptidasen aus Basidiomyceten für die Glutenhydrolyse

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover
zur Erlangung des Grades

Doktorin der Naturwissenschaften
Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation von

M.Sc. Dipl.-Ing.(FH)

Aletta Grimrath

geboren am 19. Juni 1980 in Neustadt am Rübenberge

Referent: Prof. Dr. Dr. Ralf G. Berger

Korreferent: Prof. Dr. Thomas Scheper

Tag der Promotion: 01.04.2011

Danksagung

Herr Prof. Dr. Dr. Ralf G. Berger, Leiter des Instituts für Lebensmittelchemie an der Leibniz Universität Hannover, hat diese Arbeit wissenschaftlich betreut. Ich danke ihm sehr für die Bereitstellung des vielseitigen und interessanten Themas und die vielen wertvollen Anregungen und Hinweise.

Herrn Prof. Dr. Thomas Scheper danke ich für die freundliche Übernahme des zweiten Referats und Herrn Prof. Dr. Andreas Hahn für die freundliche Übernahme des Prüfungsvorsitzes.

Frau Dr. Diana Linke danke ich für die Betreuung, Zusammenarbeit und stete Diskussionsbereitschaft während der gesamten Promotion. Mein Dank gilt auch Herrn PD Dr. Ulrich Krings für die gute Zusammenarbeit.

Herrn Dr. Manfred Nimtz (Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung GmbH, Braunschweig) möchte ich für die Sequenzierung von zahlreichen Peptiden mittels ESI-MS/MS sowie MALDI Peptid Mapping danken.

Auch bei der Firma Nestlé möchte ich mich für die stets gute Zusammenarbeit bedanken.

Des Weiteren gilt mein Dank auch allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Lebensmittelchemie für ein hervorragendes Arbeitsklima und viele inspirierende Diskussionen.

Außerdem danke ich meiner Familie für ihre stete Unterstützung dieses Vorhabens und ganz besonders meinem Mann Constantin Reese, der mir immer mit Rat und Hilfe zur Seite gestanden hat.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	IV
Zusammenfassung	V
Abstract	VII
1 Einleitung	1
1.1 Einteilung und katalytischer Mechanismus von Peptidasen	1
1.2 Biotechnologisches Potential von Basidiomyceten	3
1.3 Peptidasen für die Glutenhydrolyse	4
1.4 Erzeugung von Aromastoffen aus Gluten mit Basidiomyceten	9
1.5 <i>Flammulina velutipes</i> und <i>Laetiporus sulphureus</i> , zwei interessante Basidiomyceten für die Glutenhydrolyse	9
1.6 Zielsetzung	11
2 Ergebnisse	12
2.1 Koji fermentation based on extracellular peptidases of <i>Flammulina velutipes</i>	12
2.1.1 Abstract	12
2.1.2 Introduction	13
2.1.3 Materials and methods	15
2.1.4 Results and Discussion	18
2.1.5 Conclusions	27
2.2 Identifizierung und Charakterisierung extrazellulärer Peptidasen von <i>F. velutipes</i>	28
2.2.1 Detektion verschiedener Enzymaktivitäten mit dem API-ZYM [®] Assay	28
2.2.2 Identifizierung der Peptidasen im Kulturunterstand	29
2.2.3 Charakterisierung der Peptidasen im Kulturüberstand	32
2.3 Konzentrierung und Aufreinigung von Peptidasen aus <i>F. velutipes</i> Kulturunterständen	39
2.3.1 Vorreinigung des Peptidasegemisches mittels Hydrophober Interaktionschromatografie	39
2.3.2 Aufreinigung einzelner Peptidasen aus dem Peptidasekonzentrat mittels präparativer PAGE	41

2.3.3	Aufreinigung einzelner Peptidasen aus dem Peptidasekonzentrat mittels Ionenaustauschchromatografie (IEX).....	43
2.4	Sequenzierung und Charakterisierung der aufgereinigten Peptidasen aus <i>F. velutipes</i>	46
2.4.1	Sequenzierung.....	46
2.4.2	Bestimmung der Molmasse.....	56
2.4.3	Bestimmung der Substrat- und Spaltstellenspezifität.....	59
2.4.4	Bestimmung der optimalen Reaktionsbedingungen für Fvp150, Fvp37 und Fvp27	68
2.4.5	Bestimmung der Temperatur- und Langzeitstabilität der Peptidasen	74
2.4.6	Zusammenfassung der Charakterisierung der aufgereinigten Peptidasen	75
2.5	Formation of Sotolon – Enzyme Catalysis or Chemical Reaction?.....	77
2.5.1	Abstract.....	77
2.5.2	Introduction	78
2.5.3	Experimental	79
2.5.4	Results	80
3	Diskussion.....	83
4	Material und Methoden.....	101
4.1	Kultivierung.....	101
4.2	Medien.....	102
4.3	Kulturführung	102
4.4	Bestimmung der Peptidaseaktivität	104
4.4.1	Bestimmung der Peptidaseaktivität mit Azocasein.....	104
4.4.2	Bestimmung der Peptidaseaktivität mit Azogelatine	104
4.4.3	Bestimmung der Peptidaseaktivität mit Gelatinezymografie	105
4.4.4	Bestimmung der Peptidaseaktivität mit synthetischen Peptiden und BSA.....	105
4.5	Aufreinigung von Peptidasen.....	107
4.5.1	Analytische und präparative Isoelektrische Fokussierung (IEF)...	107
4.5.2	Analytische und präparative Polyacrylamid Gelelektrophorese (PAGE).....	107
4.5.3	Färbungen.....	111
4.5.4	FPLC.....	112

4.6	Peptidaseinhibition	114
4.7	Terminologie der Spaltstellenspezifität	115
4.8	Bestimmung der Substratspezifität mit RP-HPLC.....	116
4.9	Bestimmung der Schnittstellenspezifität mit Edman Abbau.....	117
4.10	Peptidsequenzierung.....	118
4.11	Allgemeine Geräte.....	119
4.12	Chemikalien für Proteinaufreinigung und Charakterisierung	119
4.13	Lösungsmittel	122
4.14	Chemikalien für Nährmedien	122
4.15	Entsorgungshinweise	123
5	Anhang.....	124
5.1	Kultivierung von <i>F. velutipes</i> auf Glutenpellets.....	124
5.2	Präparative Isoelektrische Fokussierung.....	126
5.3	FPLC Chromatogramme	127
5.3.1	Hydrophobe Interaktionschromatografie (HIC).....	127
5.3.2	Größenausschlusschromatografie (SEC).....	138
5.3.3	Inenaustauschchromatografie (IEX).....	141
5.4	RP-HPLC Chromatogramme	149
6	Verzeichnisse	161
6.1	Literaturverzeichnis	161
6.2	Tabellenverzeichnis.....	169
6.3	Abbildungsverzeichnis.....	171

Abkürzungsverzeichnis

AA / BAA	Acrylamid / Bisacrylamid
Ad	auffüllen auf
aU	Arbitrary Unit (relative Maßeinheit, die individuell definiert wird)
CBS	Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn (Niederlande)
DSMZ	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
h	Stunde
HIC	Hydrophobe Interaktionschromatografie
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatografie
IEX	Ionenaustauschchromatografie
kDa	Kilodalton
kU	Kilounit
min	Minuten
MU	Megaunit
MaU	Mega arbitrary Unit
MWCO	“molecular weight cut off“ (Größenausschluss)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
RP-HPLC	Umkehrphasen HPLC (reversed phase)
SEC	Größenausschlusschromatografie (size exclusion chromatography)
ssp.	Subspecies
TOF-MS	Time-of-flight mass spectrometry
U	Unit ($\mu\text{mol min}^{-1}$)
% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	Massenkonzentration

Aminosäuren werden nach dem internationalen Ein- und Dreibuchstabencode abgekürzt.

Zusammenfassung

Die enzymatische Hydrolyse von Weizengluten wird für die Herstellung von Würzmitteln durchgeführt und stellt eine Alternative zu der auch heute noch vielfach verwendeten Salzsäurehydrolyse dar, da letztere Methode wegen unerwünschten Nebenprodukten (Chlorpropanole) und hohen Natriumchloridkonzentrationen kritisch gesehen wird. Bei der enzymatischen Hydrolyse des Glutens werden diese Probleme zwar umgangen, jedoch wird mit den bisher industriell eingesetzten Peptidasen nur ein unbefriedigender Hydrolysegrad von 35 – 40 % erreicht, weshalb die Notwendigkeit zur Suche nach alternativen Enzymen besteht. Das Ziel dieser Arbeit war, Peptidasen aus Basidiomyceten zu identifizieren, die erfolgreich für die enzymatische Glutenhydrolyse eingesetzt werden können.

Peptidasen aus dem Basidiomyceten *Flammulina velutipes* konnten Gluten effektiv hydrolysieren. Die identifizierten Enzyme ergänzten sich in ihrer katalytischen Aktivität, so dass ein Hydrolysegrad von 63 % des Glutens erreicht wurde. Die erhaltenen Hydrolysate hatten einen angenehmen Geruch und waren nicht bitter.

In einem Screening wurden 28 Basidiomyceten in glutenreichem Minimalmedium kultiviert und mehrere potente Arten identifiziert. Besonders *F. velutipes* zeigte hohe Abbauraten und generierte acht extrazelluläre Peptidasen. Zur Optimierung der Peptidaseproduktion wurde der Pilz auf verschiedenen Substraten kultiviert, wobei sich die höchste Peptidaseaktivität in Kulturen erzielen ließ, in denen *F. velutipes* in Oberflächenkultur mit feuchtem, pelletiertem Gluten als Substrat wuchs.

Von den *F. velutipes* Peptidasen wurden fünf aufgereinigt und teilweise charakterisiert. Auch Substrat- und Spaltspezifitäten konnten ermittelt werden. Von vier Peptidasen wurden außerdem Partialsequenzen erhalten, die eine Zuordnung zu verschiedenen Peptidasefamilien ermöglichten. Die identifizierten Peptidasen waren eine Serinendopeptidase (Subtilase) der Unterfamilie "Peurotus ostreatus-type Peptidase" (S08.139) mit einer Molmasse von 37 kDa und optimalen Reaktionsbedingungen bei 40 °C und pH 7,5 und eine prolylspezifische Serinpeptidase mit hohen Homologien zur Gruppe der "Acid prolyl Endopeptidasen" (Familie S28.004), einer Molmasse von 49 kDa und maximaler Aktivität bei 45 °C und pH 6. Eine weitere Peptidase mit einer Molmasse von 59 kDa wies keine Homologien zu bekannten Peptidasen auf, wurde aber durch Inhibitionsversuche der Gruppe der Metallopeptidasen zugeordnet. Sie zeigte optimale Aktivität bei 40 °C und pH 6,0. Des Weiteren wurden noch eine weitere 12,9 kDa große

Metallopeptidase, die zu den Deuterolysinen (Familie M35) gehört und eine Serincarboxypeptidase (Familie S41) identifiziert.

Auch *Laetiporus sulphureus* zeigte bei der Kultivierung eine besondere Eigenschaft, indem er beim Abbau von Gluten nach Fleischbrühe riechende Aromastoffe generierte. Mittels GC-MS wurden viele potente, heterocyclische Aromastoffe nachgewiesen, unter anderem auch Sotolon (3-Hydroxy-4,5-dimethyl-2[5H]-furanon), dessen Bildung durch die gezielte Zugabe des Präkursors Isoleucin verstärkt wurde. Geringe Mengen an 4-Hydroxyisoleucin konnten auch im Kulturüberstand nachgewiesen werden. Der Weg zu Sotolon führt wahrscheinlich über die enzymatische Bildung von Isoleucin und nachfolgender Oxidation durch Fe^{3+} -Ionen im Kulturmedium.

Schlagwörter: Glutenhydrolyse, Peptidasen, Basidiomyceten

Abstract

The enzymatic hydrolysis of wheat gluten by peptidases is an alternative to the hydrolysis of gluten using concentrated hydrochloric acid. The use of the acid is bound to result in the formation of toxicologically critical by-products such as chloropropanols and high concentrations of sodium chloride during the neutralization reaction. These problems can be evaded by applying enzymatic hydrolysis. However, the peptidases currently applied in industrial processes hydrolyze 35 – 40 % of the gluten only. Thus, new and more efficient peptidases are required. The aim of this work was to identify species of basidiomycetes that secrete extracellular peptidases for the efficient hydrolysis of gluten.

Peptidases of the basidiomycete *Flammulina velutipes* hydrolyzed gluten to a degree of 63 % in gluten rich cultures. The hydrolysates showed a savory smell and no detectable bitterness. For the degradation of complex substrates, such as gluten, these peptidases act synergistically.

28 Basidiomycetes from several families were cultivated on gluten rich medium and monitored by measuring the peptidase activity in the supernatants. The best results were achieved with the xylothrophic fungus *Flammulina velutipes* (“winter mushroom”) which showed high total peptidase activity and generated a multitude of various peptidases. The growth parameters were optimized for this fungus by cultivation on different substrates. Highest peptidase activity was obtained from an emerged cultivation type using damp gluten pellets as a substrate.

F. velutipes generated eight different extracellular peptidases. Five of them were purified and partially characterized. Four peptidases were assigned to different peptidase families by sequence alignments with known peptidases and substrate specificity tests. These were a serine peptidase from the Subtilase subfamily of “*Pleurotus ostreatus*-type peptidases” (S08.139) with maximum activity at 40 °C and pH 7,5, another serine peptidase with a specificity to cleave prolyl residues of family S28.004 with a molecular weight of 49 kDa and maximum activity at 45 °C and pH 6, a 59 kDa metallopeptidase that showed maximum activity at 40 °C and pH 6, a carboxyserine peptidase of family S41, and a 12,9 kDa metallopeptidase of the Deuterloysin family (M35).

Another fungus that showed a surprising feature was *Laetiporus sulphureus*. It generated savoury and meat-like flavours from gluten during growth in Koji-type cultures. Many heterocyclic flavours, among them sotolon (3-hydroxy-4,5-dimethyl-

2[5H]-furanone), emerged into the liquefying hydrolysate. The formation of sotolon was amplified by supplementation of sotolon precursors such as 4-hydroxyisoleucine which was also detected in the culture supernatant in small concentrations. While the chemical formation of sotolone by presence of Fe^{3+} in the culture supernatant is probable, an enzymatic generation cannot be ruled out completely. Most likely, the formation of sotolon was based on the enzymatic liberation of isoleucine followed by an oxidation reaction catalyzed by the Fe^{3+} present in the nutrient medium.

Keywords: Gluten hydrolysis, peptidase, basidiomycetes

1 Einleitung

Peptidasen bilden eine eigene Enzymklasse und spielen sowohl physiologisch als auch kommerziell eine Schlüsselrolle. Ihr Vorkommen ist ubiquitär. Sie katalysieren die Spaltung von Peptidketten von Proteinen und können diese hydrolytisch vollständig abbauen oder auch selektiv modifizieren. Peptidasen haben eine wichtige Rolle für jeden Organismus, z. B. bei der Aktivierung oder Prozessierung von Enzymen und bei der Regulation von enzymatischen Kaskaden, die letztendlich alle metabolischen Reaktionen regulieren.

Der geschätzte Wert der weltweit verkauften, industriell hergestellten Enzyme beträgt derzeit 1 Milliarde US \$, ca. 60 % hiervon sind Peptidasen. Wegen ihrer hohen Diversität und gleichzeitigen hohen Spezifität stoßen Peptidasen auf ein großes Interesse und es wird weiterhin nach geeigneten Peptidasen für verschiedenste Anwendungen geforscht. Ihre Hauptanwendungsgebiete finden sich in der Lebensmittel-, Detergenzien- und Lederindustrie [1].

Mikrobielle Peptidasen mit einem Aktivitätsoptimum bei $\text{pH} > 7$ (sog. „alkaline peptidasen“) haben einen dominierenden Marktanteil. Und obwohl alle Organismen natürlicherweise Peptidasen produzieren, werden diese wirtschaftlich relevanten Enzyme nur von wenigen, gut erforschten Organismen produziert. Besonders *Bacillus sp.* und *Aspergillus sp.* Arten dominieren den industriellen Sektor [2].

Die Entwicklung der industriellen Biotechnologie zeigt allerdings einen Trend zur Erschließung neuer Organismen und verbesserte Methoden zur Enzymproduktion um industrielle Prozesse aufzuwerten. Hierfür wurde auch die Suche nach Peptidasen mit einem Reaktionsoptimum im sauren oder neutralen Bereich intensiviert. Für dieses Ziel sind nun auch Basidiomyceten als vielversprechende Organismen in das Interesse der Wissenschaft gerückt.

1.1 Einteilung und katalytischer Mechanismus von Peptidasen

Gemäß der Nomenklatur des “Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology” werden Peptidasen als Untergruppe 4 in der Klasse 3 der Hydrolasen klassifiziert [EC 3.4]. Wegen ihrer hohen Diversität in Struktur und Aktivität ist es jedoch sehr schwierig Peptidasen in einem generellen System zu

strukturieren. Gegenwärtig werden Peptidasen daher zunächst auf der Basis von drei Kriterien klassifiziert: Art der katalysierten Reaktion, chemische Konstitution des aktiven Zentrums und evolutionäre Verwandtschaftsverhältnisse anhand struktureller Gemeinsamkeiten [1].

Peptidasen unterscheiden sich in ihrem katalytischen Typ und der Spaltstellenpräferenz. Bis heute sind fünf verschiedene Typen aktiver Zentren von Peptidasen bekannt, nach denen diese Typen benannt sind: Metallo-, Aspartat-, Serin-, Cystein- Glutamin- und Threoninpeptidasen. Einige Peptidasen, darunter auch viele aus Basidiomyceten, konnten allerdings noch keinem dieser katalytischen Typen zugeordnet werden.

Die katalytischen Typen unterscheiden sich durch die Art und Weise, wie eine Peptidbindung hydrolysiert wird. Grundsätzlich wird die Peptidkette durch ein Nukleophil angegriffen, welches sich in der Substrattasche der Peptidase befindet. Bei Metallo-, Glutamin- und Aspartatpeptidasen handelt es sich dabei um ein aktiviertes Wassermolekül, bei den anderen drei Gruppen agiert die Seitenkette einer Aminosäure (die auch namensgebend ist) als Nukleophil innerhalb einer katalytischen Triade.

Weiterhin kann man Peptidasen grob in Endo- und Exopeptidasen unterteilen. Hauptmerkmal ist hierbei die Position der präferierten Spaltstelle. Werden Proteine oder Peptide innerhalb der Peptidkette hydrolysiert, wird diese als Endopeptidase bezeichnet. Werden Aminosäuren vom N- oder C-terminalen Ende einer Peptidkette abgespalten, wird sie als Exopeptidase definiert. Für die Endopeptidasen zeigt sich, dass einige Peptidasen praktisch keine Spaltpräferenz besitzen, während andere hochspezifisch nur nach Aminosäuren mit z. B. einem großen hydrophoben Rest oder sogar nur nach oder vor einer ganz bestimmten Aminosäure angreifen. So lässt sich eine große Bandbreite an Peptidasen unterscheiden.

Extrazelluläre Peptidasen haben normalerweise vor allem eine Funktion im Abbau von Substraten für die Ernährung eines Organismus, sie dienen aber auch der Abwehr von Konkurrenten oder spielen eine Rolle für die Pathogenität des Organismus. Sie verbleiben bis zu ihrer Sekretion oft in inaktivem Zustand als Propeptide, um unerwünschte Autolyseeffekte zu vermeiden [3].

1.2 Biotechnologisches Potential von Basidiomyceten

Pilze verfügen über eine größere Vielfalt von Enzymen als Bakterien, wobei bisher vor allem Ascomyceten (besonders Schimmelpilze wie *Aspergillus ssp.*) und Hefen (z. B. *Saccharomyces cerevisiae*) untersucht wurden. Extrazelluläre Peptidasen aus Pilzen sind in pH Bereichen von pH 4 bis pH 11 aktiv, bauen ein breites Spektrum an Substraten ab [1] und können, im Gegensatz zu bakteriellen Peptidasen, besonders effizient in Festbettreaktoren produziert werden. Geeignet sind sie vor allem für den Einsatz in der Käseindustrie und bei der Entbitterung von Hydrolysaten.

Zu den Agaricomycotina (Ständerpilzen), der größten Unterabteilung der Basidiomycota (Basidienpilze), gehören hauptsächlich Pilze, die einen ohne Vergrößerung sichtbaren Fruchtkörper besitzen. Dieser besteht typischerweise aus einem Stiel mit Hut oder einem konsolenartigen Körper. Daher werden sie auch vereinfachend als Makropilze bezeichnet, zu denen allerdings auch einige Ascomyceten gezählt werden können. Bisher sind ca. 25000 Basidiomycetenarten bekannt, wovon 15000 Arten zu den Makropilzen gehören. Es wird allerdings geschätzt, dass dies nur 10 % der tatsächlich existierenden Arten sind. Und selbst von diesen bekannten Arten sind bisher nur wenige intensiv untersucht worden. Im Hinblick auf die industrielle und wissenschaftliche Relevanz von Ascomyceten lässt sich hier ein großes, noch unerforschtes Potential vermuten [4]. In der vorliegenden Arbeit wurde ausschließlich mit Basidiomyceten der Unterabteilung Agaricomycotina gearbeitet.

Das einzigartige und bisher nahezu ungenutzte biochemische Potential der Basidiomyceten für industrielle und medizinische Anwendungen lässt sich schon anhand eines Blickes auf die natürliche Lebensweise erahnen: Viele Basidiomyceten leben parasitisch oder saprobiontisch auf Holzkörpern oder organischen Resten (Bodenstreu, Dung, Kompost) und haben daher ein sehr hohes Adaptionsvermögen an wechselnde und schwer erschließbare Nahrungsquellen, für deren Abbau extrazelluläre Enzyme konstitutiv generiert werden. In dieser Arbeit wurden holzabbauende Weiß- und Braunfäulepilze sowie einige Saprobionten verwendet.

Holz, das wichtigste Substrat für holzabbauende Pilze, ist extrem stickstoffarm. Das C/N Verhältnis kann bis zu 1250/1 betragen (typischerweise ca. 500/1). Sowohl

Kohlen- als auch Stickstoff liegen in unlöslicher Form vor, was deren Abbau erschwert. Der in Form von Cellulose und Hemicellulose vorliegende Kohlenstoff ist auf molekularer Ebene mit dem schwer abbaubaren Polyphenol Lignin in den abgestorbenen Zellwänden des Holzkörpers verbunden. Für den Abbau von Nährstoffen aus den Zellwänden und deren Aufnahme über Membrantransporter wird daher ein Komplex aus extrazellulären Enzymen sequenziell induziert oder unterdrückt [5].

Aufgrund ihrer Lebensweise zeigen Basidiomyceten eine Anzahl von stickstoffsparenden Strategien, so z. B. das Recycling von Stickstoff aus altem Mycel, den selektiven Abbau von Zellbestandteilen bei Stickstoffmangel und die Fähigkeit, verschiedenste Stickstoffquellen zu nutzen. Stickstoff kann in bestimmten Mycelteilen konzentriert werden oder über stickstoffarme Substanzen (Mauern, Steine) hinweg zu anderen Mycelteilen transportiert werden. Es wurden Konzentrationen von 0,2 % unter Stickstoffmangel und bis zu 8 % unter Stickstoffüberfluss an Totalstickstoffgehalt im Mycel gefunden. Überschüssiger Stickstoff wird im Cytoplasma, in Vakuolen und eventuell sogar in Form von Chitin gespeichert. Möglicherweise werden sogar spezifische Speicherproteine gebildet. Tritt Stickstoffmangel ein, werden entsprechende Stoffwechselwege zur Stickstoffgewinnung aktiviert und diese Reserven genutzt.

Holzabbauende Pilze nutzen auch andere Stickstoffquellen außer dem Holzkörper. Sie sind in der Lage, diesen auch aus organischen Pflanzenresten, Bodenorganismen wie Bakterien, Nematoden und Springschwänzen sowie tierischen Ausscheidungen zu gewinnen. Von holzabbauenden Basidiomyceten wird außerdem vermutet, dass deren Mycelnetzwerke eine entscheidende Rolle im Stickstoffzyklus von Waldböden spielen [5].

1.3 Peptidasen für die Glutenhydrolyse

Über extrazelluläre Peptidasen aus Basidiomyceten ist bisher wenig bekannt. Neben den in der Industrie bisher schon vereinzelt eingesetzten Oxidoreduktasen, die z. B. für entfärbende und bleichende Zwecke angewendet werden, wird von Basidiomyceten auch unter Laborbedingungen eine Vielzahl von extrazellulären Peptidasen generiert.

Peptidasen aus Basidiomyceten spielen bisher in der Forschung und industriellen Anwendung nur eine kleine Rolle. Gründe hierfür sind unter anderem, dass Basidiomyceten im Vergleich zu Bakterien und Ascomyceten (z. B. Schimmelpilzen) als höher differenzierte Lebensformen nicht nur relativ langsam wachsen, sondern insgesamt auch komplexere Organismen darstellen. In ihrem natürlichen Lebensraum haben Basidiomyceten sehr unterschiedliche Ansprüche an Substrat und Habitat. Basidiomyceten sind hinsichtlich der Substratwahl entweder Parasiten, zumeist an Holzkörpern oder Saprobionten, die bereits tote organische Masse weiter zersetzen, oder sie leben in enger Symbiose mit Pflanzenwurzeln. Diese Symbionten (Mykorrhiza) sind unter Laborbedingungen sehr schlecht zu kultivieren. In der Forschung werden daher meist nur Fruchtkörper dieser Arten eingesetzt, was die Identifizierung von extrazellulären Enzymen unmöglich macht.

In dieser Arbeit wurden daher vor allem xylotrophe (holzabbauende) Basidiomyceten für die Untersuchungen ausgewählt, und zwar sowohl Braun- als auch Weißfäulepilze, die sich vor allem in ihrer Spezifität hinsichtlich des Ligninabbaus unterscheiden.

Gerade in den letzten Jahren wurde das große Potential an unentdeckten Enzymen und anderen Stoffen in Basidiomyceten erkannt und die Forschung intensiviert, wobei der Schwerpunkt der Forschung hier auf der Identifizierung und Gewinnung von extrazellulären Oxidoreduktasen (z. B. Laccasen, Peroxidasen) lag, die Weißfäulepilze zum Abbau und Modifikation von Lignocellulose generieren.

Noch immer liegen nur für eine geringe Anzahl von Basidiomyceten detaillierte Informationen über die im Exoproteom vorhandenen Enzyme vor. Bisher ist das vollständige Genom von 15 Basidiomyceten (davon neun Agaricomycotina) sequenziert, jedoch sind nur wenige Gene annotiert. Einige Peptidasen sind bekannt, die von der Anzahl vermuteter Peptidasen allerdings deutlich übertroffen werden. Viele der gefundenen Sequenzen weisen zudem so große Unterschiede zu bekannten Peptidasen auf, dass ihre Zuordnung erschwert ist (Tabelle 1) [6].

Tabelle 1: Geschätzte Anzahl von Peptidasen aus Basidiomyceten mit bekanntem Genom.

Organismus	Anzahl bekannter und vermuteter Peptidasen	Anzahl nichthomologer Peptidasen*
<i>Ustilago maydis</i>	86	27
<i>Laccaria bicolor</i>	130	40
<i>Coprinopsis cinerea</i>	159	61

* Ein Protein mit bekannter Sequenz, das einer Peptidasefamilie zugeordnet werden kann, bei dem aber eine oder mehrere funktionelle Gruppen fehlen.

Die bisher aus Basidiomyceten bekannten Peptidasen wurden zum größten Teil in Fruchtkörpern der einzelnen Spezies gefunden. Einen Überblick hierüber geben [7] und [8]. Bei einem Versuch der systematischen Erfassung extrazellulärer Peptidasen aus einer weitgefächerten Artenauswahl wurde von [9] eine überraschend große Anzahl und Diversität von Peptidasen identifiziert. Besonders hervorzuheben ist auch, dass viele dieser Peptidasen nicht sensitiv gegenüber Standardpeptidaseinhibitoren waren.

Für die effektive Hydrolyse von komplexen proteinogenen Substraten benötigt ein Organismus eine Mischung aus extrazellulären Endo- und Exopeptidasen mit breiter Substratspezifität. Wegen den natürlichen Funktionen, die extrazelluläre Peptidasen aus Basidiomyceten besitzen, sind sie für den biotechnologischen Einsatz besonders interessant. Xylotrophe Basidiomyceten generieren Peptidasen hauptsächlich für den Abbau von Stickstoff aus organischem Material und müssen daher über potente extrazelluläre Peptidasen verfügen.

Neben dem Substratabbau erfüllen extrazelluläre Peptidasen aber noch weitere wichtige Aufgaben, wie die Regulierung von anderen enzymatischen Aktivitäten [10], [11]. Für eine extrazelluläre Peptidase aus *P. ostreatus* konnte eine Funktion bei der Fruchtkörperbildung nachgewiesen werden [12]. Auch ist es wahrscheinlich, dass extrazelluläre Peptidasen, besonders die pathogener Pilze, einen starken Virulenzfaktor darstellen.

Die Schwerpunkte der Forschung mit basidiomycetischen Peptidasen sind bisher vornehmlich im Bereich der Grundlagenforschung und der medizinischen Nutzung zu finden. Nur wenige Arbeiten befassen sich mit der Nutzung dieser Peptidasen für den Abbau von pflanzlichen Proteinen [13], [14]. Dabei ist diese Idee nicht fernliegend. Schon seit Jahrtausenden werden die extrazellulären Peptidasen verschiedener Ascomyceten zur Hydrolyse von Soja- und Weizenprotein genutzt, um Produkte wie

z. B. Sojasauce herzustellen [15]. Die in einem solchen Fermentationsschritt eingesetzte pilzliche Impfmasse wird auch Koji genannt.

Neben ihrer Beliebtheit in Südostasien gewinnen diese traditionell fermentierten Produkte wie Sojasoße, Natto oder Tempeh aber auch weltweit an Interesse, da sie zu den funktionellen Lebensmitteln gehören, also nachweislich gesundheitsfördernde Wirkung (z. B. antibiotische und antikanzerogene Wirkung) besitzen. Diese positiven Eigenschaften sind auch auf den Proteinabbau durch die mikrobiologischen Organismen, die in der Produktion eingesetzt werden, zurückzuführen [15]. Entscheidend für einen erfolgreichen Prozess sind hierbei vor allem im alkalischen und neutralen pH Bereich aktive Peptidasen pilzlichen Ursprungs [1].

In Europa wurde die Proteinhydrolyse zur Erzeugung von Würzmitteln erst sehr viel später entwickelt. Ab 1886 wurde die Maggi-Würze als Fleischextrakt-Ersatz hergestellt. Im ursprünglichen Verfahren wurden Soja- und Weizenprotein mit Salzsäure hydrolysiert und das Hydrolysat mit Natronlauge neutralisiert. Dieses sehr schnelle Verfahren hat jedoch den entscheidenden Nachteil, dass hierbei aus Resten der im Ausgangsmaterial enthaltenen Triacylglycerole verschiedene Chlorpropanole gebildet werden. Neben 1,3-Dichlorpropan-2-ol kommen 3-Chlorpropan-1,2-diol, das isomere 2,3-Dichlorpropan-1-ol und Monochlorpropanole vor [16]. Von toxikologischer Bedeutung sind die beiden zuerst genannten (Abbildung 1). Für 1,3-Dichlorpropan-2-ol konnte in Langzeitstudien und Zellsystemen eine kanzerogene und genotoxische Wirkung nachgewiesen werden, 3-Chlorpropan-1,2-diol war genotoxisch in einer Reihe von *in-vitro*-Systemen [17]. Der Gehalt von 2,3-Dichlorpropan-1-ol in Sojasoßen lag 2001 im Durchschnitt bei $0,04 \text{ mg kg}^{-1}$. Innerhalb der EU beträgt der Grenzwert für hydrolysiertes Pflanzenprotein und Sojasoßen für 3-Chlorpropan-1,2-diol $0,02 \text{ mg kg}^{-1}$ [18].



Abbildung 1: Bei der Hydrolyse von pflanzlichen Proteinen mit Salzsäure gebildete toxische Chlorpropanole.

Weitere Probleme bei der Salzsäurehydrolyse stellen der Umgang mit großen Mengen konzentrierter Säuren und Laugen dar, sowie die bei der Neutralisation entstehende Salzfracht (NaCl) in den Hydrolysaten.

Die industrielle Nutzung von Peptidasen für die Hydrolyse von pflanzlichem Protein wie z. B. Sojamehl oder Gluten zur Erzeugung von Würzmitteln ist eine naheliegende Lösung. Die enzymatische Hydrolyse ist eine Alternative zu langwierigen Verfahren wie der traditionellen Sojasoßenherstellung. Gleichzeitig bietet sie den Vorteil eines schnellen Verfahrens ohne die Erzeugung von unerwünschten Nebenprodukten. Allerdings erreichen die bisher angewandten industriellen Verfahren, welche mit bakteriellen und ascomycetischen Enzymen arbeiten, nur geringe Ausbeuten von 30 % – 40 % Glutenabbau [19], [20], was zu signifikanten wirtschaftlichen Verlusten führt.

Neben der Frage, ob die Hydrolyse von pflanzlichen Proteinen mit basidiomycetischen Peptidasen überhaupt wirtschaftlich durchgeführt werden kann, ist es natürlich auch interessant, auf welche Art und Weise dies geschieht. Da es sich bei Gluten um ein komplexes Gemisch aus verschiedenen Proteinen handelt [21], muss der effiziente Abbau mit einem Enzymgemisch erfolgen, welches mindestens eine Endo- und eine Exopeptidase enthält. Erst kürzlich wurde nachgewiesen, dass das Exoproteom von *Aspergillus niger*, ein für die Fermentation von Sojaprodukten relevanter Organismus, bei der Kultivierung auf Soja- und Weizenprotein eine Vielzahl an sehr unterschiedlichen Peptidasen bildet, die synergetisch am Proteinabbau beteiligt sind [22]. Zudem besteht Gluten zu einem hohen Prozentsatz aus den Aminosäuren Glutamin und Prolin, von denen Prolin durch die große hydrophobe Seitenkette nur von wenigen Enzymen abgespalten werden kann und somit eine besondere Herausforderung (bei der Suche nach neuen Peptidasen für den Glutenabbau) darstellt.

Wenn geeignete Organismen für diesen Zweck gefunden werden, wäre im nächsten Schritt auch die Identifizierung der einzelnen am Glutenabbau beteiligten Peptidasen von großem Interesse für die wirtschaftliche Anwendung eines Organismus, da nur so ermittelt werden kann, welchen Einfluss einzelne Enzyme auf das Hydrolyseergebnis haben. In Abhängigkeit von ihrer Relevanz ist dann eventuell auch eine gezielte Induktion oder heterologe Expression möglich.

1.4 Erzeugung von Aromastoffen aus Gluten mit Basidiomyceten

Eine bisher wenig beachtete Eigenschaft von Basidiomyceten ist die Bildung von charakteristischen Aromen wie 1-Octen-3-ol und 1-Octen-3-on (typischer Pilzgeruch) oder 3-Octanon (süßlich, blumig), die sich nach der Zell-lyse von Fruchtkörpern vieler Arten bilden [23]. Besondere Aromen sind für einzelne Spezies bekannt. So riecht z. B. der Fruchtkörper von *Marasmius scorodonius* intensiv nach Knoblauch. Viele Arten sind sogar nach ihrem charakteristischen Geruch oder Geschmack benannt (z. B. *Gloeophyllum odoratum*, Anis-Zähling). Durch die Supplementierung mit speziellen Substraten oder Induktoren ist es zudem möglich, dass Basidiomyceten mittels Biokonversion interessante Aromen generieren [24], [25].

Bei der Hydrolyse von Gluten ist es neben möglichst hohen Abbauraten des Glutens zudem von großer Bedeutung, dass das entstandene Hydrolysat auch sensorisch akzeptabel ist. Daher wurden in dieser Arbeit auch die bei der Hydrolyse von Gluten entstehenden Aromen beobachtet.

1.5 *Flammulina velutipes* und *Laetiporus sulphureus*, zwei interessante Basidiomyceten für die Glutenhydrolyse

Die höchsten Peptidaseausbeuten wurden mit *Flammulina velutipes* erzielt. *F. velutipes* (Samtfußrübling oder Winterpilz) ist ein auf lebenden, vorgeschädigten Laubhölzern (vorzugsweise Weiden, Pappeln, Eschen oder Birken) wachsender Weißfäulepilz, der nur schwach pathogen ist und meist saprobiontisch lebt (Abbildung 2). Er ist überall in Eurasien in Zonen mit gemäßigttem Klima anzutreffen und gilt in Europa und Asien als hervorragender Speisepilz, der im asiatischen Kulturraum in großen Mengen kultiviert wird. Durch eine besondere Kultivierungsmethode (Wachstum unter Ausschluss von Licht und bei hohen CO₂ Konzentrationen) entwickelt *F. velutipes* extrem lange und dünne Stiele und sehr kleine Köpfe, die Fruchtkörper bleiben farblos. Die Kulturform unterscheidet sich somit stark vom natürlichen Habitus. In der traditionellen chinesischen Medizin wird er zudem als Heilpilz verwendet.



Abbildung 2: *F. velutipes* in Versuchskultur auf Hanffaser (links, Institut für Lebensmittelchemie, Hannover), kultivierte Form als Speisepilz (Enokitake, Mitte, www.mushroomexpert.com) und als Wildform (rechts, www.rxwildlife.org.uk).

Der ebenfalls essbare Agaricomycet *Laetiporus sulphureus* (Schwefelporling) wuchs im Vergleich zu *F. velutipes* zwar relativ langsam auf Gluten, erzeugte jedoch dabei ein besonders interessantes Aromenspektrum. Die mit *L. sulphureus* erzeugten Glutenhydrolysate rochen intensiv herzhaft und würzig nach Fleischbrühe. Da dieser Geruch unter natürlichen Bedingungen nicht im Fruchtkörper generiert wird [26], [27], ist anzunehmen, dass *L. sulphureus* diese Aromen aus dem Gluten generiert. *L. sulphureus* ist ein parasitisch auf Eichen und anderen Laubhölzern lebender Braunfäulepilz mit großen, auffällig orangefarbenen konsolenartigen Fruchtkörpern, die jung auch essbar sind (Abbildung 3). Er ist ein Kosmopolit, der bevorzugt im Kernholz alter Bäume wächst, welches von vielen anderen Pilzarten wegen seiner hohen Resistenz gegen Pilzbefall meist gemieden wird.



Abbildung 3: *L. sulphureus* als Wildform (Institut für Lebensmittelchemie, Hannover).

1.6 Zielsetzung

In der vorliegenden Arbeit sollten Basidiomyceten identifiziert werden, die Weizengluten effektiv hydrolysieren.

Hierzu sollten verschiedene Basidiomyceten zunächst in einem Screening auf peptidolytische Aktivitäten hin untersucht werden. Zum besseren Verständnis der enzymatischen Vorgänge bei der Glutenhydrolyse sollten gefundene Peptidasen soweit möglich aufgereinigt und charakterisiert werden.

Da bei Glutenhydrolysaten zur Würzmittelherstellung neben dem Hydrolysegrad auch Geruch und Geschmack der Hydrolysate wichtig sind, sollte zusätzlich die Bildung von Aromastoffen sensorisch beobachtet und gegebenenfalls analytisch untersucht werden.

2 Ergebnisse

2.1 Koji fermentation based on extracellular peptidases of *Flammulina velutipes*

A. Grimrath¹, P. Berends², S. Rabe², R. G. Berger^{1*}, D. Linke¹

Reprinted from European Food Research and Technology

With kind permission from Springer Science+Business Media: The original publication is available at www.springerlink.com ISSN: 14382377, DOI: 10.1007/s00217-010-1401-9, 2011, article in press.

¹Institut für Lebensmittelchemie der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover, Callinstrasse 5, D-30167 Hannover, Germany

²Nestlé Product Technology Centre, Lebensmittelforschung GmbH, Lange Str. 21, D-78224 Singen, Germany

2.1.1 Abstract

A total of 28 basidiomycetes and 16 substrates were investigated to detect extracellular peptidases for the hydrolysis of wheat gluten as a complex Koji substrate. In a first screening, basidiomycetes were grown in submerged cultures containing gluten as only carbon and nitrogen source. Growth rate, protein concentration and peptidase activity were monitored. *Flammulina velutipes*, *Armillaria mellea*, *Trametes versicolor*, *Meripilus giganteus*, *Fomitopsis pinicola*, *Phanerochaete chrysosporium* and *Hericium erinaceus* showed high peptidase activity. To evaluate the effects of complex substrates on peptidase generation, a set of experiments was performed using surface cultures of *Flammulina velutipes*. This fungus grew well on many of the substrates and yielded a maximum of over 160.000 arbitrary U mL⁻¹ on the surface liquid released from gluten pellets. Gelatin zymography visualized a complex mixture of secreted peptidases. Highest peptidase

yield was obtained from a koji-type culture: A maximum of 63 % of the gluten was converted to free amino acids in 14 days by peptidase activities in the range of 80.000 to 90.000 aU mL⁻¹. The dark brown hydrolysate smelled and tasted like meat broth with no detectable bitterness.

Keywords: Basidiomycota, *Flammulina velutipes*, peptidase, protein hydrolysis, koji

2.1.2 Introduction

Koji is a traditional product of Asian food biotechnology, typically prepared from wheat or defatted soybean and solubilized by *Aspergillus* strains rich in peptidases. The brewing of koji is a tedious process which may require many months until completion [28]. In the traditional process a wide range of different extracellular peptidases participate [22], a few of which have been characterized on a molecular level [29], [30], [31], [32]. Peptidases (EC 3.4.x) are key to this fermentation, because the peptides and amino acids liberated from the complex plant protein source, together with some of their derivatives, determine the smell and taste of the products. They differ in terms of catalytic mechanism, substrate specificity, activation mechanism, thermostability and pH optimum [1]. As a result, the microorganism chosen should provide both exo- and endopeptidases.

In this study both white-rot and brown-rot fungi were investigated for their extracellular peptidase activity. White-rot fungi mainly degrade lignin, while brown-rot fungi degrade or modify lignin only to a minor extent [33], [34]. Up to now the exoproteome of white-rot fungi has been investigated more thoroughly than that of brown-rot fungi. White-rot fungi achieve lignin decomposition by secreting redox enzymes, such as lignin peroxidase, manganese peroxidase, versatile peroxidase, and phenoloxidases of the laccase type. Some hydrolases, such as (hemi) cellulases are likewise abundant. Peptidases were isolated and systematically characterized from cultured mycelium and from fruit bodies only recently [7]. Wood is a relatively poor nitrogen source, thus peptidases are essential for the nitrogen supply of the fungus. The ability of different species of basidiomycetes to produce peptidolytic enzymes was comprehensively evaluated [9]: 43 basidiomycete species, representing 18 families of seven orders, were screened for the presence of

gelatinolytic activity and non-specific protein degradation. Most of the fungi showed an unexpected number and diversity of peptidases, indicating that basidiomycetes present a novel source of peptidases with potentially unique features: Less than half the peptidases could be reliably assigned to a particular catalytic category.

The activity of trypsin-like peptidases and trypsin inhibitors in fruiting bodies of various species of basidiomycetes was examined, and peptidases were found in most of the species [8]. For medical purposes, for example fibrinolytic activity, basidiomycetous peptidases were successfully applied. These fibrinolytic enzymes are of interest because of their low cost and absence of undesirable side effects [35], [36].

Some peptidases of the basidiomycetes used in this work have been characterized, for example those of *Fomitopsis pinicola* [37], [38], *Laetiporus sulphureus* [39], *Armillaria mellea* [40] and *Grifola frondosa* [41]. However, these peptidases were isolated from fruiting bodies; hence different peptidases may be found in an *in vitro* culture supernatant. For *Flammulina velutipes* a metallo-endopeptidase and for *Trametes trogii* several peptidases were identified in the culture supernatant [42], [43], [44]. The addition of powdered fruiting body of *F. velutipes* led to a decrease of dough strength due to gluten degradation by the fungal peptidases [13]. Soybeans fermented in a koji process using mycelia of *F. velutipes* and *Roseofomes subflexibilis* showed a thrombosis preventing activity [14]. Other physiological functions of extracellular peptidases reported were the regulation of the activity of other enzymes synthesized by the fungus, involvement in fruit body formation and an activity as a pathogenic factor [7].

Recently, attempts were made to substitute both the time-consuming traditional fermentation and the modern acid hydrolysis (which is prone to form carcinogenic chloropropanols) by environmentally friendly alternatives. Commercial peptidase mixtures are available, but may yield incomplete hydrolysis and unsatisfactory sensory attributes when applied to crude plant proteins [19], [20], [45]. This work shows that a basidiomycete hydrolyzed wheat gluten on a time scale of days by secreting a set of novel and potent peptidolytic activities.

2.1.3 Materials and methods

Applied strains and substrates

A total of 28 basidiomycetes were screened for peptidase activity: *Agaricus arvensis* (DSMZ, no. 8327), *Armillaria mellea* (CBS, no. 100.12), *Auricularia auricula-judae* (DSMZ, no. 11326), *Collybia dryophila* (DSMZ, no. 8356), *Fomitopsis pinicola* (DSMZ, no. 4957), *Flammulia veluptipes* (DSMZ, no. 1658), *Ganoderma applanatum* (CBS, no. 250.61), *Gloeopyllum odoratum* (CBS, No. 444.61), *Grifola frondosa* (CBS, no. 480.63), *Hericium erinaceus* (CBS, no. 260.74), *Kuehneromyces mutabilis* (DSMZ, no. 1684), *Laetiporus sulphureus* (DSMZ, no. 11211), *Lycoperdon perlatum* (DSMZ, no. 8678), *Macrolepiota procera* (DSMZ, no.3399), *Meripilus giganteus* (CBS, no. 561.86), *Marasmius scorodonius* (CBS, no. 850.87), *Phaenochaete chrysosoporium* (identified according to ITS sequences), *Phallus impudicus* (DSMZ, no. 3400), *Phellinus* ssp. (isolated from wood in Lower Saxony, Germany, and identified according to ITS sequences), *Pleurotus ostreatus* (identified according to ITS sequences), *Polyporus betulinus* (isolated from wood in Lower Saxony, Germany, and identified according to ITS sequences), *Polyporus umbellatus* (CBS, no. 483.72), *Serpula lacrymans* (CBS, no. 751.79), *Sparrassis crispa* (CBS, no. 408.71), *Trametes* ssp (DSMZ, no. 11309, identified according to ITS sequences), *Tremella mescentaria* (DSMZ, no. 1557), *Wolfiporia cocos* (CBS, no. 279.55) and *Xerula radicata* (DSMZ, no. 4830). Growth was assessed visually by comparison of colony diameter or density (surface) and diameter of mycelium pellets (submerged). Substrates applied were: draff, string bean, peanut shell (coarsely crushed), peanut shell (ground), flax fiber, gluten pellets, rose hip pomace, hemp fiber, wood chips (white oak), potato peel, carrot pomace, fermented tea pomace, white cabbage stalk (finely cut).

Standard medium (preculture) (Sprecher 1959)

The basidiomycetes were submerged cultured in pre-cultures; then the fungal pellets were transferred into a submerged or surface main culture. The reference medium was D-(+)-glucose-monohydrate 30.0 g L⁻¹, L-asparagine-monohydrate 4.5 g L⁻¹, yeast extract 3.0 g L⁻¹, KH₂PO₄ 1.5 g L⁻¹, MgSO₄ 0.5 g L⁻¹; trace element solution 1,0 mL L⁻¹ (FeCl₃ x 6 H₂O 0,08 g L⁻¹, ZnSO₄ x 7 H₂O 0.09 g L⁻¹, MnSO₄ x H₂O

0.03 g L⁻¹, CuSO₄ x 5 H₂O 0.005 g L⁻¹, Titriplex III (EDTA) 0.4 g L⁻¹; adjusted to pH 6.0 with 1 M NaOH.

Screening for peptidase activity

500 mL Erlenmeyer flasks were filled with 250 mL minimal medium (deionized water, 1.5 g L⁻¹ KH₂PO₄, 0.5 g L⁻¹ MgSO₄, 1 mL L⁻¹ trace element solution, and supplemented with 10 g gluten and 50 mL inoculum, harvested from standard medium after 7 days. Cells grew in the dark at 24 °C and 150 rpm. 1 mL samples of supernatant was taken daily for determination of peptidase activity and protein concentration. Growth was assessed visually by formation of mycelia pellets.

Screening for peptidase induction

300 mL Erlenmeyer flasks were filled with 50 mL minimal medium, 30 to 50 g substrate (depending on its density) and 5 mL inoculum of *F. velutipes*, harvested from standard medium after 7 days. For the hemp, peanut shell and wood chip extracts 200 g of solid matter and 400 mL of minimal medium were sterilized together at 121 °C for 30 minutes. The liquid was afterwards decanted and used for substrate preparation.

Cells grew without agitation in the dark at room temperature. 1 mL samples of supernatant were taken daily for the determination of peptidase activity. Each time a sample was taken, the same volume of minimal medium was replenished. When no supernatant could be obtained, solid samples were taken from the surface and re-suspended in minimal medium.

Koji experiments

Dry sterile gluten pellets (Nestle, Singen, Germany) and minimal medium at a ratio of 1 part of gluten to 1.5 parts of minimal medium were mixed with 5 mL inoculum, harvested from standard medium and homogenized (Ultra Turrax, Micra D-9, Müllheim, Germany) prior to inoculation. The mixtures were grown in parallel in a series of identical Erlenmeyer flasks without agitation at ambient conditions. Peptidase activity, protein concentration and degree of gluten hydrolysis were determined daily over a period of 17 days by harvesting one culture as a whole. The

gluten-fungus agglomerate was homogenized, washed with buffer and centrifuged to obtain the peptidases. Peptidase activity was measured in supernatant and washings. The degree of hydrolysis was calculated from the HPLC-analyses of free amino acids.

Measurement of peptidase activity

The azocasein assay is a photometric dead-stop method for the non-specific determination of peptidase activity [46]. 1U corresponds to the enzyme activity that generates an increase of extinction of 0.01 at 43 °C. Because of the high protein concentration of the supernatants, the assay had to be slightly modified (0.9 mg azocasein per mg total protein in the samples).

Protein concentration was measured using the D₆Protein assay (BIO-RAD no. 500-0113). Gelatin zymography [47], [48] was performed for the visualization of peptidase activity of culture supernatants. Total protein was determined according to Kjeldahl [49].

Determination of free amino acids

The degree of hydrolysis was determined using HPLC-Fluorescence detection of amino acids in the supernatant: 100 µL borate buffer (0.5 M, pH 10) and 20 µL OPA-reagent (100 mg *o*-phthalaldehyde, 1 mL borate buffer, 9 mL methanol, 100 µL 3-mercaptopropionic acid) were mixed with 10 µL internal standard (10 µM Glu-Glu) and 10 µL diluted sample, reacted at ambient temperature for 2 min, and replenished with 50 µL of 1 M acetic acid. A volume of 20 µL was injected (PU-980, Shimadzu GmbH, Duisburg, Germany) equipped with a RF-10A XL fluorescence detector (excitation $\lambda = 330$ nm, emission $\lambda = 460$ nm). Separation was performed using a Nucleodur C18 Pyramid column (250 x 4 mm, 5 µm, Macherey-Nagel, Düren, Germany) at a flow rate of 1 mL min⁻¹ using the following gradient system with methanol (A) and 0.1 M sodium acetate containing 0.044 % triethylamine at pH 6.5 (B): 0 – 5 min 10 % A, 5 – 8 min 15 % A, 8 – 40 min 60 % A, 40 – 50 min 90 % A and 50 – 60 min 10 % A. The concentration of amino acids was determined in triplicate and calculated according to calibration curves for each amino acid. Since OPA does not react with imines, proline and hydroxyproline were not detected. This was accounted for by a subtraction of 15 % (equals of proline content of gluten) from

the total protein content. Also subtracted was the blind value of amino acid concentration of submerged cultures of *F. velutipes* grown in standard medium.

2.1.4 Results and Discussion

Screening of basidiomycetes for peptidolytic activity

28 fungi were cultivated submerged in minimal medium supplemented with gluten as the only carbon and nitrogen source. High peptidase activity was found in the supernatants of *Flammulina velutipes*, *Trametes ssp.*, *Meripilius giganteus*, *Fomitopsis pinicola*, *Phaenochaete chrysosporium* and *Hericium erinaceus*. Other basidiomycetes showed lower levels of peptidolytic activity. *Kuehneromyces mutabilis*, *Serpula lacrymans*, *Phallus impudicus* and *Sparrassis crispa* responded sensitive to agitation and ceased growing. Many species grew slowly and reached maximum peptidase activity only after twenty days of cultivation or later (Table 2), but nearly all species were able to metabolize gluten, as determined by visible growth of hyphal pellets, the decrease of cloudiness of the nutrient medium, and the diminution of particulate gluten in the cultures.

Table 2: Peptidase activity of basidiomycetes grown in submerged gluten cultures

Species	Max. peptidase activity [aU / mL]	Day of max. peptidase activity
<i>Flammulina velutipes</i>	16188	10
<i>Trametes ssp.</i>	10152	8
<i>Meripilius giganteus</i>	3500	20
<i>Hericium erinaceum</i>	3280	20
<i>Polyporus umbellatus</i>	3042	27
<i>Fomitopsis pinicola</i>	2650	12
<i>Gloeophyllum odoratum</i>	2345	20
<i>Phaenochaete chrysosporium</i>	2244	19
<i>Armillaria mellea</i>	2058	13
<i>Marasmius scorodoni</i>	2020	17
<i>Grifola frondosa</i>	1210	9
<i>Pleurotus ostreatus</i>	792	8
<i>Wolfiporia cocos</i>	774	13
<i>Ganoderma applanatum</i>	738	10
<i>Serpula lacrymans</i>	507	9
<i>Auricularia auricula-judae</i>	348	8
<i>Sparassis crispa</i>	255	10

Species	Max. peptidase activity [aU / mL]	Day of max. peptidase activity
<i>Macrolepiota procera</i>	124	8
<i>Kuehneromyces mutabilis</i>	> 100	4
<i>Laetiporus sulphureus</i>	> 100	7
<i>Agaricus arvensis</i>	> 100	6
<i>Collybia dryophila</i>	> 100	8
<i>Lycoperdon perlatum</i>	> 100	8
<i>Phellinus ssp</i>	> 100	5
<i>Polyporus betulinus</i>	> 100	11
<i>Phallus impudicus</i>	0	-
<i>Tremella mescentaria</i>	0	-
<i>Xerula radicata</i>	0	-

Native wheat gluten was the only major nutrient provided. It consists of around 80 % protein high in glutamine and proline, 8 % hemicelluloses, 8 % water, and a minor amount of fatty acids [21]. As hemicelluloses are a suitable substrate for most basidiomycetes, it cannot be ruled out that some of the low-peptidase-species fed on the carbohydrate sources too. Gelatin zymography (exemplary displayed for some species in Figure 4) showed that the peptidolytic activity of most basidiomycetes was comprised of several peptidases which supposedly co-operated in the degradation of the gluten proteins. *Phallus impudicus*, *Tremella mescentaria*, *Sparassis crispa* and *Marasmius scorodonius* were the only species that emitted only one or no peptidase visible in gelatin zymography).

F. velutipes, an edible white-rot species, showed a comparably high peptidase activity (14 kaU mL^{-1}) after a cultivation time of eight to ten days and was selected for more detailed studies (Figure 5). The development of peptidase activity and protein concentration in the supernatant showed a lag phase of six days. Peptidase activity and protein content both cumulated on day ten of cultivation. Concurrently, the pH value increased constantly from pH 5.2 to pH 8.2, most likely due to the release of ammonia from deamination reactions. The elevated pH did not result in a visible reduction of growth. *Trametes ssp.* was second best and reached a maximum peptidase activity of 11 K aU mL^{-1} after 6 days of cultivation. The time courses of enzymatic activity were subject to slight biological fluctuations from one experiment to another, but the patterns shown in Figure 5 were generally well reproducible.

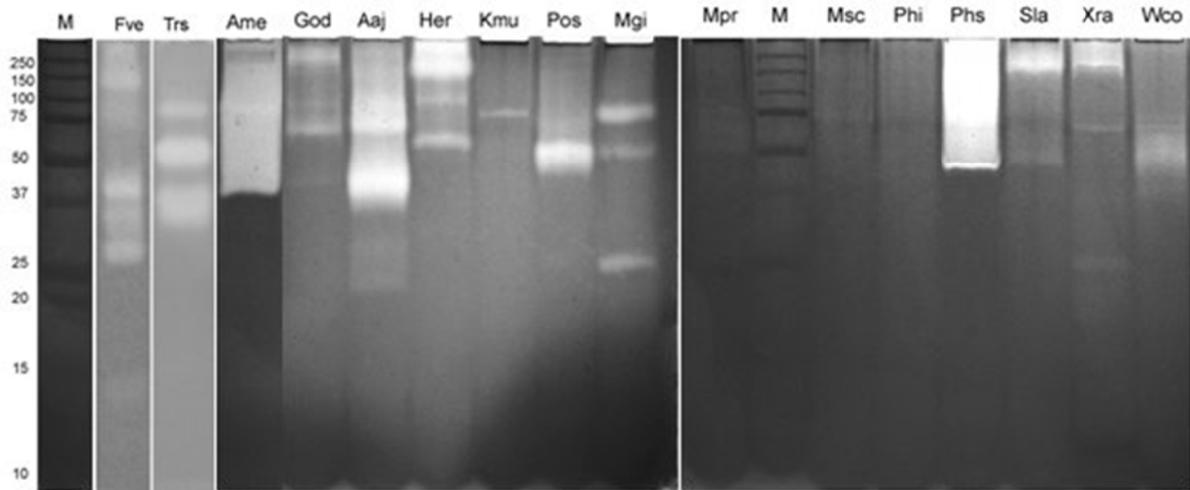


Figure 4: Gelatin zymography of culture supernatants of *F. velutipes* (Fve), *Trametes* ssp. (Trs), *Armillaria mellea* (Ame), *Gloeopyllum odoratum* (God), *Auricularia auricula-judae* (Aaj), *Hericium erinaceus* (Her), *Kuehneromyces mutabilis* (Kmu), *Pleurotus ostreatus* (Pos), *Meripilus giganteus* (Mgi), *Macrolepiota procera* (Mpr), *Marasmius scorodoni* (Msc), *Phallus impudicus* (Phi), *Phellinus* ssp. (Phs), *Serpula lacrymans* (Sla), *Xerula radicata* (Xra) and *Wolfiporia cocos* (Wco). M = Marker. All fungi were cultured submerged in gluten medium. Nearly all fungi showed a variety of extracellular peptidases, visible as white bands.

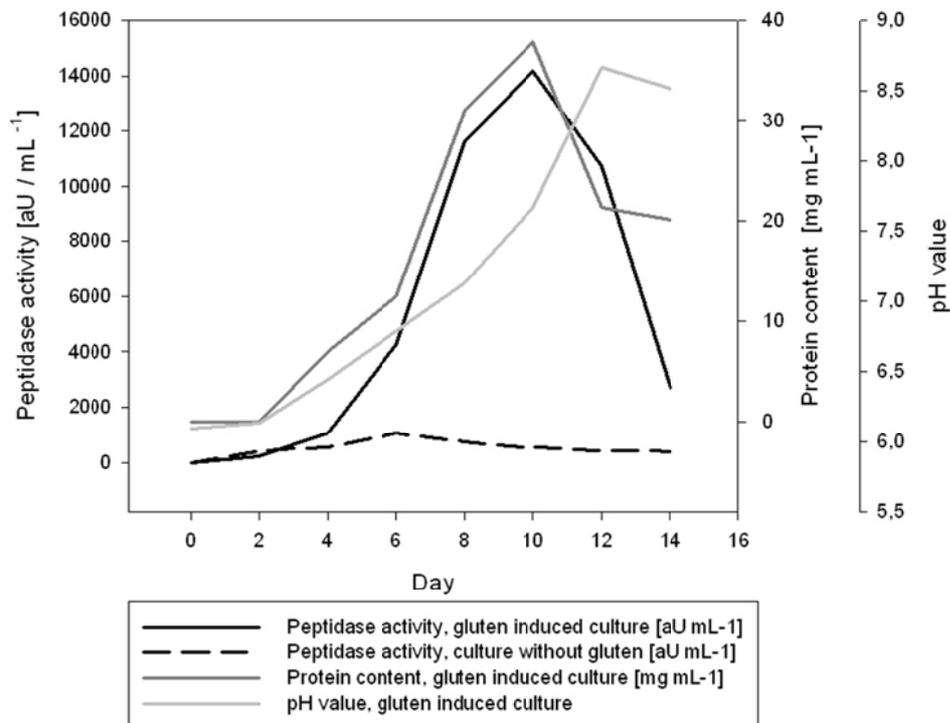


Figure 5: Development of peptidase activity, protein concentration and pH value in supernatant of submerged gluten induced culture and peptidase activity in supernatant of culture without gluten induction (standard medium) of *F. velutipes*.

Effect of the substrate on the peptidolytic activity of *F. velutipes*

Different complex and not well water soluble substrates were examined in surface cultures of *F. velutipes* to detect stimulating effects on the formation and excretion of peptidases (Table 3). In line with the idea of sustainable biotechnology some of the substrates were chosen from side streams of the food industry. Growth rate and the activity of excreted peptidases frequently did not coincide. In combination with minimal medium *F. velutipes* grew well on many of the substrates supplied. Apart from gluten pellets, best growth was observed on draff, peanut shells, and wood chips. These substrates resemble hard wood, a lignin and cellulose rich substrate with acidic pH, the major substrate of the fungus in its natural habitat. Other substrates, such as string bean, potato peel, carrot pomace and white cabbage stalk contain considerable amounts of carbohydrates, proteins and fatty acids, thus supporting moderate growth as well.

Table 3: Peptidase activity and growth rate of *F. velutipes* in surface cultures with different substrates.

Substrate	Max. peptidase activity [aU / mL]	Day of max. peptidase activity	Mycelial growth
Surface of gluten pellets	169480	13	intense
Gluten pellets, wholly harvested	96637	17	intense
Sheepwool + SNL (full medium)	50910	6	moderate
Hemp fibre	44988	14	moderate
Draff	39178	15	intense
Hemp fibre + sheepwool	33966	12	moderate
Hemp fibre + draff	24237	17	moderate
Gluten (powder) + peanut shell extract	19625	12	poor
Peanut shell, ground	17301	17	intense
Soy feed + minimal medium	15209	11	poor
Soy feed + sheepwool	11934	13	poor
Soy feed	9914	10	poor
String beans	9875	16	moderate
Peanut shell, coarsely crushed	8740	16	intense
Carrot pomace	8439	16	moderate
White cabbage stalk	7996	16	moderate
Gluten (powder) + hemp extract	6587	9	poor
Potato peel	5780	16	moderate
Soy feed + peanut shell extract	5562	10	poor
Gluten (powder) + wood extract (white oak)	5342	8	poor

Substrate	Max. peptidase activity [aU / mL]	Day of max. peptidase activity	Mycelial growth
Fermented tea pomace	3168	13	moderate
Hemp fibre + soy feed	2754	17	poor
Soy feed + wood extract (white oak)	2370	9	poor
Soy feed + hemp extract	1797	12	poor
Flax fibre	-	-	no growth
Rose hip pomace	-	-	no growth
Woodchips (white oak)	-	-	intense

Neither growth nor peptidase formation occurred on flax fibers, rose hip and tea pomace and sheep wool. No or slow growth and peptidase formation was found with combinations of gluten powder and hemp, peanut shells or wood extracts, or with soy feed and its combinations with the extracts. Highest peptidase yields were obtained from cultures grown on draff, gluten pellets, hemp fiber, sheep wool plus standard medium and from some cultures with combined substrates: gluten pellets plus peanut shell extract and soy feed plus sheep wool ($30 - 60 \text{ kaU mL}^{-1}$) (Figure 6). Starting on day six numerous droplets appeared on the liquefying surface of the gluten pellet-mycelium agglomerate. After the eleventh day, samples of the droplets showed a dramatically increasing peptidolytic activity which culminated at a maximum of over 160 kaU mL^{-1} . In the course of the following week the pronounced gradient of peptidolytic activity between surface and interior of the pellets decreased, and eventually a constant difference remained, indicating a possible effect of the better oxygen access of the outer layers.

It may be argued that at least a part of the peptidases formed in surface cultures were adsorbed onto some of the lignocellulosic materials. If so, this activity would have been eluded from measurement, and the advantage of the surface culture variant would have been even more distinct: The average peptidase activity of *Flammulina velutipes* in gluten supplemented submerged culture ranged from $12 - 16 \text{ kaU mL}^{-1}$ only.

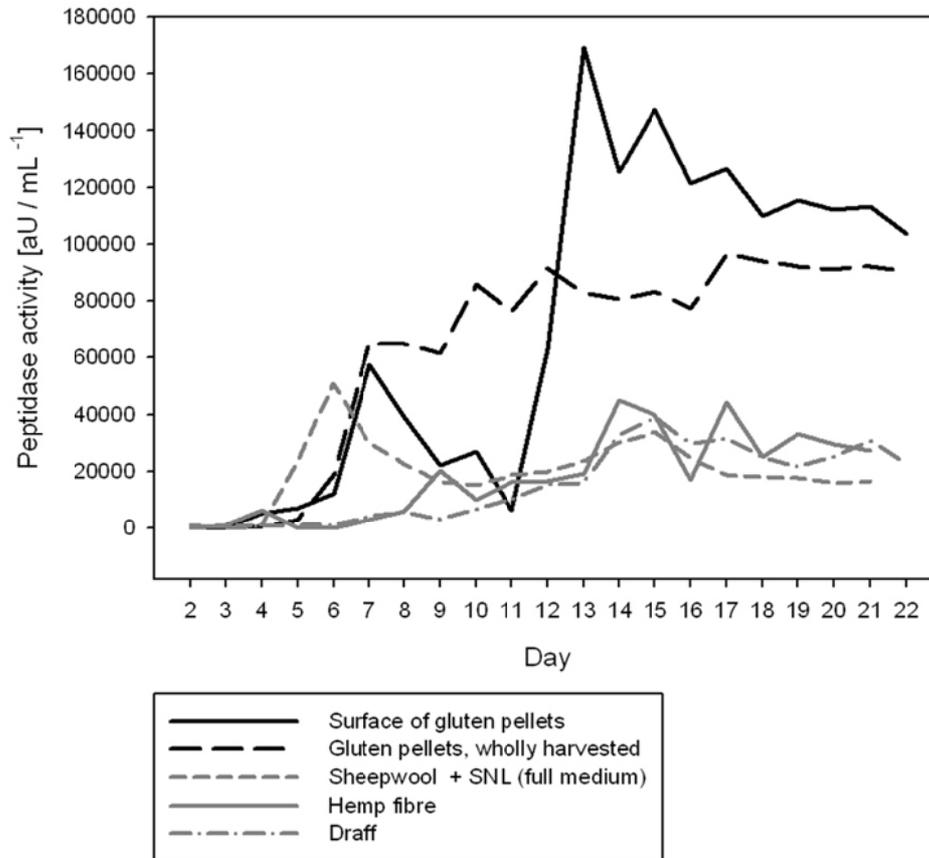


Figure 6: Peptidase activity of surface cultures of *F. velutipes* on different substrates.

Koji culturing of *F. velutipes*

Dry sterile gluten pellets plus minimal medium were mixed and inoculated with homogenized mycelium of *F. velutipes*. In a series of experiments cell growth reproducibly became visible after 5–7 days, and after 10–12 days the gluten pellets were densely perfoliated with mycelium. The separation of liquid and solid phase was impossible at this stage, even at high g-forces. After 12–18 days, simultaneous to growth culmination, a liquid began to accumulate on the surface of the gluten-fungus agglomerate which contained highly concentrated peptidases.

The peptidase activity of the koji culture started to develop on day four and increased steadily to peak on day 12, on a higher level (91 kaU mL⁻¹) and two days later than in the submerged culture (Figure 7). Highest peptidase activity in submerged cultures was 16 kaU mL⁻¹ on day 10 of cultivation. Thus, the peptidase yield from *F. velutipes* was six times higher under koji conditions. In comparison to *Trametes ssp.*, the second best species of the screening, the peptidase activity was around tenfold higher.

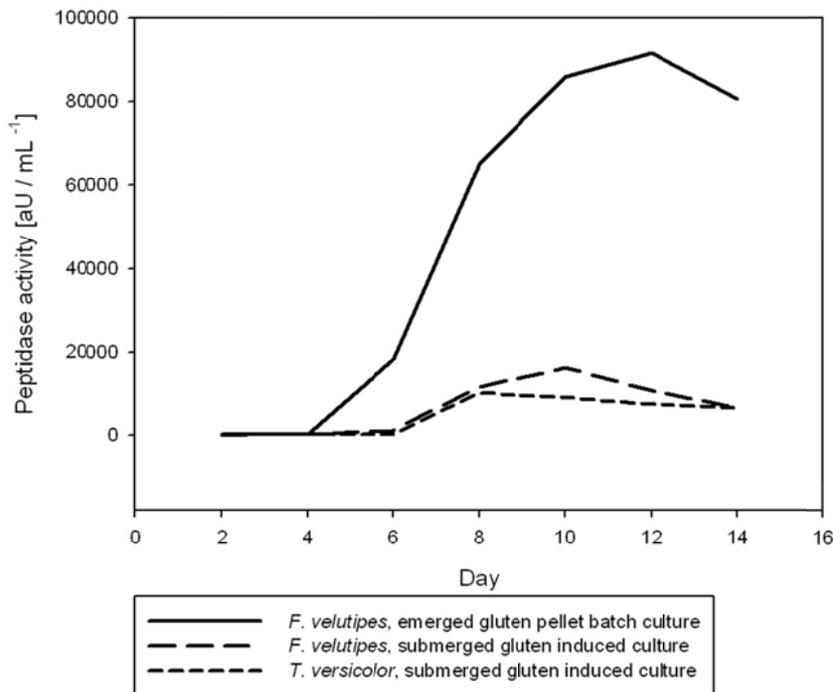


Figure 7: Peptidase activity in the supernatant of submerged cultures of *Trametes ssp.* and *F. velutipes* with 4 % of gluten (w/v) vs. a koji culture of *F. velutipes*.

Development of gluten hydrolysis in supernatant of *F. velutipes* koji cultures

For this experiment one culture was harvested daily. The gluten-fungus agglomerate was homogenized, washed with buffer and centrifuged. Peptidase activity, protein concentration and degree of gluten hydrolysis were measured in the supernatant and in all washings. The three parameters developed in a closely correlated way (Figure 8).

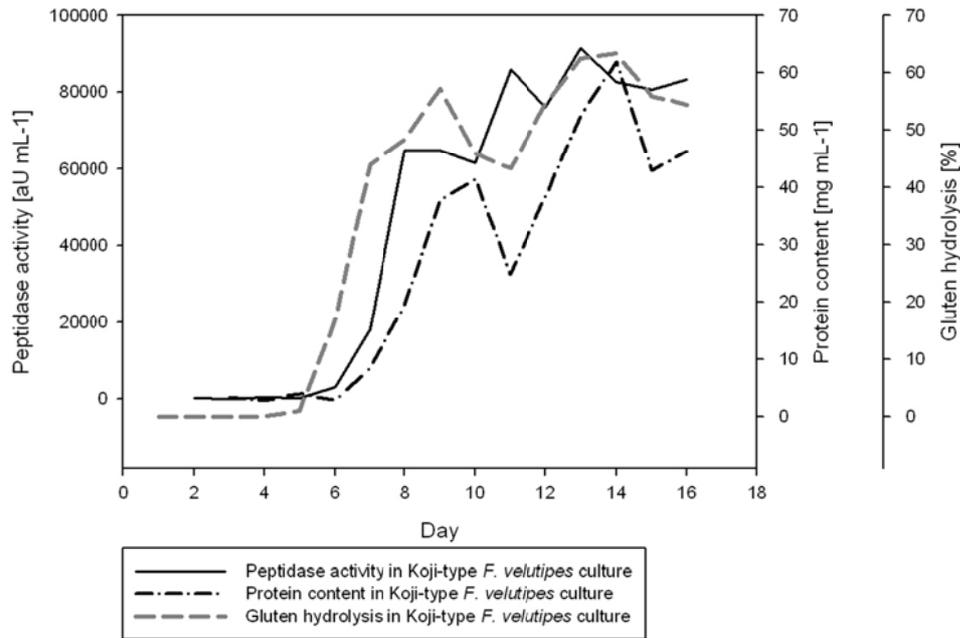


Figure 8: Development of peptidase activity, soluble protein content and degree of gluten hydrolysis in koji cultures of *F. velutipes*.

Visible fungal growth started four days after inoculation. From that time on, the peptidase activity, protein concentration and the degree of hydrolyzed gluten increased rapidly. On day seven the gluten pellets were completely covered with mycelium, and the fungus turned into the idiophase. At this point the peptidase activity and the degree of gluten hydrolysis leveled off. The protein concentration even dropped for a few days. Peptidase activity cumulated on day 12, the hydrolysis of gluten on day 14, and the protein concentration on day 15. It is known that lignin modifying enzymes, the most important extracellular enzymes of white-rot fungi in their natural environment, are mainly expressed during the stationary phase of growth [50], [51]. The metabolic shift from the trophophase to the idiophase, when lignin degradation commences, is often accompanied by an increased protein turnover. It was observed that fungi excreted different peptidases in the tropho- and idiophase, and that the abundance depended on the mode of cultivation [52]. Therefore the observations made in this study are not necessarily conferrable to other cultivation types. Apparently, the changes of peptidase activity, intra- as well as extracellular, take place at the same time, but since the functions of extracellular peptidases of white-rot fungi are not fully known further studies will be needed to explain them.

From the time course of all three parameters (Figure 8) it is evident that *F. velutipes* produced high activities of extracellular endopeptidases upon reaching the stationary

growth phase. The solubilized proteins were then processed to smaller peptides and free amino acids by concurrently generated exopeptidases, as is indicated by the increasing degree (%) of hydrolysis. *F. velutipes* produced all of its peptidases over the entire cultivation period from the fifth day on without notable fluctuations of composition (Figure 9). A variety of extracellular activities ranging from low to very high-molecular bands was visible on the activity staining gel. Extracellular peptidases are of particular biotechnological value, as they are typically more stable and more easily harvested from the medium.

The maximum degree of gluten hydrolysis was 63 % on day 14 of cultivation. This exceeds previous attempts to decompose gluten enzymatically using commercial peptidases [19], [20], [45]. Since the gluten break-down products (peptides and free amino acids) are formed in a dynamic equilibrium of generation and up-take by the cells, the quantitative extent of gluten hydrolysis is inevitably underestimated by the measurement of the concentrations in the supernatants.

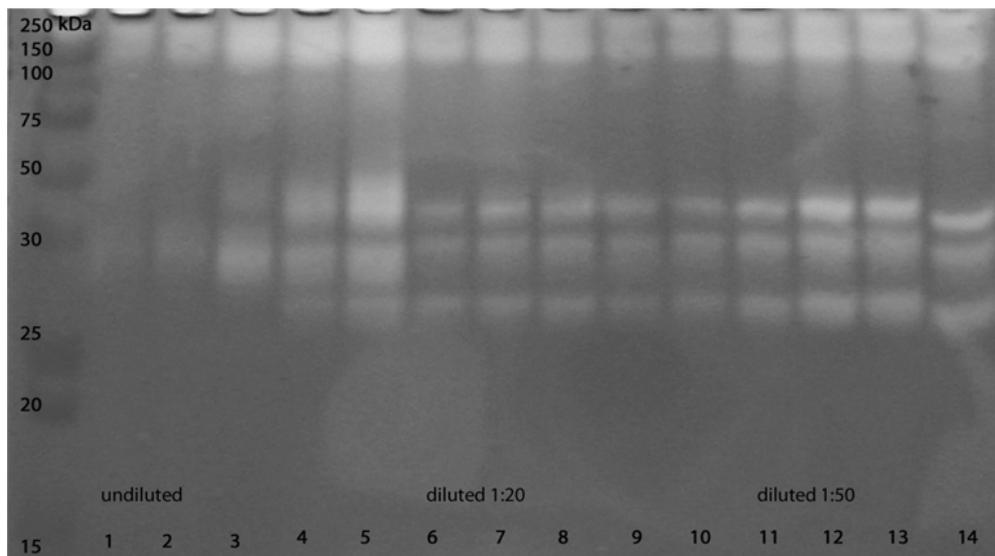


Figure 9: Gelatin zymography of peptidase activity of *F. velutipes* koji cultures from day 1 to day 14 (lanes 1 – 14 from left to right, lane 1 – 5 undiluted supernatant, 6 – 10 supernatant was diluted 1:20 and lanes 11 – 14 1:50).

A significant and recurrently observed drawback of enzymatic protein hydrolysis is the development of an unacceptably strong bitter taste. The intensity of bitterness is related to the number of hydrophobic amino acids in the hydrolysate. Also the presence of a L-proline residue in the center of the peptide contributes to bitterness [1]. Therefore, peptidases that cleave peptide bonds next to hydrophobic amino acids and L-proline are useful in debittering. Many of the hydrolysates produced in this

study were sensorially evaluated by a group of ten trained, non-bitter blind panellists. None of them exhibited any detectable bitter properties in the actual concentrations, although L-prolin is abundant in wheat gluten. This observation in combination with the high degrees of hydrolysis suggests that one of the peptidases of *F. velutipes* may possess high prolyl-specificity.

2.1.5 Conclusions

All basidiomycetes used in this study grew well in a gluten enriched minimal medium. This demonstrated the ability of basidiomycetes to adapt to uncommon substrates and particularly their applicability for gluten degradation. Not all of the fungi showed peptidase activity using the azocasein assay, although gluten degradation was clearly visible. Obviously, the standard substrate Azocasein is not suitable for detecting all peptidolytic activities of basidiomycetes. *Flammulina velutipes* showed by far the highest peptidase activity. Conditions of cultivation markedly affected the peptidase yields. High productivity was achieved by cultivation on surface cultures: Compared to submerged cultivation the total peptidase activity increased six-fold in the koji-type cultures using the same substrate. Koji produced with *F. velutipes* hydrolyzed wheat gluten to a degree of 63 %. A further analysis of the decomposition process requires the characterization of the extracellular peptidases of *F. velutipes* on the molecular level. Preliminary experiments showed that common peptidase inhibitors fail for some of the enzymes indicating that novel types of peptidases may be involved.

2.2 Identifizierung und Charakterisierung extrazellulärer Peptidasen von *F. velutipes*

2.2.1 Detektion verschiedener Enzymaktivitäten mit dem API-ZYM® Assay

Der API-ZYM® Assay erlaubt einen schnellen Überblick über enzymatische Aktivitäten in einer Probe. Es handelt sich um eine semiquantitative Nachweismethode, bei der Standardsubstrate für verschiedenste Enzyme eingesetzt werden.

Es wurden der Kulturüberstand von zwei *F. velutipes* Kulturen (Alter: sieben Tage) getestet, wobei der Pilz in der ersten Kultur mit Standardnährlösung und in der zweiten Kultur nur mit Gluten supplementiert wurde.

F. velutipes bildete in beiden Kulturen sehr unterschiedliche Exoproteine (Abbildung 10 und Tabelle 4). Bei Supplementierung mit Gluten wurde keine peptidolytische Aktivität mit Peptidasesubstraten spezifisch für Trypsin und Alpha-Chymotrypsin gefunden, dafür aber Aktivitäten anderer Enzyme wie Phosphatasen, Phosphohydrolasen, Galactosidasen, Arylamidasen, Esterasen/Lipasen und Glucoamidase. Dies war ein Hinweis, dass die am Glutenabbau beteiligten Peptidasen nicht zu den Familien der Trypsine oder Chymotrypsine gehören und zeigte, dass die Zusammensetzung des Exoproteoms von *F. velutipes* komplex ist.



Abbildung 10: Kontrollstreifen vom API-ZYM® Assay einer sieben Tage alten, gluteninduzierten Kultur von *F. velutipes*.

Tabelle 4: Aktivität verschiedener Enzyme in SNL- (Standardnährmedium) und Glutenculturen von *F. velutipes* detektiert mit einem API-ZYM® Assay. Die Werte zwischen 0 – 5 zeigen die detektierte Aktivität (0 = nicht aktiv, 5 = sehr aktiv).

Nr.	Enzym	<i>F. velutipes</i> Kultur in SNL, Alter: 8 Tage	<i>F. velutipes</i> Glutencultur (4 %), Alter: 7 Tage
1	Kontrolle	gelblich (ok)	gelblich (ok)
2	Alkaline phosphatase	5	2
3	Esterase	3	2
4	Esterase Lipase	4	2
5	Lipase	1	1
6	Leucine arylamidase	5	5
7	Valine arylamidase	4	2
8	Cystine arylamidase	0	0
9	Trypsin	0	0
10	Alpha-chymotrypsin	0	1
11	Acid phosphatase	5	5
12	Naphtol -phosphohydrolase	5	4
13	Alpha-galactosidase	3	3
14	Beta-galactosidase	5	5
15	Beta-gluconidase	0	0
16	Alpha-glucosidase	0	5
17	Beta-glucosidase	5	5
18	N-acetyl-beta-glucosaminidase	5	5
19	Alpha-mannosidase	2	1
20	Alpha-fucosidase	0	3

2.2.2 Identifizierung der Peptidasen im Kulturunterstand

F. velutipes generierte bei Induktion mit Gluten bis zu acht verschiedene extrazelluläre Peptidasen. Durch Sequenzierung und substratspezifische Aktivitätstests konnte für die meisten dieser Enzyme sichergestellt werden, dass es sich nicht um Isoenzyme handelt. Die Peptidasen wurden zunächst unaufgereinigt charakterisiert.

Die Visualisierung erfolgte mittels Gelatinezymografie. In unaufgereinigten Kulturunterständen war die Konzentration der Peptidasen stets so gering, dass sie mittels normaler SDS-PAGE und anschließender Coomassie- oder Silberfärbung nicht angefärbt, oder von anderen, höher konzentrierten Proteinen überlagert wurden, so dass eine eindeutige Zuordnung nicht möglich war.

Die Visualisierung mittels Gelatinezymografie gelang nicht bei allen Peptidasen gleich gut, da die Konzentration einiger Peptidasen sehr niedrig und das Substrat Gelatine nicht für alle Peptidasen optimal war. Die Verwendung anderer Substrate (Gluten im overlay-Verfahren, Fibrinogen Zymografie) zeigte allerdings keine signifikant anderen Ergebnisse und erwies sich als weniger praktikabel. Die Reproduzierbarkeit war bei einigen Peptidasen schwierig, da sie trotz identischer Kulturführung nicht in jedem Kulturunterstand vorhanden waren. Zusätzlich wurde eine gleichzeitige Visualisierung durch die verschiedenen pH Optima der Peptidasen erschwert. Abbildung 11 gibt einen Überblick über alle extrazellulären Peptidasen. In der Zymografie hatten sie folgende native Massen: 250, 150, 100, 37, 35, 32, 27 und 15 kDa, die leicht variierte. Da als Vergleich ein denaturierter Proteinstandard herangezogen wurde und die Peptidasen nativ vorlagen, handelte es sich nicht um deren echte Molmasse.

Die Benennung der Peptidasen wurde in Anlehnung an ihre native Größe in Polyacrylamidgelen (Zymografie, native PAGE) vorgenommen (siehe Tabelle 5).

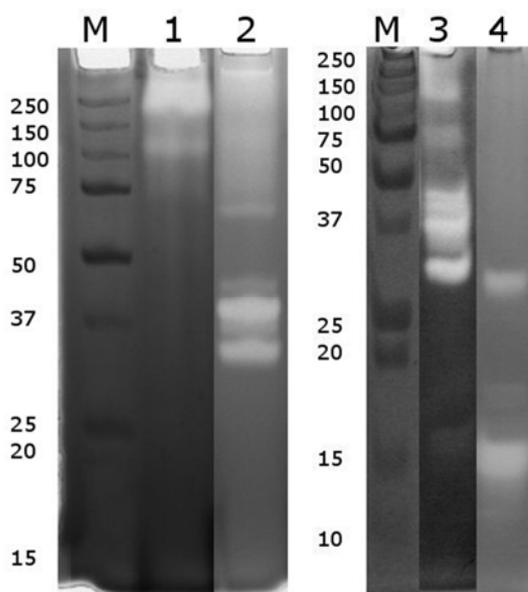


Abbildung 11: Verschiedene Zymografien mit Peptidasekonzentrat und teilgereinigten Peptidasen aus *F. velutipes* Kulturüberstand. Wegen Konzentrationsunterschieden und unterschiedlicher pH Optima können nicht alle Peptidasen gleichzeitig auf einem Gel visualisiert werden. 1: Fvp250 und Fvp150, 2: Fvp75, Fvp37, Fvp35, Fvp32 und Fvp27, 3: Fvp250, Fvp150, Fvp75, Fvp37, Fvp35, Fvp27, 4: Fvp27 und Fvp15.

Tabelle 5: Benennung der extrazellulären Peptidasen entsprechend ihres nativen Molekulargewichts.

Molekulargewicht in der Zymografie	Benennung
250 kDa	Fvp250
150 kDa	Fvp150
75 kDa	Fvp75
37 kDa	Fvp37
35 kDa	Fvp35
32 kDa	Fvp32
27 kDa	Fvp27
15 kDa	Fvp15

Bei der Kultivierung von *F. velutipes* auf anderen Substraten wich die Zusammensetzung des extrazellulären Peptidasegemisches zum Teil stark von dem mit Gluten gebildeten ab (Abbildung 12).

Substrate, die eine besonders induzierende Wirkung auf die Peptidaseaktivität hatten (Hanffaser, Biertreber und Schafwolle), erzeugten auch besonders individuelle Peptidasesekretionsmuster. Größere Unterschiede in der Peptidasesekretion im Vergleich zur Kultivierung mit Gluten fielen bei der Kultivierung auf Biertreber auf, wo nur Fvp250 und Fvp150 gebildet wurden. Auf Hanffaser war eine besonders starke Ausbildung von Fvp75 zu erkennen, Fvp27 war nicht vorhanden. Auf Schafwolle wurden Fvp250, Fvp150 und Fvp32 sowie eine Peptidase mit nativer Molmasse von ca. 65 kDa gebildet.

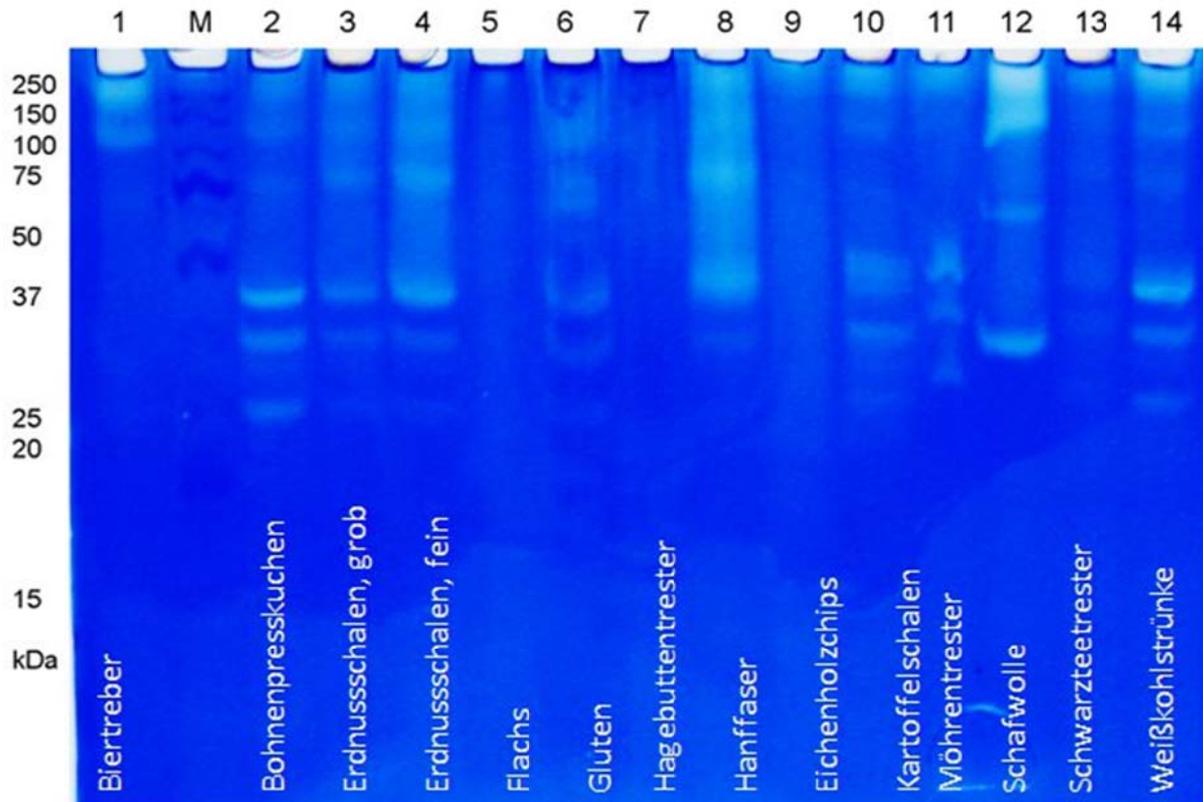


Abbildung 12: Zusammensetzung des extrazellulären Peptidasegemisches von *F. velutipes* bei Supplementation mit unterschiedlichen Substraten nach 11 Tagen Wachstum.

2.2.3 Charakterisierung der Peptidasen im Kulturüberstand

Isoelektrische Fokussierung

Um den isoelektrischen Punkt der Peptidasen zu bestimmen, wurde die IEF sowohl präparativ als auch analytisch durchgeführt. Die Identifizierung der Peptidasen erfolgte auch hier mittels Zymografie, welche bei der analytischen IEF in Form eines Overlays durchgeführt wurde.

Alle Proteine und Peptide, die in ausreichender Konzentration vorlagen, um bei der Anfärbung mit Coomassie Brilliant blue sichtbar zu sein, hatten im *F. velutipes* Kulturunterstand einen $pI < pH 6$ (Abbildung 13). Peptidolytische Aktivität war bei $pH 3,8$ und $pH 6,5$ und auch im alkalischen Bereich des Gels zu sehen ($pI 9,5$ und $pI 7,9$). Besonders die Aktivitätsentfärbung bei $pI 7,9$ war sehr stark, obwohl die Konzentration der verantwortlichen Peptidase zu gering war, um mit Coomassie detektiert zu werden.

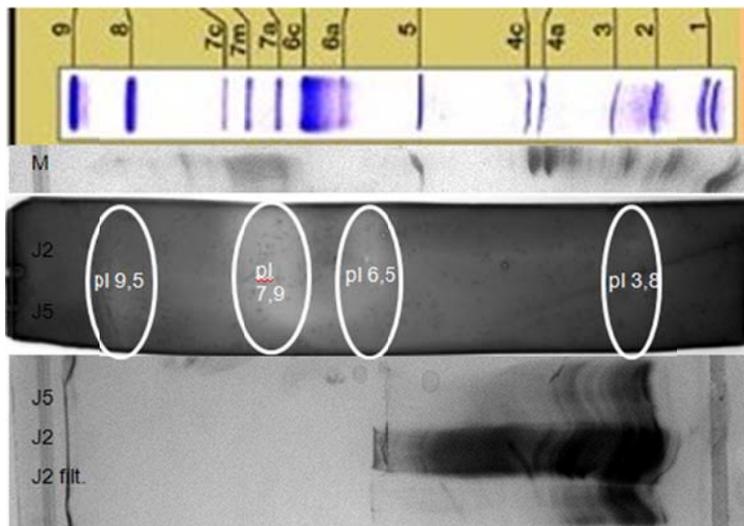


Abbildung 13: Analytische IEF mit *F. velutipes* konzentriertem Kulturüberstand. Oben: M = Marker, Mitte: Gelatine Overlay zur Detektion peptidolytischer Aktivität, unten: IEF mit Kulturüberstand, gefärbt mit Coomassie.

Zusätzlich wurde mit mehreren Proben eine präparative IEF durchgeführt. Hierfür wurden 50 mL Kulturüberstand oder Peptidasekonzentrat verwendet. In einer darauf folgenden Gelatinezymografie konnten die Ergebnisse aus der analytischen IEF bestätigt und erweitert werden (Abbildung 14).

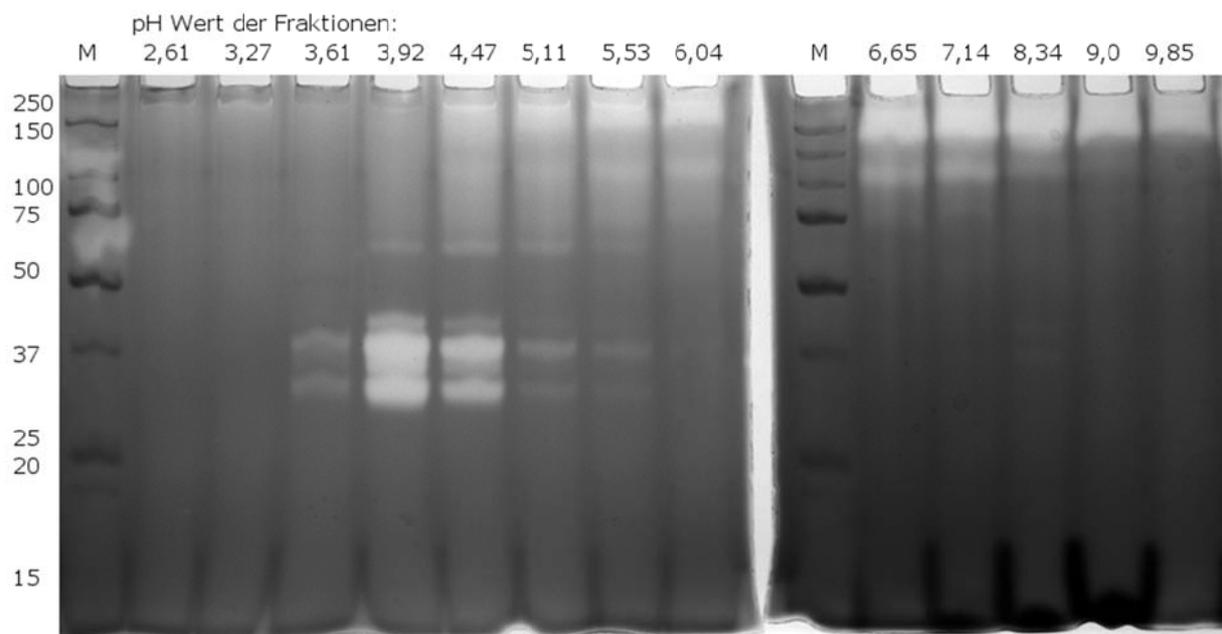


Abbildung 14: Präparative IEF mit konzentriertem Kulturüberstand von *F. velutipes*, Auftrennung der Proteine erfolgte über einen pH Bereich von pH 3 – 10.

Aus den Ergebnissen der präparativen IEF ließen sich die ungefähren isoelektrischen Punkte der *F. velutipes* Peptidasen mittels Gelatinezymografie bestimmen (siehe Tabelle 6). Für die Fvp17 konnte zunächst kein pI bestimmt werden, da dieses Enzym nur in bestimmten Puffersystemen aktiv ist. Der pI wurde unter Verwendung eines geeigneten Puffers zu einem späteren Zeitpunkt bestimmt, er lag bei pH 4 (siehe Anhang).

Tabelle 6: Isoelektrische Punkte der extrazellulären Peptidasen von *F. velutipes*

Peptidase	pI
Fvp250	5,5
Fvp150	7,1
Fvp75	4,5
Fvp37	4,0
Fvp35	3,9
Fvp32	3,9
Fvp27	3,9
Fvp15	3,9

Peptidaseinhibition

Zur Feststellung des katalytischen Typs der Peptidasen wurden Inhibitionsversuche mit Kulturüberstand durchgeführt. Als Substrat wurde Azocasein im photometrischen Assay und Gelatine in Form der Zymografie verwendet. Bei der Hydrolyse von Azocasein führte nur die Zugabe von EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure) zu einer deutlichen, die Zugabe von PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid) zu einer schwachen Aktivitätsverminderung (siehe Tabelle 7). Die Peptidaseinhibition wurde zusätzlich unter Zuhilfenahme von Zymografien durchgeführt, um die Inhibitionswirkung auf die einzelnen Peptidasen differenziert beobachten zu können.

Für die Überprüfung der inhibierenden Wirkung auf einzelne Peptidasen mittels Zymografie wurden die Proben vor der PAGE mit verschiedenen Inhibitoren vermischt und über 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Zusätzlich wurde das Gel nach dem Lauf zum Teil in inhibitorhaltigen Puffern inkubiert. Enzymhemmung sollte sich durch ein Ausbleiben einer Entfärbungsbande zeigen. Die Ergebnisse waren nicht eindeutig. Im Azocasein Assay wurde besonders mit EDTA ein inhibitorischer Effekt erzielt, dies war aber nicht in der Zymografie der Fall

(Abbildung 15). Der einzige eindeutige und reproduzierbare Inhibitionseffekt wurde mit PMSF für Fvp37 festgestellt (siehe Abbildung 16), womit Fvp37 sicher den Serinpeptidasen zugeordnet werden konnte.

Tabelle 7: Inhibition von *F. velutipes* Peptidasen mit verschiedenen Peptidasehemmern in unterschiedlichen Konzentrationen bei Verwendung eines photometrischen Assays mit Azocasein.

<i>F. velutipes</i> Peptidasekonzentrat	Spezifisch inhibierte Peptidasen	Inhibitor- Konzentration	Verbleibende Aktivität [%]
+ EDTA	Metallopeptidasen	1 mM	60
+ EDTA	Metallopeptidasen	10 mM	60,1
+ EDTA	Metallopeptidasen	20 mM	55,5
+ EDTA	Metallopeptidasen	25 mM	45,7
+ EDTA	Metallopeptidasen	50 mM	32,0
+PMSF	Serinpeptidasen	1 mM	94,0
+PMSF	Serinpeptidasen	5 mM	87,1
+PMSF	Serinpeptidasen	10 mM	79,0
+ AEBSF (Pefabloc SC ^R)	Serinpeptidasen	1 mM	102
+ Antipain	Serinpeptidasen	0,2 mM	99
+ Chymostatin	Serin- und Cysteinpeptidasen	0,2 mM	97
+ Pepstatin	Aspartatpeptidasen	1 µM	93

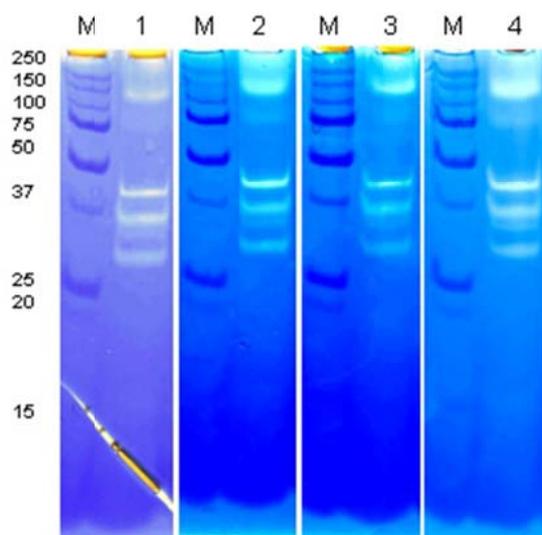


Abbildung 15: Zymografie von Peptidasehemmung mit verschiedenen Inhibitoren, der Inhibitor wurde dem Inkubationspuffer beigelegt. 1 = *F. velutipes* Peptidasekonzentrat (Konz.) ohne Inhibitor, 2 = Konz. + 100 µM Antipain, 3 = Konz. + 10 µM EDTA, 4 = Konz. + 1 µM Pepstatin.

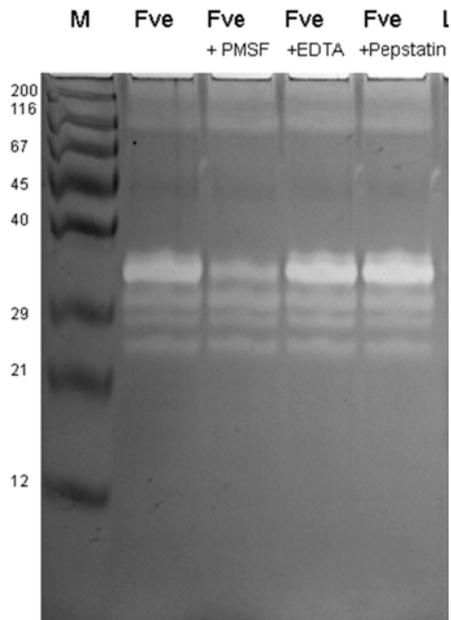
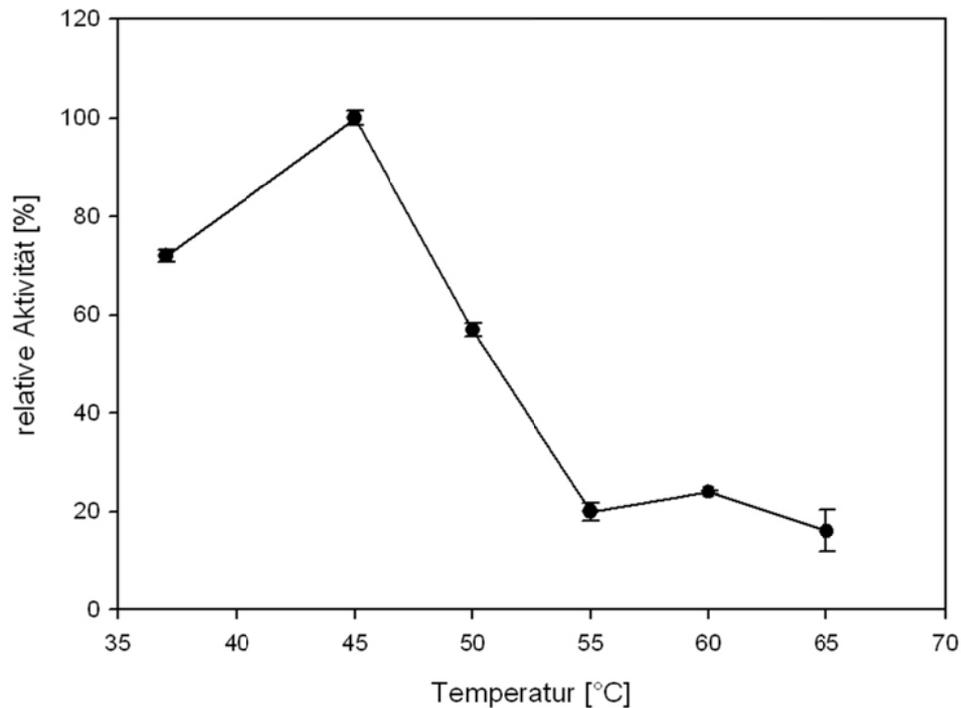
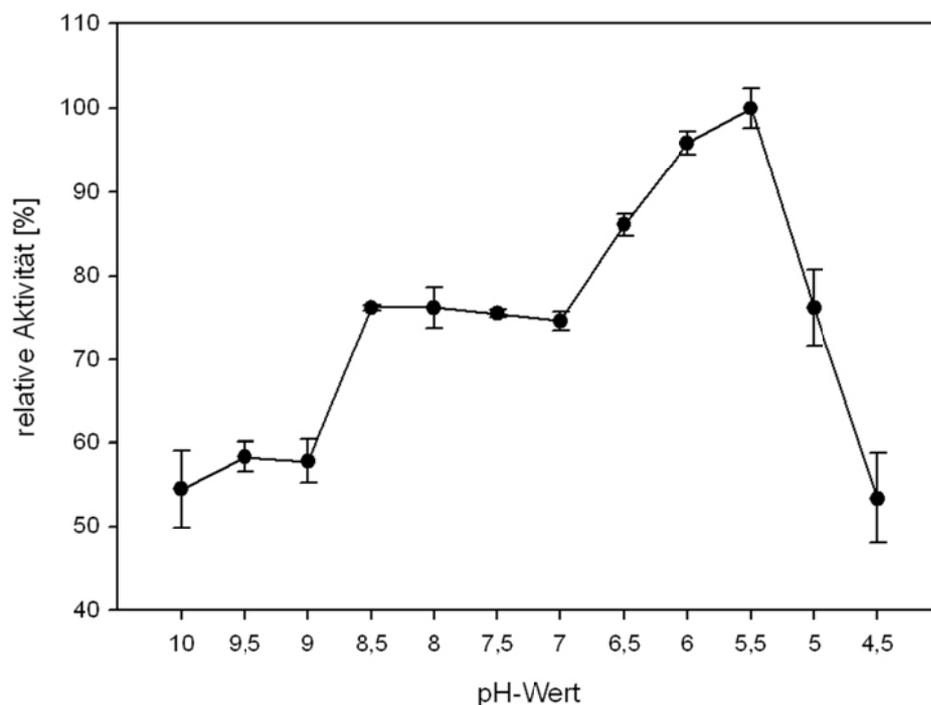


Abbildung 16: Zymografie mit inhibierten Proben aus Peptidasekonzentrat mit verschiedenen Inhibitoren (Inhibitorkonzentrationen wie in Abbildung 15). Die Inhibition der Proben fand vor dem Auftrag auf das Gel statt.

Temperatur- und pH-Optimum des Peptidasekonzentrates

Für das *F. velutipes* Peptidasekonzentrat wurden die optimalen Hydrolysebedingungen mittels Azocasein Assay ermittelt. Es zeigte sich, dass das Temperaturoptimum bei ca. 45 °C (Abbildung 17) und der optimale pH Wert im schwach sauren Bereich bei pH 5,5 lag. Die Aktivität blieb über den gesamten Messbereich (pH 10 – 4,5) sehr stabil (Abbildung 18).

Da das Peptidasekonzentrat aus verschiedenen Peptidasen zusammengesetzt war, handelte es sich hierbei wahrscheinlich um Bedingungen, unter denen alle am Substratabbau beteiligten Peptidasen relativ aktiv waren, jedoch nicht um individuelle Optimalbedingungen.

Abbildung 17: Temperaturoptimum des Peptidasekonzentrates von *F. velutipes*.Abbildung 18: pH Optimum des Peptidasekonzentrates von *F. velutipes*.

Mittels Zymografie war es zudem möglich, die Aktivität der einzelnen Peptidasen auch ohne vorherige Aufreinigung einzuschätzen, indem der Inkubationsschritt bei verschiedenen pH Werten durchgeführt wurde. Bei pH 6,0 – pH 7,5 waren alle Peptidasen bis auf Fvp15 aktiv, bei pH 3,8 waren zeigten sie nur eine sehr schwache Restaktivität (siehe Abbildung 19). Im Gegensatz hierzu waren die extrazellulären

Peptidasen von *Laetiporus sulphureus* nur im sauren Bereich aktiv. Bei diesen handelt es sich wahrscheinlich um extrazelluläre Aspartatpeptidasen, denn Aspartatpeptidasen haben im Allgemeinen ihr Aktivitätsmaximum bei niedrigen pH Werten. *F. velutipes* scheint, zumindest bei Induktion mit Gluten, keine extrazellulären Aspartatpeptidasen zu bilden.

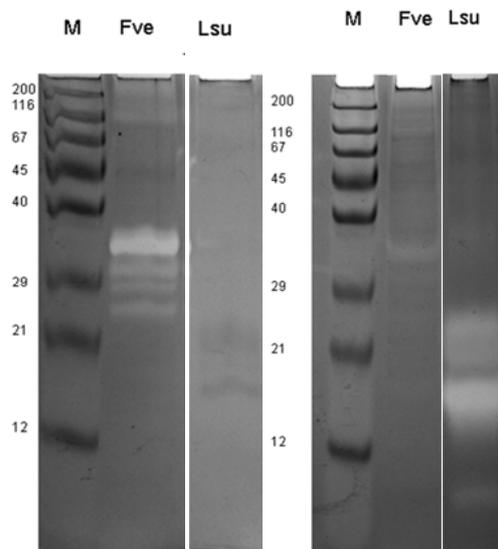


Abbildung 19: Zymografie mit Proben von *F. velutipes* (Fve) Peptidasekonzentrat und zum Vergleich *Laetiporus sulphureus* (Lsu) Kulturüberstand. Links: Gelinkubation bei pH 7,5 (Kaliumphosphat, 50 mM), rechts: Gelinkubation bei pH 3,8 (Natriumcitrat, 50 mM).

2.3 Konzentrierung und Aufreinigung von Peptidasen aus *F. velutipes* Kulturunterständen

2.3.1 Vorreinigung des Peptidasegemisches mittels Hydrophober Interaktionschromatografie

Die durch Kultivierung von *F. velutipes* auf Koji Gluten erzeugten, peptidasereichen Kulturunterstände wurden als Ausgangsmaterial für die Aufreinigung der extrazellulären Peptidasen verwendet. Hierfür wurde ein mehrstufiger Aufreinigungsprozess entwickelt.

Zunächst wurde die Aufreinigung einzelner Peptidasen aus dem Kulturunterstand von *F. velutipes* mittels Hydrophober Interaktionschromatografie (HIC) versucht. Hierzu wurden unterschiedlich substituierte Säulen am BioRad Duo Flow System (Fast Protein Liquid Chromatography, FPLC) auf ihre Eignung hierfür getestet. Obwohl ein Aufreinigungseffekt erkennbar war, erwies sich keine der verwendeten Säulen als ideal für die vollständige Reinigung einer einzelnen Peptidase. Allerdings war die Abtrennung aller Peptidasen gemeinsam von störenden Substanzen aus dem Kulturüberstand mit allen HIC-Säulen, die eingesetzt wurden, möglich. Es wurden 1 mL Säulen mit den Matrices Octyl Sepharose FF, Butyl Sepharose HP, Phenyl Sepharose (low sub) FF und Phenyl Sepharose (high sub) FF verwendet. Hierzu wurde die mit 1 M Ammoniumsulfat in Endkonzentration versetzte Probe auf die ebenso konditionierte Säule aufgetragen, der Durchbruch abgespült und die Peptidasen danach mit 50 mM Phosphatpuffer eluiert. Bei 1 M Konzentration von Ammoniumsulfat waren alle Peptidasen an die Säule gebunden. So konnte ein Großteil der unerwünschten Substanzen (Polysaccharide, Aminosäuren) des Kulturüberstandes abgetrennt werden (siehe Abbildung 20 und Abbildung 21). Diese Methode wurde im Folgenden als erster Aufreinigungsschritt verwendet, optimiert und auf einen größeren Maßstab (20 mL und 200 mL Phenyl Sepharose (high sub) FF) übertragen. Die Aktivitätsverluste lagen unter 5 %.

2 Ergebnisse

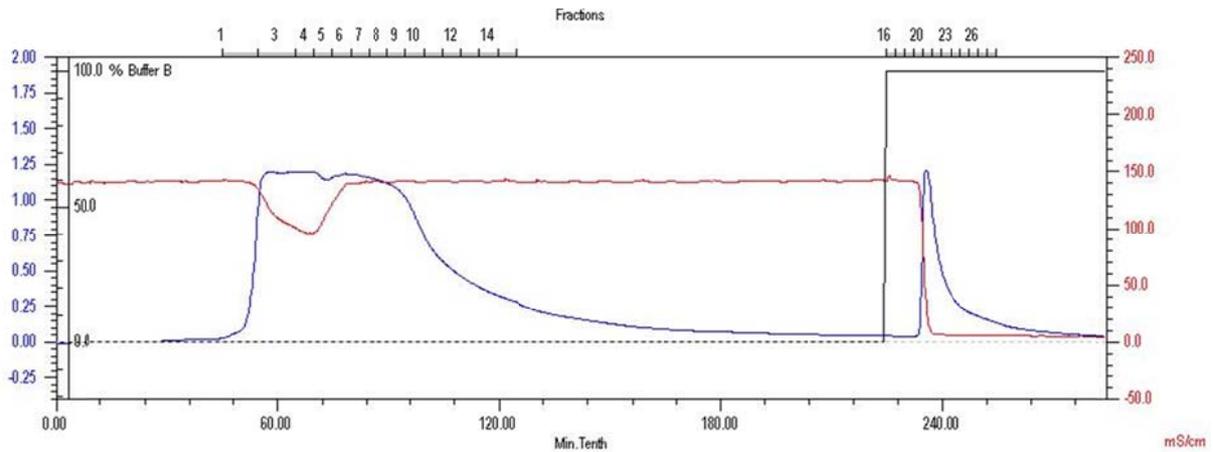


Abbildung 20: Chromatogramm von einer FPLC / HIC Aufreinigung von *F. velutipes* Kulturüberstand. Anfangskonditionen: 1 M Ammoniumsulfat, Elution ohne Gradient bei 0 M Ammoniumsulfat.

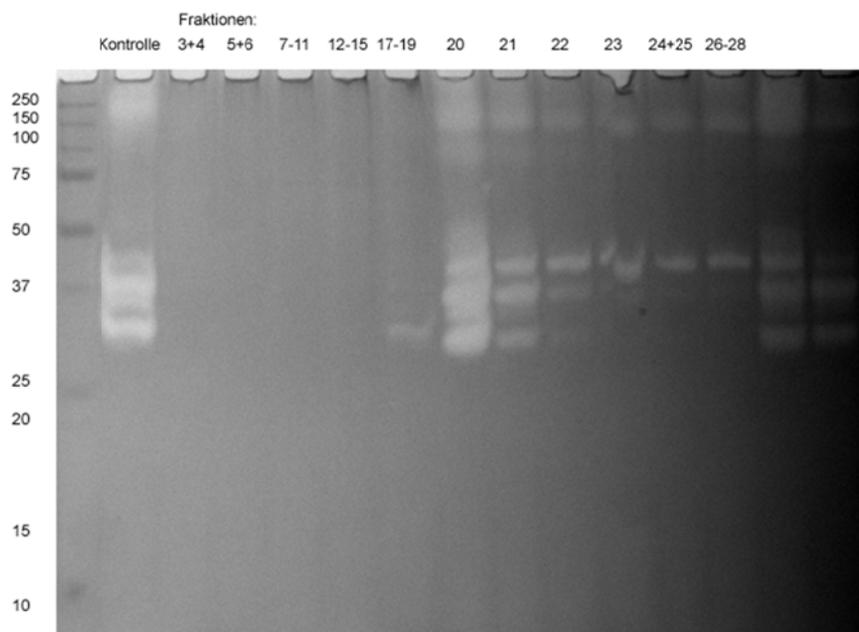


Abbildung 21: Zymografie mit Fraktionen von *F. velutipes* Kulturüberstand, aufgereinigt über FPLC / HIC mit einer 20 mL Phenyl Sepharose (high sub) FF Säule.

Um die Durchsatzrate zu erhöhen, wurde eine Methode entwickelt, bei der anstelle von Phenylsepharose Polyamid (geeignet für chromatografische Anwendungen) verwendet wurde. Die Aufreinigung erfolgte nach der gleichen Methode, allerdings in handgegossenen Säulen ohne ein angeschlossenes Drucksystem. Die Wiederfindungsrate der peptidolytischen Aktivität sank zunächst auf ca. 50 % ab, allerdings konnte gleichzeitig die Durchsatzrate erheblich erhöht werden. Die verlorene Aktivität wurde jedoch nicht denaturiert, sondern blieb am Polyamid gebunden. Die Elution mit 50 mM Na_2CO_3 , pH 11 anstelle von 50 mM Natriumphosphat, pH 7 verbesserte die Peptidaseausbeute auf 78 % der

Ausgangsaktivität. Die Beladungskapazität des Polyamids mit Unterstand von *F. velutipes* Kulturflüssigkeit lag beim mindestens 5-fachem des Säulenvolumens. Eine höhere Beladung war nicht praktikabel, da der Kulturunterstand sehr viskos war. Die erhaltenen Eluate wurden in der Zentrifuge über 10.000 MWCO Membranen aufkonzentriert. Je nach folgendem Verwendungszweck lag der Konzentrationsfaktor bei 10 bis 100.

2.3.2 Aufreinigung einzelner Peptidasen aus dem Peptidasekonzentrat mittels präparativer PAGE

Bei dieser Methode wurden 1 - 2 mL Peptidasekonzentrat aus der ersten Reinigungsstufe über eine 12 cm hohe und ca. 150 mL fassende 12 %-ige Polyacrylamidsäule getrennt. Im Gegensatz zur herkömmlichen PAGE wurde der Lauf nicht zu einem Zeitpunkt gestoppt, an dem sich noch alle Zielenzyme im Gel befanden. Stattdessen durchliefen alle Proteine das Gel vollständig, was abhängig von Ihrer Größe unterschiedlich lang dauerte, und wurden schließlich unter dem Gel mit einem Elutionspuffer weggeführt und fraktioniert gesammelt (Abbildung 22). Die Peptidasen wurden dabei in nativem Zustand erhalten.

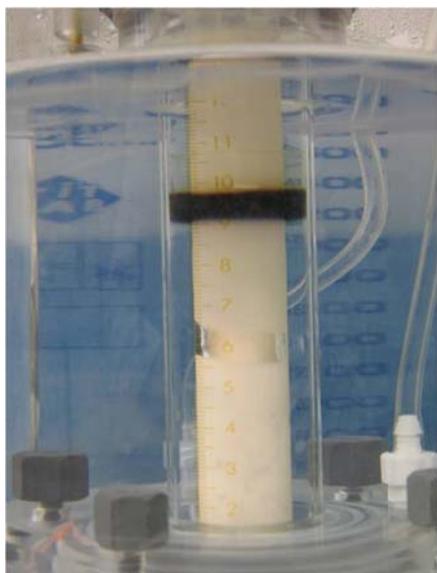


Abbildung 22: Apparatur der präparativen SDS-PAGE mit 2 mL Peptidasekonzentrat im Sammelgel (sichtbar als dunkelbrauner Ring).

Mit dieser Methode war es möglich, Fvp15, Fvp27 und Fvp37 vollständig von anderen peptidolytischen Aktivitäten zu reinigen. Fvp32 und Fvp35 konnten nur bedingt aufgereinigt werden, da sie aufgrund ihres geringen Größenunterschiedes

fast zeitgleich eluierten. Fvp150 und Fvp250 konnten nicht aus dem Gel eluiert werden. Die theoretische Zeit, die sie zum Durchwandern des Gels benötigt hätten, lag bei einigen hundert Stunden. Da das Gel aber schon nach 100 Stunden stark durch Risse geschädigt war, wurden alle Läufe spätestens nach dieser Zeit abgebrochen. Auch die Verwendung eines 5 %-igen Geles war nicht erfolgreich, da auch dieses zu schnell Beschädigungen aufwies. Durch die sehr langen Laufzeiten (80 – 90 h) kam es zu einer starken Verdünnung der Peptidasen im Elutionspuffer. Daher wurden alle Fraktionen mittels Membranzentrifugation um den Faktor 20 – 40 konzentriert, bevor der Aufreinigungserfolg mittels Zymografie überprüft werden konnte (Abbildung 23). Fraktionen, die jeweils die gleiche Peptidase enthielten, wurden gepoolt und für weitere Versuche verwendet.

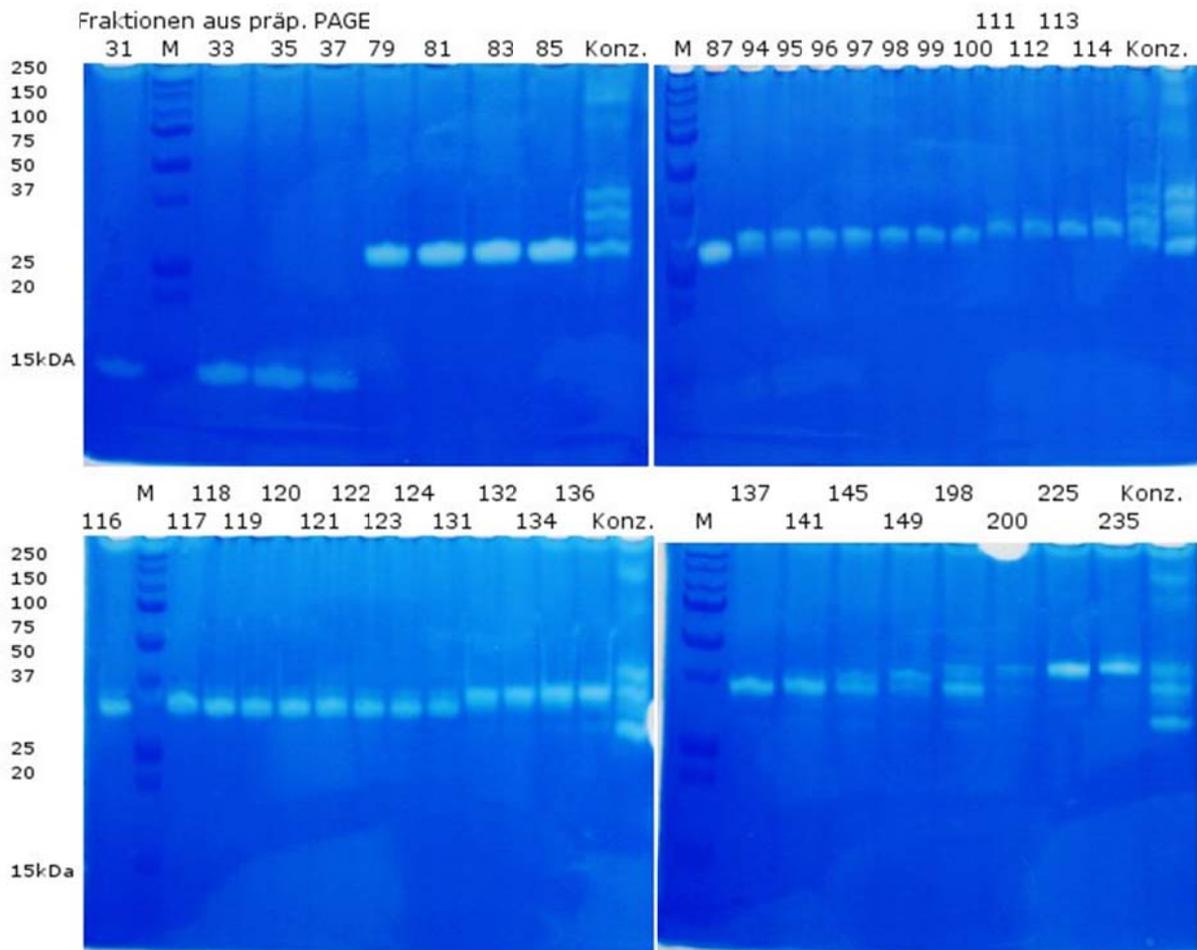


Abbildung 23: Zymografie (12 %) mit konzentrierten Fraktionen aus der präparativen PAGE (Auswahl). Konz. = Peptidasekonzentrat (Kontrolle).

2.3.3 Aufreinigung einzelner Peptidasen aus dem Peptidasekonzentrat mittels Ionenaustauschchromatografie (IEX)

Da die präparative PAGE keine zufriedenstellenden Erfolge bei der Aufreinigung von Fvp250 und Fvp150 zeigte, wurden für diese andere Aufreinigungsmethoden angewendet. Die isoelektrische Fokussierung hatte gezeigt, dass Fvp15, Fvp27, Fvp32, Fvp35 und Fvp37 alle einen sehr ähnlichen pI von ca. 4, Fvp150 und Fvp250 jedoch einen pI im basischen Bereich hatten, bot sich eine Abtrennung dieser beiden Gruppen voneinander mittels Ionenaustauschchromatografie (IEX) an. Hierzu wurden Versuche mit verschiedenen IEX Säulen an der FPLC durchgeführt. Mit Kationentauschersäulen (Sulfopropyl-Sepharose (SP) und Carboxymethyl-Sepharose (CM)) konnten bei der Verwendung von sauren Puffern (pH 6 – 3,8) und der Elution mit linear steigendem Natriumchloridgehalt (von 0 bis 1 M) keine Peptidasen an die Säule gebunden werden. Mit verschiedenen Anionentauschern wurde dann jedoch das gewünschte Ergebnis erzielt.

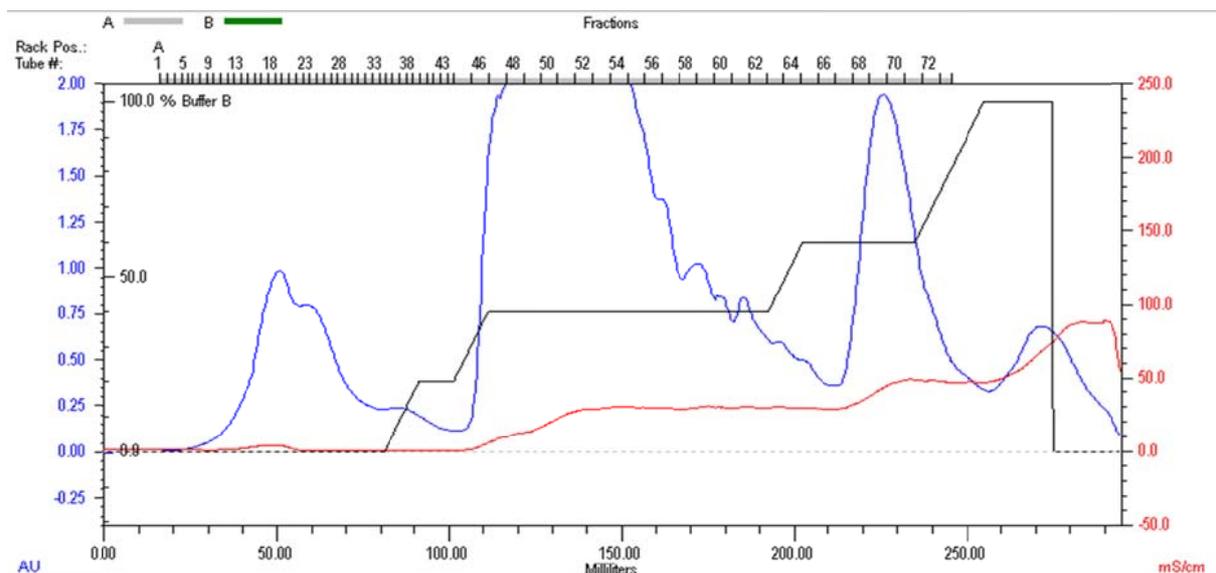


Abbildung 24: Chromatogramm von FPLC mit schwachem Anionentauscher (DEAE Sepharose FF, 20 mL) mit 2 mL Peptidasekonzentrat (vorgereinigt mittels präparativer HIC Chromatografie).

Es wurden sowohl ein starker Anionentauscher (Q Sepharose, mit quarternären Aminen substituierte und quervernetzte Agarose) als auch zwei schwache Anionentauscher (Diethylaminoethyl (DEAE) Sepharose und Diethylaminopropyl (ANX) Sepharose) getestet. Fvp250 und Fvp150 wurden am effektivsten über die DEAE Sepharose FF Säule abgetrennt (Abbildung 24 und Abbildung 25).

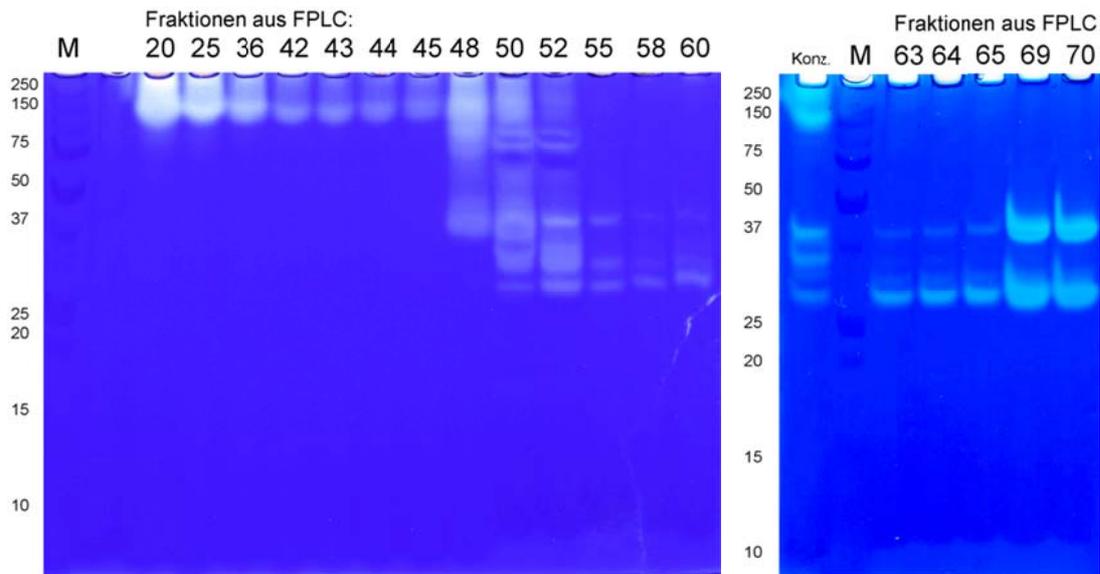


Abbildung 25: Zymografie von ausgewählten Fraktionen aus Anionentauscher (DEAE FF) FPLC (Abbildung 24).

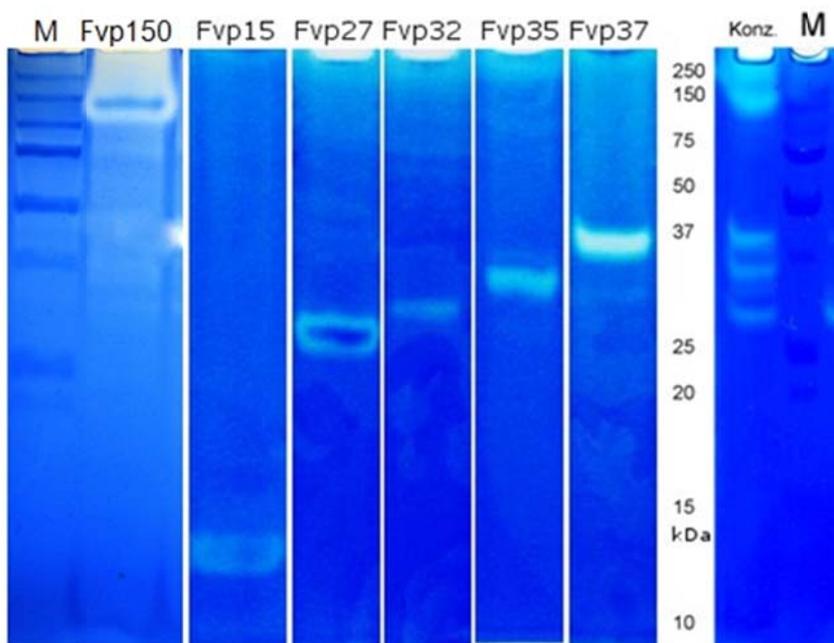
Unter den gewählten Bedingungen (Puffer 1 = Tris, 50 mM, pH 8,0, Puffer 2 = Tris, 50 mM, pH 8,0 + 1 M NaCl) befanden sich Fvp250 und Fvp150 im Durchbruch (Fraktionen 15 – 45), alle anderen Peptidasen eluierten später bei steigendem Natriumchloridgehalt.

Bei der Pufferwahl erwies sich ein Tris pH 9,0 als optimal, da unter diesen Bedingungen die gesuchten Peptidasen, im Gegensatz zu den übrigen Peptidasen, nicht an die Säule gebunden wurden (siehe Abbildung 25), sondern mit dem Durchbruch eluierten. Bei einer Erhöhung des pH Wertes des Puffers auf pH 10 wurden alle Peptidasen an die Säule gebunden und konnten nicht mehr voneinander getrennt werden.

Um für Aktivitätsassays alle Peptidasen in vergleichbaren Mengen einsetzen zu können, wurde die Proteinkonzentration in den Peptidaseproben bestimmt und die ermittelten Konzentrationen als Richtwert herangezogen (Tabelle 8). Spuren von nichtpeptidolytischen Proteinen waren noch in allen Proben enthalten, wurden jedoch als unvermeidlich toleriert. Abbildung 26 zeigt alle aufgereinigten Peptidasen in der Gelatinezymografie.

Tabelle 8: Maximal erreichte Proteinkonzentration in Proben einzelner Peptidasen nach Aufreinigung

Peptidase	Proteinkonzentration nach Aufreinigung
Peptidasekonzentrat	51,82 mg mL ⁻¹
Fvp150	13,25 mg mL ⁻¹
Fvp37	6,40 mg mL ⁻¹
Fvp35	1,75 mg mL ⁻¹
Fvp32	1,00 mg mL ⁻¹
Fvp27	0,77 mg mL ⁻¹
Fvp15	7,28 mg mL ⁻¹

Abbildung 26: Im zweistufigen Verfahren erfolgreich aufgereinigte Peptidasen aus *F. velutipes* Kulturunterstand.

2.4 Sequenzierung und Charakterisierung der aufgereinigten Peptidasen aus *F. velutipes*

2.4.1 Sequenzierung

Proben zur Sequenzierung wurden von allen Peptidasen gewonnen. Insgesamt wurden ca. 80 Peptidsequenzen erhalten, von denen aber viele, trotz guter Qualität, keiner homologen Sequenz zugeordnet werden konnten. Auf die Sequenzen von Fvp150 und Fvp35 traf dies besonders zu. Da diese Sequenzen aber reproduzierbar waren, kann angenommen werden, dass es sich um Peptidasen handelte, auch wenn keine Homologien zu bekannten Familien bestanden. Es gab bei der Sequenzierung zudem Hinweise auf bestehende Glycosylierungen einiger Peptidasen, was bei extrazellulären Enzymen nicht ungewöhnlich ist und zu Problemen bei der Sequenzierung führen kann [53]. Vier weitere Peptidasen wiesen hohe Homologien zu bekannten Peptidasefamilien auf (Tabelle 9).

Der Expect (E) value ist ein Parameter, der die zu erwartende Anzahl an Treffern beschreibt, die beim Abgleich einer Sequenz mit einer Datenbank bestimmter Größe zu erwarten sind. Er dient dazu, die Wahrscheinlichkeit abschätzen zu können, mit der eine gefundene Übereinstimmung nur rein zufällig besteht. Die Signifikanz eines Treffers ist umso höher, je niedriger der E-value ist [54].

Tabelle 9: Klassifizierung von *F. velutipes* Peptidasen mittels Peptidsequenzvergleich.

Peptidase	Peptidsequenz	Klassifizierung	Homologie zu	Accession. no.	E-value
Fvp150	LAPEGTLGAWPGDNT NNCAQGYNCAPSLT LDPYDVFGR	Unbekannt	Hypothetical protein CC1G_09442 [<i>Coprinopsis cinerea</i> okayama7#130]	XP_001834028.2	2e-06
	GLFLNDEQPGLQLWA MEK	Unbekannt	Hypothetical protein CC1G_09442 [<i>Coprinopsis cinerea</i> okayama7#130]	XP_001834028.2	0.002
Fvp37	LGLLDTGLDYTHPALG GGFGEGFK	Peptidase S08	Subtilisin Carlsberg [[<i>Verticillium albo-atrum</i> VaMs.102] Hypothetical protein MPER_02153 [<i>Moniliophthora perniciosa</i> FA553]	XP_002999612.1 XP_002397422.1	7e-05 1e-08
	VFGCSGFVSDDVLVD ALLR	Peptidase S08, Unterfamilie 5	Subtilisin-like protease [<i>Pleurotus ostreatus</i>]	CAG25549.1	2e-05
	AEGEDADVQTTHLLT GVDK	Peptidase S08	Peptidase [<i>Coprinopsis cinerea</i> okayama7#130]	XP_001830835.2	0.21
Fvp32	YCGLVGGQSLDFSTL DSELK	Peptidase S41	Hypothetical protein SCHCODRAFT_85499 [<i>Schizophyllum commune</i> H4-8]	XP_003030025.1	9e-07
	QDGFFSSYQR	Peptidase S41	Hypothetical protein MPER_09715 [<i>Moniliophthora perniciosa</i> FA553]	XP_002390931.1	133
	LGYGLDDPSEPEEWQ DRPADVNLPLTVDLA NNPAK	Carboxylprotease, Peptidasefamilie S41A	Hypothetical protein SCHCODRAFT_70503 [<i>Schizophyllum commune</i> H4-8]	XP_003027703.1	3e-07
	ATFGLSDVTHLDDAA GALR	Lysosomal Pro-X Carboxypeptidase	Hypothetical protein SCHCODRAFT_72113 [<i>Schizophyllum commune</i> H4-8]	XP_003036699.1	0.002

Peptidase	Peptidsequenz	Klassifizierung	Homologie zu	Accession. no.	E-value
Fvp27	FCDALEVK	Endoprotease	Endoprotease [<i>Coprinopsis cinerea</i> okayama7#130]	XP_001837581.2	44
	LVNVETNYDAR	Serincarboxypeptidase S28	Predicted protein [<i>Laccaria bicolor</i> S238N-H82]	XP_001876958.1	0.019
	EATMNAEGVELQSTD R	Putative serine protease	Hypothetical protein SCHCODRAFT_255047 [<i>Schizophyllum commune</i> H4-8]	XP_003038010.1	2.8
	NNLWDWQSLQTNSG PGTQFTK	Serinecarboxypeptidase S28	Predicted protein [<i>Laccaria bicolor</i> S238N-H82]	XP_001876958.1	9e-07
	ATFGLSDVTHLDDAA QLR	Putative serine protease	Hypothetical protein SCHCODRAFT_72113 [<i>Schizophyllum commune</i> H4-8]	XP_003036699.1	3.8
	LPPYNTVYYFDQLLDH DDASK	Putative serine protease	Hypoth. protein SCHCODRAFT_255047 [<i>Schizophyllum commune</i> H4-8]	XP_003038010.1	3e-08
	DAWLQADVNR	Fungalysin metallopeptidase (M36)	Metalloprotease MEP2 [<i>Coprinopsis cinerea</i> okayama7#130]	XP_001839300.2	55
Fvp15	LQPCNPTLV SAR	Fungalysin metallopeptidase (M36)	Predicted protein [<i>Laccaria bicolor</i> S238N-H82]	XP_001882070.1	0.27
	ATTALCSGTTVSAR	Mikrobielle Collagenase	Mikrobielle Collagenase [<i>Micromonospora</i> sp. L5]	ZP_06399128.1	131
	SYPYSTSATNPLR	Metallopeptidase Fungalysin (M36)	Predicted protein [<i>Laccaria bicolor</i> S238N-H82]	XP_003033607.1	0.002
	VTSVLNAVANENSSS R	Metallopeptidase Deuterolysin M35, Metalloproteinase 8	Hypothetical protein CC1G_12425 [<i>Coprinopsis cinerea</i> okayama7#130]	XP_001839153.2	6e-04
	DASAPTNPASTAGNA VWLHLLLDALK	Metallopeptidase Fungalysin (M36)	Metalloprotease [<i>Coprinopsis cinerea</i> okayama7#130]	XP_001835337.1	0.014
	LSDTDDV TYGCDADQ ALSDAQSLR	Metallopeptidase Deuterolysin M35	Hypothetical protein SCHCODRAFT_83719 [<i>Schizophyllum commune</i> H4-8]	XP_003037751.1	5e-07

Anhand der Sequenzierungsergebnisse ließen sich vier extrazelluläre Peptidasen aus *F. velutipes* eindeutig zuordnen. Fvp37 gehört zur Familie S8A (Subtilasen) vom Clan SB. Diese Familie besteht aus extrazellulären Serinendopeptidasen. Fvp32 gehört zur Familie der S41 Carboxypeptidasen und Fvp27 zur Familie der prolylspezifischen Exopeptidasen (Familie S28). Fvp15 ist eine Metallopeptidase, die sich der Familie der Deuterolysine (M35) zuordnen lässt, jedoch auch Homologien zu den Fungalysinen (M36) aufweist.

In Tabelle 10 wird ein kurzer Überblick über die Peptidasefamilien gegeben, denen Peptidasen aus *F. velutipes* zugeordnet werden konnten. Die Beschreibung der Peptidasefamilien basiert auf der MEROPS Peptidase Database [55]. In dieser online-Datenbank werden Peptidasen nach Sequenzhomologie und gemäß ihres katalytischen Typs in Clans und Familien gruppiert, wobei Clans aus Familien bestehen, bei denen aufgrund von strukturellen Gemeinsamkeiten auf eine gemeinsame Abstammung geschlossen werden kann. Der erste Buchstabe des Clans bezeichnet den katalytischen Typ: A = Aspartat; C = Cystein; G = Glutaminsäure; M = Metallo; S = Serin; T = Threonin und U = unbekannt, der zweite Buchstabe ist eine systematische alphabetische Benennung.

Tabelle 10: Zuordnung der *F. velutipes* Peptidasen gemäß der MEROPS Peptidase Database.

Peptidase aus <i>F. velutipes</i>	Clan	Peptidasefamilie		Katalytischer Typ
Fvp150	?	?	?	Hohe Homologie zum "Hypothetical protein CC1G_09442 aus <i>Coprinopsis cinerea</i> okayama7#130", es ist aber keine Zuordnung zu einer Peptidasefamilie möglich.
Fvp37	SB	S08	Subtilisine	Peptidasefamilie S08 besteht aus der Serinpeptidase Subtilisin und homologen Enzymen.
Fvp32	SK	S41	C-terminal processing peptidase family	Peptidasefamilie S41 besteht aus Serin-Endopeptidasen (wurden bisher noch nicht in Pilzen identifiziert).
Fvp27	SC	S28	Prolylspezifische Serinexopeptidasen	Peptidasefamilie S28 besteht aus Exo-Peptidasen die Prolylbindungen hydrolysieren (wurden bisher nur in Eukaryonten gefunden).
Fvp15	MA	M35	Deuterolysine	Peptidasefamilie M35 besteht aus Metallo-Endopeptidasen (wurden bisher nur in Pilzen und Bakterien gefunden)

Anhand von Sequenzvergleichen mit dem Programm ClustalW [56] konnte eine hohe Homologie aller drei von Fvp37 bekannten Partialsequenzen mit der Subtilase S08.139 (PoSI (*Pleurotus ostreatus*)-type Peptidase) aus *P. ostreatus* festgestellt werden (Abbildung 27). PoS1 ist ein monomeres Glycoprotein mit einer molaren Masse von 75 kDa [10].

Fvp27 gehört zur Familie S28. Diese Peptidasen weisen meist eine hohe Spezifität für Prolylbindungen auf, wobei die meisten Enzyme dieser Familie als Exopeptidasen Mono-, Di- oder Tripeptide vom N- oder C-Terminus abspalten. Durch Sequenzabgleich mit ClustalW zeigte sich, dass alle Fvp27 Partialsequenzen hohe Homologien zur "Acid prolyl endopeptidase" S28.004, einem hypothetischen Protein aus *Laccaria bicolor* (S238N-H82) aufwiesen (Abbildung 28). Daher gehört Fvp27 mit großer Wahrscheinlichkeit ebenfalls zur Gruppe S28.004.

Die Zuordnung von Fvp32 zu einer Peptidasefamilie erwies sich als schwieriger, da die Familie S41 insgesamt relativ klein ist. In der Merops Datenbank [6] wurden bisher keine S41 zugehörigen Peptidasen aus Asco- oder Basidiomyceten gelistet. Die gefundenen Homologien beziehen sich daher auch fast ausschließlich auf hypothetische Proteine aus *Schizophyllum commune* (siehe Abbildung 29).

```

Fvp37      -----
MER047718  NKVIGGFDLVGDDYDGTNTPVPDPDPLDQCAGHGTHVAGIIGANPDNAFNISGVAFQASL 240

Fvp37      ----VFGCSGFVSDDVLDALLR----- 19
MER047718  SAYRVFGCVGFVTDDVLDALLLGFNEGQDILTSLGGADGWTESVSAVVASRIAATGKV 300
          **** *:*****

Fvp37      -----
MER047718  VTIAAGNDGASGAWYTSSPCNGIDVISVASLDNTVWPLQTAQVHGVTHTDPIIYQDTFPLP 360

Fvp37      -----
MER047718  SLRKRAIGFKVDREFNTQGLFVGAALTLSDAQDVGQIQSTTGWKSIRPVRAFDPRPKPVKV 120

Fvp37      --AEGED----ADVQTTHLLTGVDK----- 19
MER047718  QVVKGPDDPALPPDSESTHVITGVDKLHAQGITGAGIKIGILDTGIDYTHPTLGGAFGPG 180
          .:* *      .* :*:*****

Fvp37      -----
MER047718  NKVIGGFDLVGDDYDGTNTPVPDPDPLDQCAGHGTHVAGIIGANPDNAFNISGVAFQASL 240

Fvp37      -----
MER047718  SLRKRAIGFKVDREFNTQGLFVGAALTLSDAQDVGQIQSTTGWKSIRPVRAFDPRPKPVKV 120

Fvp37      -----LGLLDTGLDYTHPALGGGFEG 22
MER047718  QVVKGPDDPALPPDSESTHVITGVDKLHAQGITGAGIKIGILDTGIDYTHPTLGGAFGPG 180
          :*:****:*****:***.** *

Fvp37      FK----- 24
MER047718  NKVIGGFDLVGDDYDGTNTPVPDPDPLDQCAGHGTHVAGIIGANPDNAFNISGVAFQASL 240
          *

```

Abbildung 27: Sequenzvergleich zwischen den bekannten Partiaalsequenzen von Fvp37 und der Subtilase S08.139 (PoSI (*Pleurotus ostreatus*)-type Peptidase) aus *P. ostratus*.

2 Ergebnisse

```

Fvp27 -----LP 2
MER137140 MTCLALWKLALCAVSLSSVTATLLPDGRPHAMMMRPPGVPLVHIPAPDAPVISRNGTVLP 60
                                         **

Fvp27 PYNTVYYFDQLLDHDDASK----- 21
MER137140 PYNTLYEFDQLIDHKNP SLGTFKQRFWHTYEFYEPGGPIILSTPGETNAGGYTGYLTNRT 120
****:* ****:* **.:.*

Fvp27 -----
MER137140 INGLIAQQENGSTIVLEHRFYGFSNPYPDLSVASLKYHTIQQAIDDLLEYFAKNVHLPMPG 180

Fvp27 -----
MER137140 GDQLTPDKAPWILIGGSYSGALTSWTMVNKPGLFFAGYSSSGVVQAILDFWQYFEPYRQ 240

Fvp27 -----NNLWDWQSL 9
MER137140 MPQNCSTDVQAVMTHIDRVFLSGNKTAIQAIKESFGMESVKYLDDVAGALRNMLWDWQSL 300
*****

Fvp27 QTNSGPGTQFTK----- 21
MER137140 QVTSGPGAQFYQFCDALEVKDQGSAPASGWLGHALSWSNYWKTYYATICGEHDAETC 360
*..****:* ** :

Fvp27 -----
MER137140 LGTYDTTQTSWHDTSIDNAGRSWTWIVCNEVG YFQEGAPLGQKSIVTRLVQPPYEFRCQ 420

Fvp27 -----EATMNAEGVELQST-- 14
MER137140 QMFTGAFPYSIAIPNTLHTNLLYRGWNVKVDRLF FANGIRD PWREATMSAQLNAKSTLS 480
****.*:*: :**

Fvp27 -----DR----- 16
MER137140 QPIALSDGFHCSDLGASAAQVDPTIATVHKQALESFRTWLSTWKPRGQGRPVTSRSLPQ 540
*

Fvp27 -----
MER137140 PARKVSPVISKPLSAWLKAGVL 564

```

Abbildung 28: Sequenzvergleich zwischen bekannten Partialsequenzen von Fvp27 und “Acid prolyl endopeptidase“ (S238N-H82) aus der Familie S28.004.

```

> |gb|ADMJ01000154.1|  Schizophyllum commune H4-8 SCHC0scaffold_7_Cont154, whole genome
shotgun sequence
Length=703087

Score = 39.7 bits (91), Expect = 4e-04, Method: Compositional matrix adjust.
Identities = 16/20 (80%), Positives = 19/20 (95%), Gaps = 0/20 (0%)
Frame = +1

Query 1      YCGLVGGQSLDFSTLDSELK 20
             YCG+VGGQS DFST+DSE+K
Sbjct 275587 YCGVGGQSTDFSTIDSEIK 275646

```

Abbildung 29: Alignment von Partialsequenz von Fvp32 mit Partialsequenz eines hypothetischen Proteins (Peptidasefamilie S41) aus *Schizophyllum commune* (H4-8) in [54].

Fvp15 Partialsequenzen wiesen Homologien zu Peptidasen der Familien M35 (Deuterolysine) und M36 (Fungalysine) auf, wobei die Homologie zu den Deuterolysinen größer war.

Innerhalb der Deuterolysinfamilie gibt es die Gruppe der Peptidyl-Lys Metallopeptidasen (M35.004), die bisher nur in Basidiomyceten nachgewiesen wurden [40], [57], [58]. Die Homologie der Peptidsequenzen dieser Gruppe zu anderen Deuterolysinen liegt bei 21–26 %. Da eine nahe genetische Verwandtschaft von *F. velutipes* mit den drei Basidiomyceten besteht, aus denen diese Enzyme bekannt sind, wurde untersucht, ob Fvp15 hohe Homologien zu den Peptidyl-Lys Metallopeptidasen aufweist. Dies konnte jedoch durch den Abgleich der entsprechenden Sequenzen mit dem Programm ClustalW [56] nicht bestätigt werden, da z. B. zwischen Fvp15 und der Peptidyl-Lys Metallopeptidase 35.004 aus *Pleurotus ostreatus* (17,9 kDa) nur geringe Homologien gefunden wurden, obwohl beide Proteine immerhin eine ähnliche Molmasse haben (Abbildung 30). Insgesamt wiesen die bekannten Sequenzen von Fvp15 zu allen Gruppen der Deuterolysinfamilie geringe, aber dennoch signifikante Homologien auf.

CLUSTAL 2.0.12 multiple sequence alignment

```

Fvp15      -----
MER003546  ATFVGCSATRQTQLNAAASQAQTYAANALSYLNSHTSSTTRYTTWFGTFVTSRYNTVLSH 60

Fvp15      -----
MER003546  FSSISSNTFSSYTFDCTCSDSGTYAFVNPNSNFGYVTLCGAFUNAPVAGTDSRGGTLIHES 120

Fvp15      --LS---DTDDVTYG-----CDADQALSDAQLR----- 24
MER003546  SHFTRNGGTDHVVYQGAGAQLARSNPAQAIDNADSHEYFAENNPALA 168
          ::  .*** .**          .. **:::** .

```

Abbildung 30: Alignment von Sequenz aus Fvp15 mit Peptidyl-Lys Metallopeptidase 35.004 aus *Pleurotus ostreatus*, Molekulargewicht: 17,926 g mol⁻¹.

Einige Sequenzen wiesen auch Homologien zur Familie der Fungalysine (M36) auf. Es zeigte sich, dass eine kurze Sequenz sogar sehr hohe Homologien zu einer hypothetischen M36 Peptidase aus *Laccaria bicolor* (ProtID EDR01343) hatte (Abbildung 31). Allerdings wiesen die übrigen bekannten Partialsequenzen von Fvp15 keinerlei Homologie zu dieser Peptidase auf. Das kann entweder bedeuten, dass hier zwei sich überlagernde Peptidasen gleichzeitig sequenziert worden sind

oder dass Fvp15 Homologien zu verschiedenen Peptidasen hat. Die Homologien zu anderen Peptidasen aus der M36 Familie waren nur gering, wie ein weiteres Alignment von Fvp15 mit einem Fungalysin aus *Coprinopsis cinerea* (Abbildung 32) zeigte. Wegen der sehr hohen Homologie von drei Fvp15 Partiaalsequenzen zu Peptidasen aus der Familie M35 und nur einer Partiaalsequenz mit hoher Homologie zur Familie M36 wurde Fvp15 der Familie M35 zugeordnet.

```

Fvp15      -----
MER120410  MHDFAVRYGFTEKAFNFKQSNLKGKGGKEGDRVLMQDASGVNMANFATPPDGQSGQCRM 60

Fvp15      -----
MER120410  FIWTLTNPRRDGTMENDIVIHETHGITNRMTGGGTGRCLQTTESSGGMGEGWSDAMADWM 120

Fvp15      -----SYPYSTSATNPLR----- 14
MER120410  AQSSGTTKDFIVGQYVANRAKGIRSFYSTSATTNPLRYSSLQKLTEVHDIGEVDANMLH 180
                *:*****

Fvp15      -----
MER120410  QVYAALVAARGFSSNKLTAGAKEGNVVFMRVMMDALAIQPCNPTFIQARDAIQADQNR 240

Fvp15      -----
MER120410  FNGVVKCIIAKAL 253

```

Abbildung 31: Alignment von Partiaalsequenz von Fvp15 mit der hypothetischen Fungalysin [M36.001] Peptidase aus *L. bicolor* (MER120410).

2.4.2 Bestimmung der Molmasse

Um die korrekte Molmasse der *F. velutipes* Peptidasen zu bestimmen, wurden mehrere Größenausschlusschromatografien (SEC, verschiedene Matrices) durchgeführt. Es wurde jedoch weder eine zufriedenstellende Aufreinigung erreicht, noch war eine exakte Bestimmung des Molekulargewichts möglich, da alle Peptidasen fast gleichzeitig eluierten (Abbildung 33 und Abbildung 34). Die Ergebnisse mit anderen Gelmatrices (Superdex 75 und Superose 6) waren ähnlich.

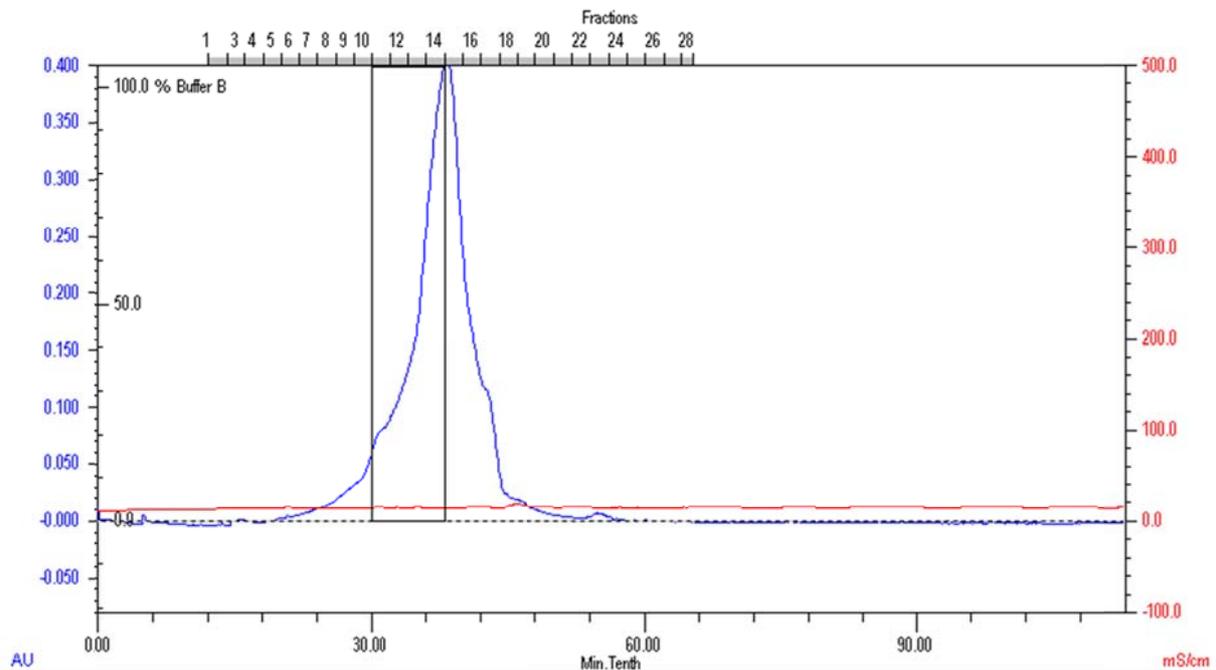


Abbildung 33: Größenausschlusschromatografie (SEC) mit 200 μL *F. velutipes* Peptidasekonzentrat (Vorreinigung via HIC). Matrix: Superdex 200, 20 mL, Natriumacetat, 50 mM, pH 7,0. Fluss: 0,5 mL min^{-1} .

Der durch SEC erreichte Aufreinigungseffekt war minimal. Fvp37, Fvp35, Fvp32 und Fvp27 eluierten wie bei der IEF gleichzeitig, in der nächsten Fraktion dann Fvp150 und Fvp15 sowie nur minimal versetzt Fvp250 und Fvp75. Die Ergebnisse zeigten, dass mit dieser Methode keine Aufreinigung der Peptidasen in nativem Zustand möglich war. Wahrscheinlich traten in der Gelmatrix agglomerierende Effekte auf, die besonders Fvp15 betrafen, da diese Peptidase aufgrund ihrer geringen Molmasse deutlich nach anderen Peptidasen hätte eluieren müssen. In einer silbergefärbten nativen PAGE (Abbildung 34 rechts) wurde zudem sichtbar, dass sich in dem Peptidasekonzentrat noch viele andere Proteine als potentiell störende Substanzen befanden.

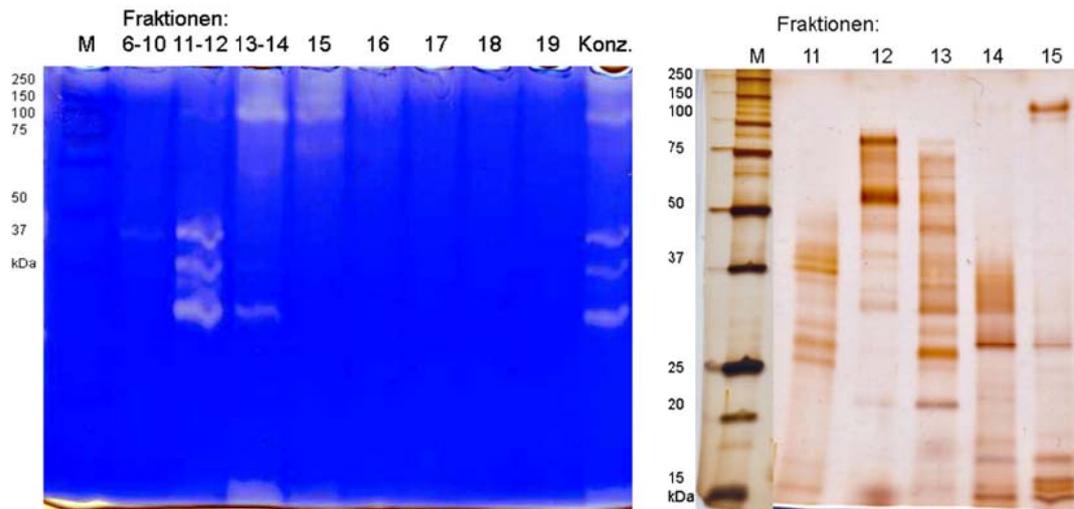


Abbildung 34: Zymografie (links) und native PAGE (rechts) mit Fraktionen aus SEC mit Superdex 200.

Um die denaturierte Molmasse der Peptidasen bestimmen zu können, war es daher notwendig, diese zunächst weitmöglichst aufzureinigen. Abbildung 35 zeigt Proben der gereinigten Peptidasen in nativem und denaturiertem Zustand. Bei Fvp150 fiel auf, dass die denaturierte Probe ein breites Spektrum an unterschiedlichen Proteinen enthielt, die in nativem Zustand alle eine ähnliche Molmasse hatten und zudem nicht so intensiv mit Coomassie angefärbt wurden, was auf tiefgreifende Konformationsänderungen der denaturierten Proteine hinwies. Leider ließ sich daher auch nicht feststellen, bei welcher der Banden es sich um Fvp150 handelte. Bei Fvp37 zeigte sich ein ähnliches Problem, da in der denaturierten Probe mehr Banden zu sehen waren als in der nativen.

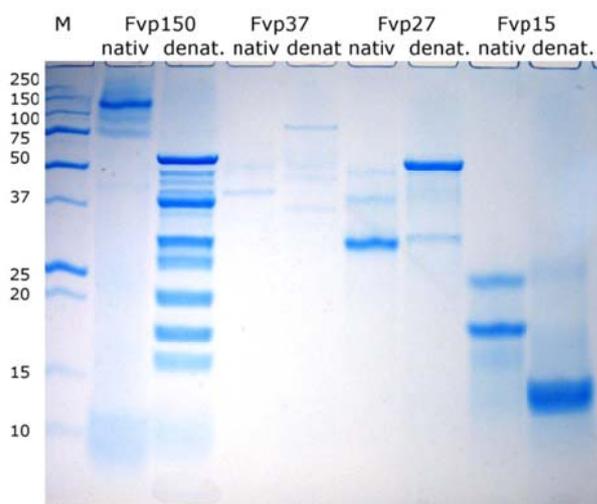


Abbildung 35: PAGE / native PAGE mit nativen und denaturierten Proben von Fvp150, Fvp37, Fvp27 und Fvp15 (je 5 μ L / Tasche).

Die Probe von Fvp27 zeigte bei Denaturierung eine starke Bande bei 49,7 kDa. Es ist somit sehr wahrscheinlich, dass dies die Molmasse von Fvp27 ist. Fvp15 hat eine denaturierte Größe von 12,9 kDa und schmiert in denaturiertem Zustand noch stärker als nativ. Es ist für ein funktionelles Enzym relativ klein.

Um die ermittelten Molmassen zu bestätigen, wurden die nativen Peptidasebanden aus Abbildung 35 aus dem Gel ausgeschnitten, mit denaturierendem Puffer bei 95 °C gekocht und die Gelstücke mit diesem Puffer zusammen erneut auf eine PAGE aufgetragen (Abbildung 36, links). Mit dieser Methode konnten die ermittelten Molmassen für Fvp27 und Fvp15 bestätigt werden. Die tatsächliche Molmasse von Fvp150 ist 59 kDa. Die Molmasse von Fvp37 konnte nicht bestimmt werden, da die sauber ausgeschnittene, konkrete Proteinbande nach der Denaturierung in fünf bis sechs Banden auffächerte, wofür keine eindeutige Erklärung zu finden war. Bei einer Wiederholung des Versuches (Abbildung 36, rechts) blieb die Molmasse von Fvp37 nach der Denaturierung bei 37 kDa, was daher als Molmasse angenommen wurde. Die Konzentrationen von Fvp32 und Fvp35 waren zu gering, um in einer PAGE sichtbar zu sein.

Tabelle 11: Molmasse der *F. velutipes* Peptidasen nach Denaturierung

Peptidase	kDa
Fvp150	59
Fvp37	37
Fvp27	49,7
Fvp15	12,9

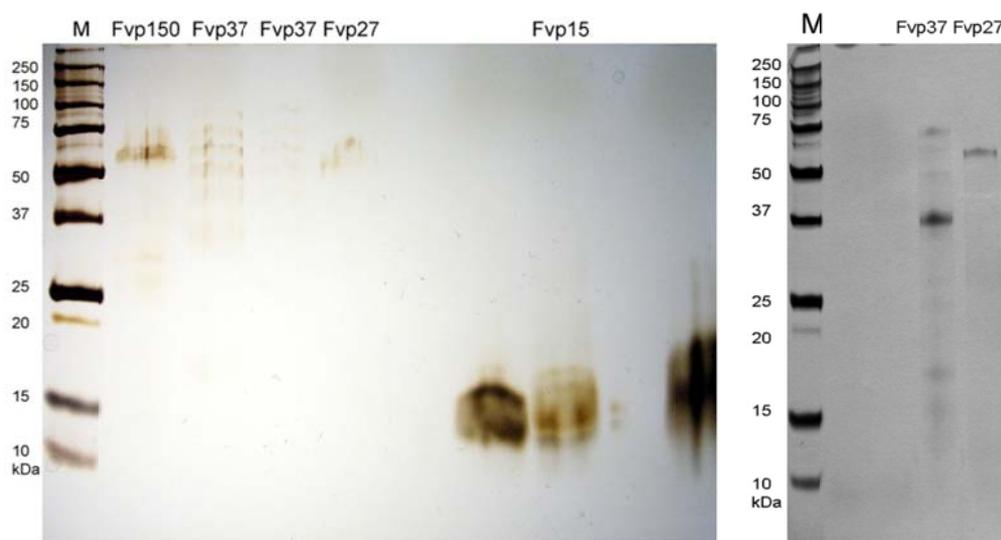


Abbildung 36: PAGE mit zuvor aus nativer PAGE ausgeschnittenen, denaturierten Banden von Fvp150, Fvp37, Fvp27 und Fvp15.

2.4.3 Bestimmung der Substrat- und Spaltstellenspezifität

Bestimmung der Substratspezifität mit Azocasein und Azogelatine

Der Azocasein Assay wurde mit einzelnen, aufgereinigten Peptidasen wiederholt. Hierbei zeigte sich, dass nur Fvp150 Azocasein effektiv hydrolysieren konnte. Fvp27 und Fvp15 hydrolysierten Azocasein minimal, die restlichen Peptidasen überhaupt nicht. Dieses Ergebnis war überraschend, da Azocasein eigentlich ein Substrat ist, welches von einer Vielzahl von Peptidasen abgebaut werden kann. Um dieses Ergebnis zu überprüfen, wurde daher zusätzlich noch Azogelatine als ein weiteres Substrat synthetisiert. Aus der Gelatinezymografie war bekannt, dass alle aufgereinigten Peptidasen das Substrat Gelatine abbauen konnten. Im Azogelatine Assay war das Ergebnis jedoch das Gleiche wie mit Azocasein: Auch Azogelatine wurde neben dem Peptidasekonzentrat nur von Fvp150 hydrolysiert. *F. velutipes* Peptidasekonzentrat, welches Azocasein mit einer Aktivität von 1,1 MaU abbaute hatte unter den gleichen Reaktionsbedingungen mit Azogelatine eine peptidolytische Aktivität von 0,6 MaU.

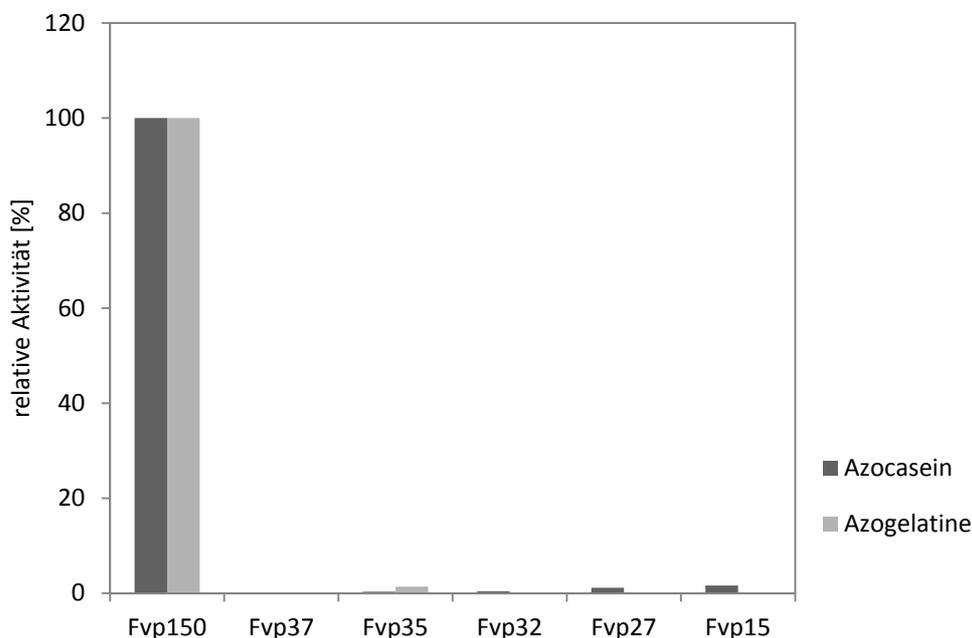


Abbildung 37: Relative Peptidaseaktivität einzelner Peptidasen mit den Substraten Azocasein und Azogelatine.

Das Ergebnis war nicht eindeutig zu interpretieren. Denkbar wäre, dass die unspezifisch an das Substrat gebundenen Sulfanylgruppen die Konformation des Proteins so veränderten, dass es von einigen Peptidasen nicht mehr erkannt wurde.

Es ist auch möglich, dass im Peptidasekonzentrat synergistische Effekte zwischen den Peptidasen auftraten, so dass im Konzentrat auch die einzeln inaktiven Peptidasen das vorhydrolysierte Substrat weiter spalten konnten.

Da nur Fvp150 Azocasein hydrolysierte und bei der Verwendung dieses Assays mit verschiedenen Peptidaseinhibitoren festgestellt wurde, dass nur der Metallopeptidaseinhibitor EDTA deutlich inhibitorische Wirkung hatte, handelt es sich bei Fvp150 wahrscheinlich um eine Metallopeptidase.

Bestimmung der Substratspezifität mit BSA

Um die Spaltspezifität der aufgereinigten Peptidasen zu bestimmen, wurden einzelne Peptidasen mit Rinderserumalbumin (BSA) als Substrat in geeignetem Puffer über einen Zeitraum von bis zu 90 Stunden inkubiert. Nach 24 und 90 Stunden wurden Proben genommen und mittels nativer SDS-PAGE neue Spaltstellen identifiziert (Abbildung 38 und Abbildung 39). Ein peptidolytischer Abbau des BSA (69 kDa) sollte durch Abschwächung der BSA Bande sichtbar sein, während kleine Peptide als Abbauprodukte zusätzlich im Gel erscheinen sollten.

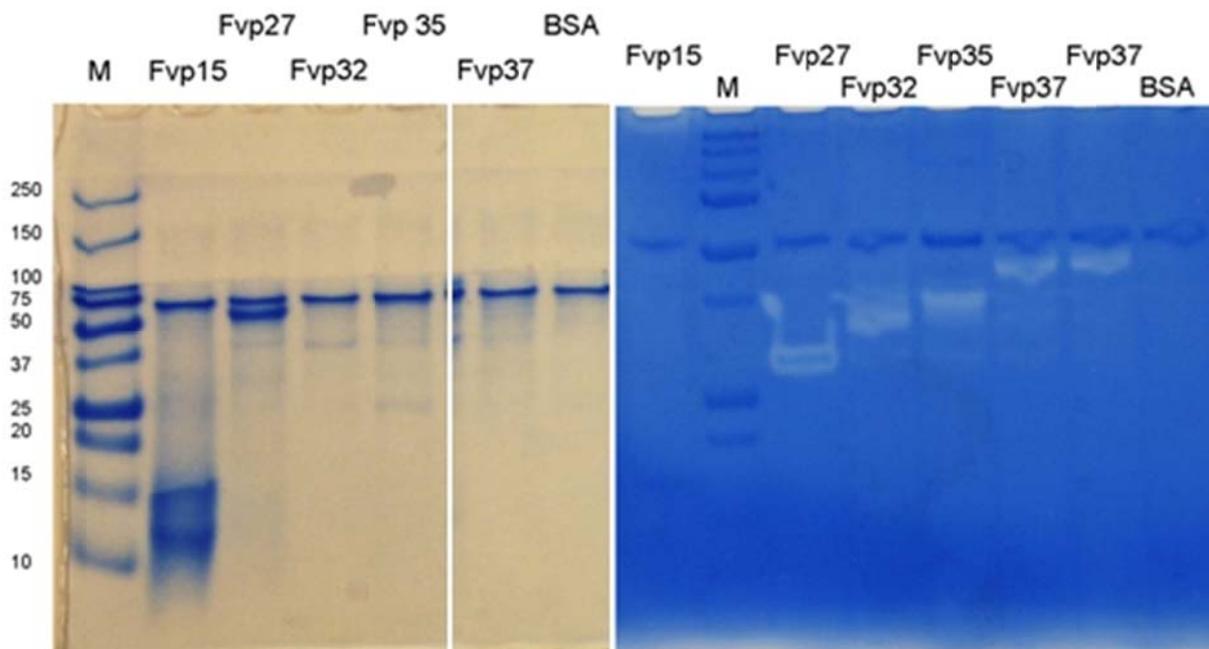


Abbildung 38: Native SDS-PAGE (links) und Zymografie (rechts) mit Proben aus Hydrolyseversuchen von *F. velutipes* Peptidasen und bovine serum albumine (BSA) als Substrat nach 0 Stunden Inkubation (Negativkontrolle). Sichtbar sind jeweils die BSA Bande bei 69 kDa sowie die der Peptidasen in entsprechender Größe.

Fvp15 spaltete BSA (69 kDa) an genau einer Position in zwei Peptide (ca. 50 kDa und 19 kDa), was darauf hindeutete, dass diese Peptidase eine hohe Spezifität für

spezielle Aminosäureabfolgen besitzt. Fvp27 und Fvp37 konnten BSA hingegen nicht abbauen. Fvp32 und Fvp35 bauten BSA ebenfalls ab, da die BSA Bande mit der Zeit immer schwächer wurde. Da keine Fragmente sichtbar waren, handelte es sich dabei wahrscheinlich um exopeptidolytischen Abbau (vom C- oder N-Terminus her), was bei Fvp32 auch zu den gefundenen Sequenzhomologien passt. Auch von einem Pool der Peptidasen Fvp15, Fvp27, Fvp32, Fvp35 und Fvp37 wurde BSA innerhalb von 90 Stunden fast vollständig zu kleinen Peptiden oder Aminosäuren abgebaut.

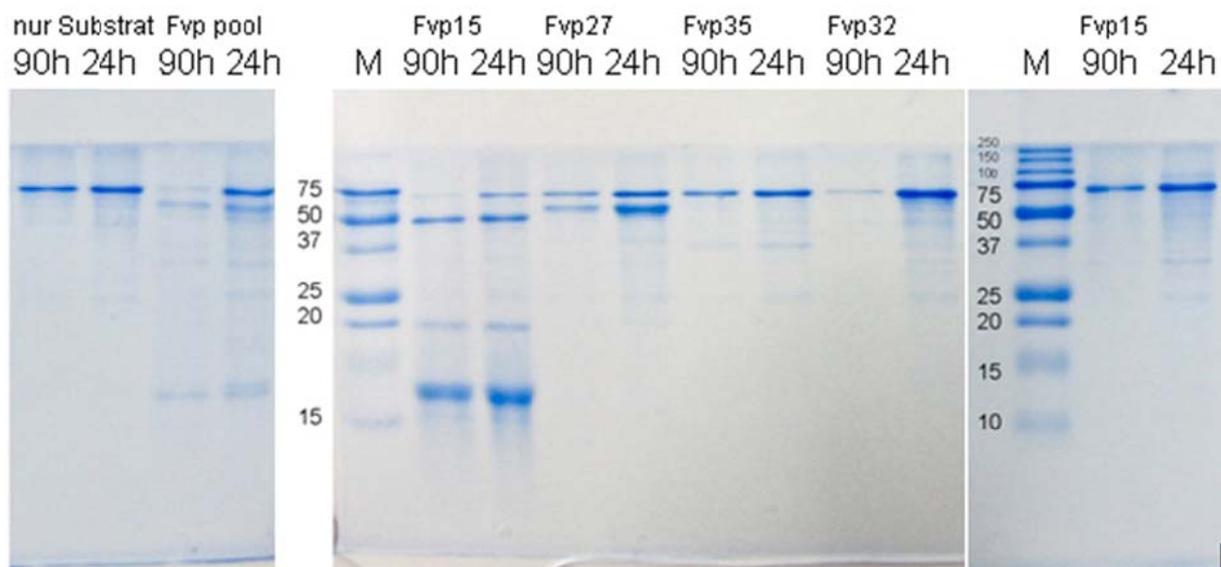


Abbildung 39: Native SDS-PAGE mit Proben aus Hydrolyseversuchen nach 24 und 90 Stunden Inkubation bei 37 °C von *F. velutipes* Peptidasen mit Albumin aus Rinderserum (BSA) als Substrat.

Bestimmung der Substratspezifität mit synthetischen Peptiden

Um die Substratspezifität zu bestimmen wurden Aktivitätstest mit den aufgereinigten Peptidasen und verschiedenen synthetischen Peptiden durchgeführt.

Die vier synthetischen Peptide Gly-Pro-*para*-Nitroanilid (*p*NA), Gly-Gly-Leu-*p*NA Ala-Ala-Pro-Phe-*p*NA und Leu-*p*NA wurden im photometrischen Assay verwendet (Abbildung 41). Das Peptid Leu-*p*NA wurde von keiner der *F. velutipes* Peptidasen hydrolysiert. Es konnte nachgewiesen werden, dass Fvp27 spezifisch das Substrat Gly-Pro-*p*NA spaltet, während alle anderen Peptidasen mit diesem Substrat keine Aktivität zeigten. Da dieses Substrat sehr spezifisch nur von Prolyl Endopeptidasen hydrolysiert wird [59] und zusätzlich Sequenzhomologien zur S28.002 Dipeptidyl-peptidase II bestehen, konnte Fvp27 der Familie S28 zugeordnet werden.

Abbildung 40 zeigt, dass sowohl Dipeptidyl- (vom N-Terminus) als auch Carboxypeptidasen (vom C-Terminus) dieses Substrat spalten können.

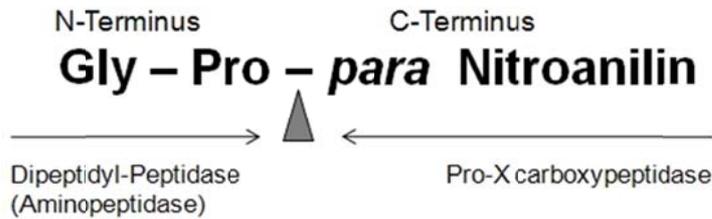


Abbildung 40: Schematische Darstellung der Hydrolyse des Gly-Pro-pNA Peptids durch prolylspezifische Dipeptidyl- und Carboxypeptidasen der Familie S28.

Fvp37 hydrolysierte die zwei Peptide Gly-Gly-Leu-pNA und Ala-Ala-Pro-Phe-pNA mit Leu, bzw. Phe in P1 Stellung. Beide Substrate werden von Peptidasen der S08 Subtilase Familie gespalten, somit wurden auch hier die Sequenzhomologien eindeutig bestätigt. Fvp15 und Fvp35 hydrolysierten keines der drei Substrate.

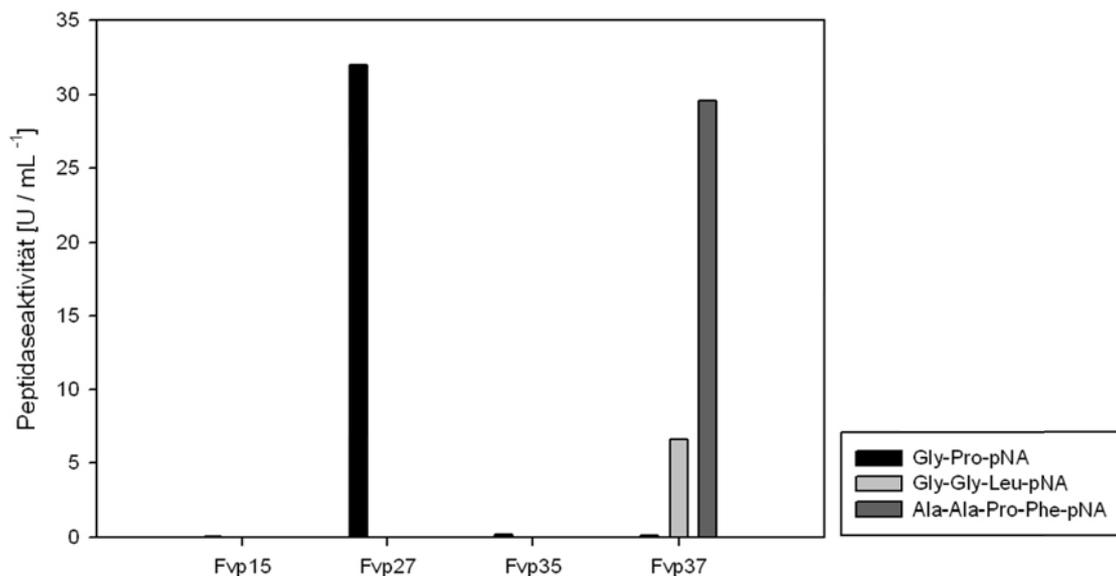


Abbildung 41: Substratspezifität der extrazellulären *F. velutipes* Peptidasen.

Im Fall von Fvp15, das aufgrund der Sequenzhomologien der Familie M35 (Deuterolysin) zugeordnet wurde, war dies auch nicht zu erwarten, da kurze synthetische Peptide für Peptidasen dieser Familie ein ungeeignetes Substrat sind. Stattdessen werden basische Proteine (z. B. Histone, Protamine) bevorzugt hydrolysiert. Fvp32 wurde aufgrund der gefundenen Sequenzhomologien der Familie S41A (C-terminal processing peptidase) zugeordnet. Diese Peptidasen besitzen

ebenfalls keine bekannte Aktivität mit den getesteten Substraten. Die Ergebnisse bestätigen also in allen vier Fällen die postulierten Familienzugehörigkeiten.

Bestimmung der Substratspezifität mit RP-HPLC Analytik

Zur Bestimmung der Substratspezifität wurden Inkubationsversuche mit verschiedenen Substrat / Enzymkombinationen durchgeführt (Tabelle 12). Die resultierenden Substrathydrolysate sowie Blindwerte für Substrat und Enzym wurden underivatisiert mittels RP-HPLC analysiert, wobei bei 225 nm die Absorption der Peptidbindungen detektiert wurde. Da bei dieser Methode das Bindungsverhalten der Peptide und Proteine an die Säule von deren Hydrophobizität abhing, lässt diese Art der Analytik keine Aussage über die Molmasse der aufgetrennten Peptide zu. Die Ab- und Zunahmen von Peaks wurden daher als Veränderungen aufgrund peptidolytischen Abbaus interpretiert, ohne diese genau zuzuweisen.

Tabelle 12: Via RP-HPLC analysierte Enzym / Substratkombinationen

Peptidase	Substrat	Beobachtungen
Peptidasekonzentrat	Protamin (Peptidmischung)	Deutliche Veränderungen im Peptidmuster durch Hydrolyse
Fvp15	Protamin (Peptidmischung)	Deutliche Veränderungen im Peptidmuster durch Hydrolyse, Zunahme hydrophiler Peptide
Fvp37	Angiotensin	Deutliche Veränderungen im Peptidmuster durch Hydrolyse
Peptidasekonzentrat	Casein	Deutliche Veränderungen im Peptidmuster durch Hydrolyse
Fvp37	Casein	Keine Veränderungen, Casein liegt nicht in Lösung vor
Fvp27	Casein	Geringe Veränderungen im Peptidmuster durch Hydrolyse
Fvp150	Casein	Deutliche Veränderungen im Peptidmuster durch Hydrolyse

Protamin aus Lachs, ein Stoffgemisch aus stark basischen Peptiden, besteht zu mehr als zwei Dritteln aus L-Arginin. Protamin ist ein bevorzugtes Substrat für Deuterolysine (M35). Daher lag es nahe zu überprüfen, ob auch Fvp15 dieses Substrat hydrolysieren konnte. Hierfür wurde Protamin mit jeweils Peptidasekonzentrat und Fvp15 über 2 h bei 40 °C inkubiert. Die resultierenden Hydrolysate wurden mittels RP-HPLC getrennt. Wie in den Chromatogrammen zu sehen ist, änderte sich sowohl bei dem Einsatz von Peptidasekonzentrat

(Abbildung 42) als auch bei der Verwendung von Fvp15 (Abbildung 43) das Peakmuster, was auf eine hydrolytische Spaltung des Substrates schließen lässt. Einige Peaks wurden durch neue ersetzt, andere wurden höher oder flachten ab. Bei der Hydrolyse mit Fvp15 bildete sich ein besonders großer Peak im Durchbruch, was darauf hinweist, dass die Hydrophobizität eines Großteils der resultierenden Peptide so gering ist, dass sie nicht mehr an die Säule binden. Bei der Hydrolyse von Protamin mit Peptidasekonzentrat veränderte sich dagegen besonders das Muster der später eluierenden Peptide. Die Unterschiede zwischen den Chromatogrammen in Abbildung 42 und Abbildung 43 erklären sich durch eine Veränderung im Gradientenprogramm zwischen den Versuchen.

Das Substrat Angiotensin, ein Peptidhormon, wurde von Fvp37 hydrolysiert. Hierbei konnte vor allem die Abnahme eines breiten Peaks bei ca. 18 min und die Zunahme des Durchbruchs registriert werden (Abbildung 44).

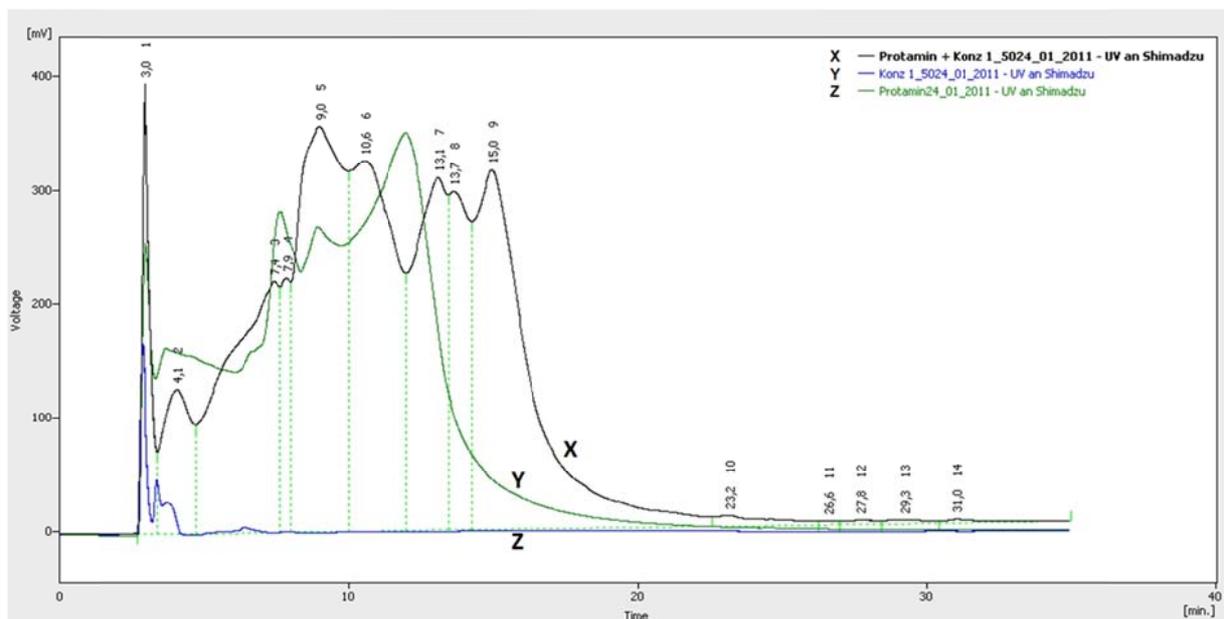


Abbildung 42: Chromatogramm Overlay zur Bestimmung des Abbaus von Protamin durch *F. velutipes* Peptidasekonzentrat. X = Protamin Blindwert, Y = Peptidasekonzentrat + Protamin, Z = Peptidasekonzentrat Blindwert.

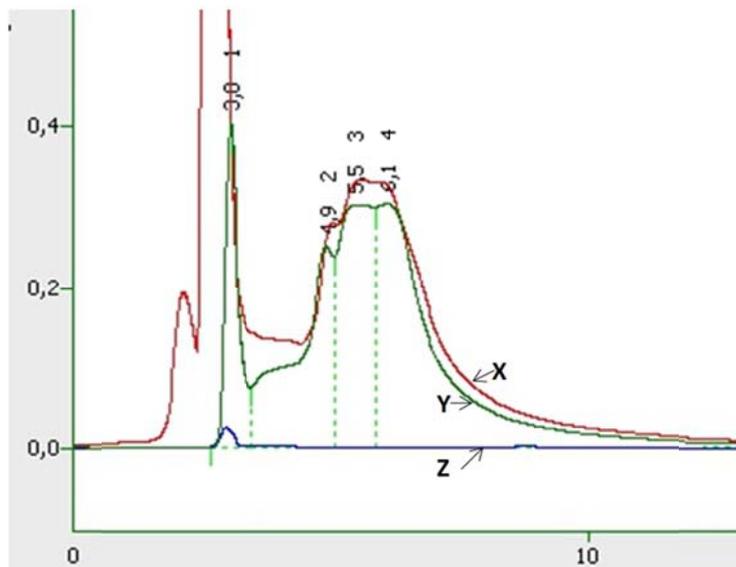


Abbildung 43: Chromatogramm Overlay (Ausschnitt) zur Bestimmung des Abbaus von Protamin durch Fvp15. X = Peptidasekonzentrat + Protamin, Y = Protamin Blindwert, Z = Peptidasekonzentrat Blindwert.

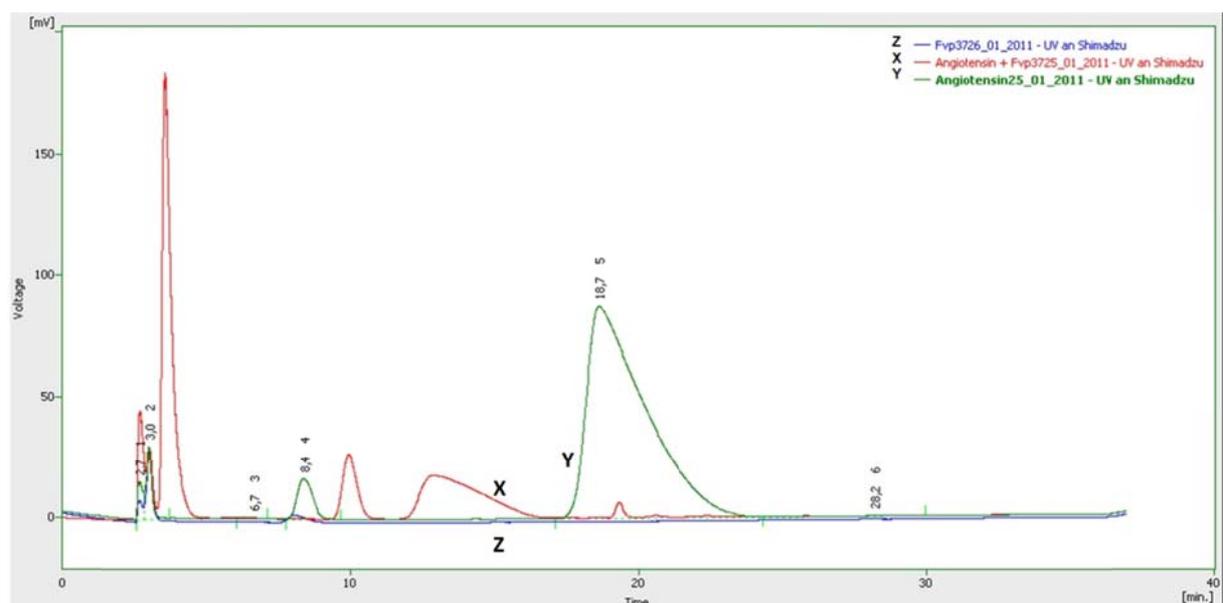


Abbildung 44: Chromatogramm Overlay zur Bestimmung des Abbaus von Angiotensin durch Fvp37. X = Fvp37 + Angiotensin, Y = Angiotensin Blindwert, Z = Fvp37 Blindwert.

Das Substrat Casein wurde mit Peptidasekonzentrat, Fvp37, Fvp27 und Fvp150 inkubiert (Abbildung 45). In der RP-HPLC zeigte sich, dass das Casein in der Probe ohne Enzymzusatz, welche als Blindwert mitgeführt wurde, zum größten Teil unlöslich blieb und somit nicht im Chromatogramm sichtbar war. Auch bei der Inkubation mit Fvp37 konnte kein lösliches Caseinhydrolysat identifiziert werden. Nach Inkubation mit Fvp27 und Fvp150 konnten dagegen mehrere Peptide detektiert

werden, wobei nach der Hydrolyse mit Fvp150 deutlich mehr und höhere Peaks im Chromatogramm zu sehen waren. Nach der Inkubation mit Peptidasekonzentrat waren vor allem zwei prominente Peaks im Durchbruch sichtbar sowie ein kleiner Peak, der direkt darauf folgte. Es ist anzunehmen, dass die bei Fvp27 und Fvp150 sichtbaren Peaks im hinteren Bereich des Chromatogramms größere (relativ hydrophobe) Peptidfragmente zeigten, welche bei Inkubation mit Peptidasekonzentrat nicht vorhanden waren, weil das Peptidasekonzentrat diese Peptide zu kleineren Peptidfragmenten abgebaut hatte, die bereits im Durchbruch eluierten.

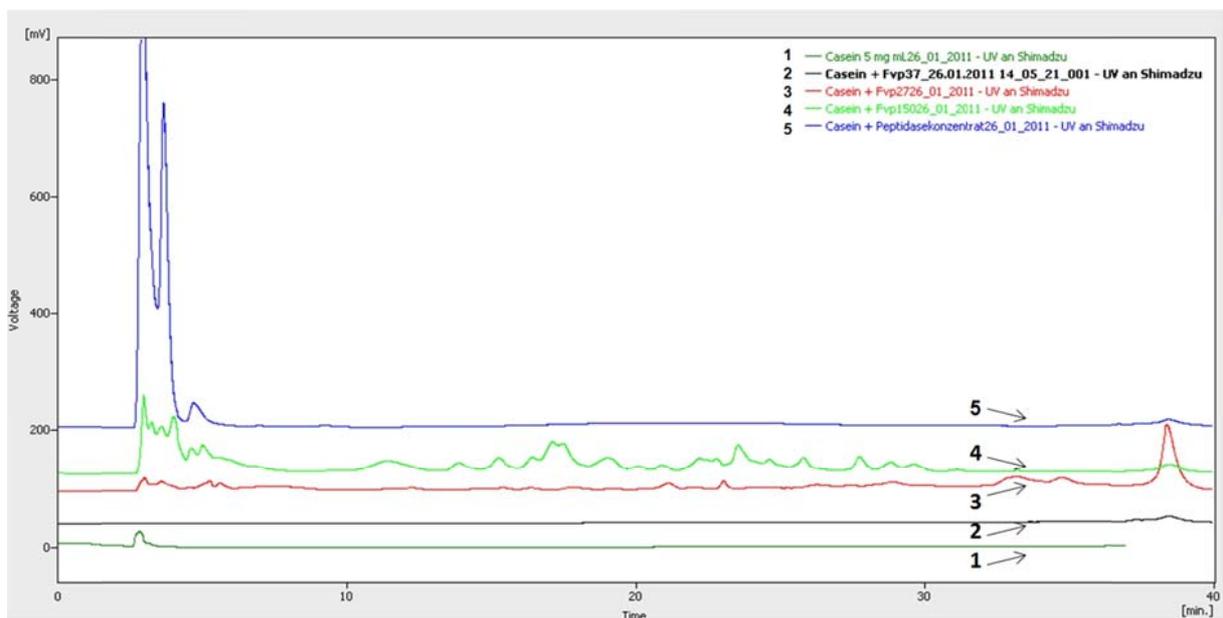


Abbildung 45: Chromatogramm-Overlay zur Bestimmung des Abbaus von Casein durch Peptidasekonzentrat, Fvp37, Fvp27 und Fvp150. 1 = Casein Blindwert, 2 = Fvp37 + Casein, 3 = Fvp27 + Casein, 4 = Fvp150 + Casein und 5 = Peptidasekonzentrat + Casein.

Die Ergebnisse des Caseinabbaus bestätigen somit die für das Substrat Azocasein gemachte Beobachtung, dass nur Fvp150 dieses Substrat effektiv abbaut. Fvp27 hydrolysierte Casein dagegen nur zu geringen Teilen und Fvp37 überhaupt nicht.

Bestimmung der Spaltstellenspezifität mit Edman Abbau

Für die Bestimmung der Spaltstellenspezifität wurden zunächst Hydrolyseversuche durchgeführt, in denen die aufgereinigten Peptidasen mit verschiedenen Substraten inkubiert wurden. Die Interpretation der HPLC Chromatogramme war trotz Methodenoptimierung in vielen Fällen durch sehr ähnliche Retentionszeiten einiger Aminosäurederivate (Phenylthiohydantoin-Aminosäuren) erschwert.

Einige Peaks lagen sehr nah zusammen bzw. überschritten sich.

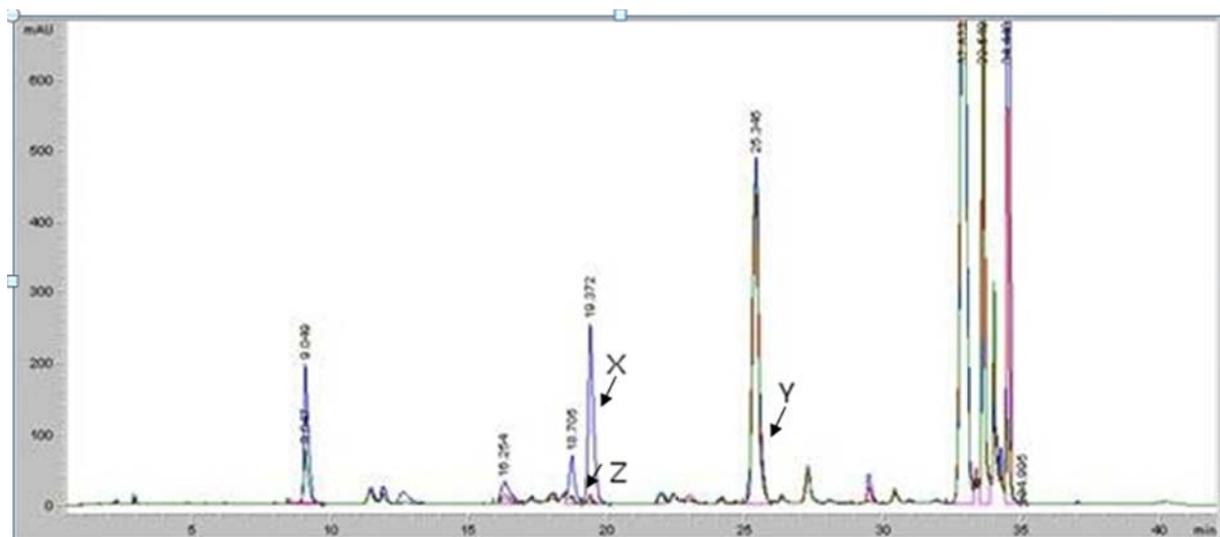


Abbildung 46: HPLC-Chromatografie zur Bestimmung der Spaltstellenspezifität von Fvp27 mit dem Substrat „Insulin b-chain ox.“. Proben: X = Fvp27 + Substrat, Y = Substrat Blindwert, Z = Fvp27 Blindwert. Peak bei 18,7 min = Alanin und 19,3 min = Prolin.

Lediglich für Fvp27 war eine Aussage zur Spaltstellenspezifität möglich (Abbildung 46). Nach der Inkubation von Fvp27 mit 1 mg mL^{-1} des Substrates „Insulin b-chain ox.“ und nach Abzug der Enzymblindwerte wurden die drei Aminosäuren Phenylalanin (F), Prolin (P) und Alanin (A) als neu gebildete Aminosäuren identifiziert. Phenylalanin wurde auch im Substratblindwert gefunden, was zu erwarten war, da sich diese Aminosäure am N-Terminus des Peptids befindet. P und A wurden durch peptidolytischen Abbau mit Fvp27 gebildet (Abbildung 47). Das Ergebnis zeigt, dass Fvp27 auch dieses Substrat polylspezifisch spaltete.



Abbildung 47: Aminosäuresequenz des Substrates „Insulin b-chain ox.“. Einkreiste Aminosäuren wurden als Phenylthiohydantoin-Aminosäurederivate nach der Hydrolyse mit Fvp27 gefunden.

2.4.4 Bestimmung der optimalen Reaktionsbedingungen für Fvp150, Fvp37 und Fvp27

Fvp37

Die peptidolytische Aktivität von Fvp37 wurde mit dem Substrat Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA bei unterschiedlichen Temperaturen, pH Werten und Zusätzen bestimmt. Die Aktivität von Fvp37 war bei 40 °C am höchsten und blieb bis 50 °C stabil (Abbildung 48). Der optimale pH Wert war pH 7,5 (Abbildung 49), wobei Fvp37 eine starke Abhängigkeit vom verwendeten Puffersystem zeigte. So betrug die Aktivität bei Inkubation in HEPES Puffer, pH 7,5, 50 mM nur 40 % der bei Inkubation in Tris, pH 7,5, 50 mM gemessenen Aktivität. Die peptidolytische Aktivität von Fvp37 konnte zudem durch die Zugabe verschiedener Salze (Natriumchlorid und Calciumchlorid) gesteigert werden. Besonders erwähnenswert ist, dass die maximale Aktivität erst bei sehr hoher NaCl Konzentration (3 M) erreicht wurde (Abbildung 50). Calciumchlorid hatte dagegen eine geringe aktivitätssteigernde Wirkung, die bei der Zugabe von 60 mM CaCl₂ maximal war (Abbildung 51).

Für die aufgereinigte Fvp37 wurde die inhibitorische Wirkung von Serinpeptidasehemmern überprüft. PMSF und Antipain hatten auch in geringen Konzentrationen eine starke inhibitorische Wirkung (9 % bzw. 11 % Restaktivität), AEBSF hemmte kaum (79 % Restaktivität), und durch die Zugabe von Aprotinin wurde die Aktivität gesteigert (135 % Aktivität) (Abbildung 52). Durch Zugabe von 1 mmol L⁻¹ EDTA, einem Metallopeptidaseinhibitor, wurde die Aktivität kaum vermindert (93 % Restaktivität).

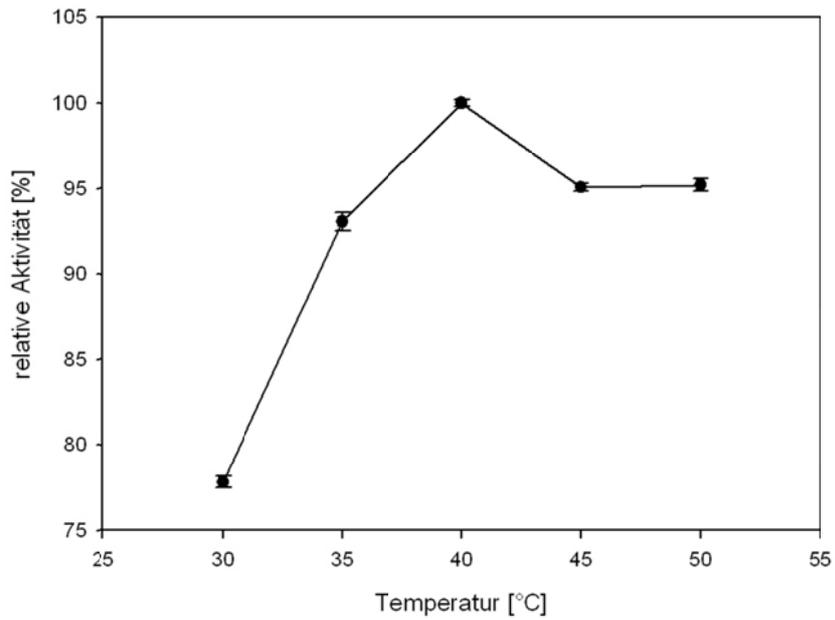


Abbildung 48: Temperaturoptimum von Fvp37.

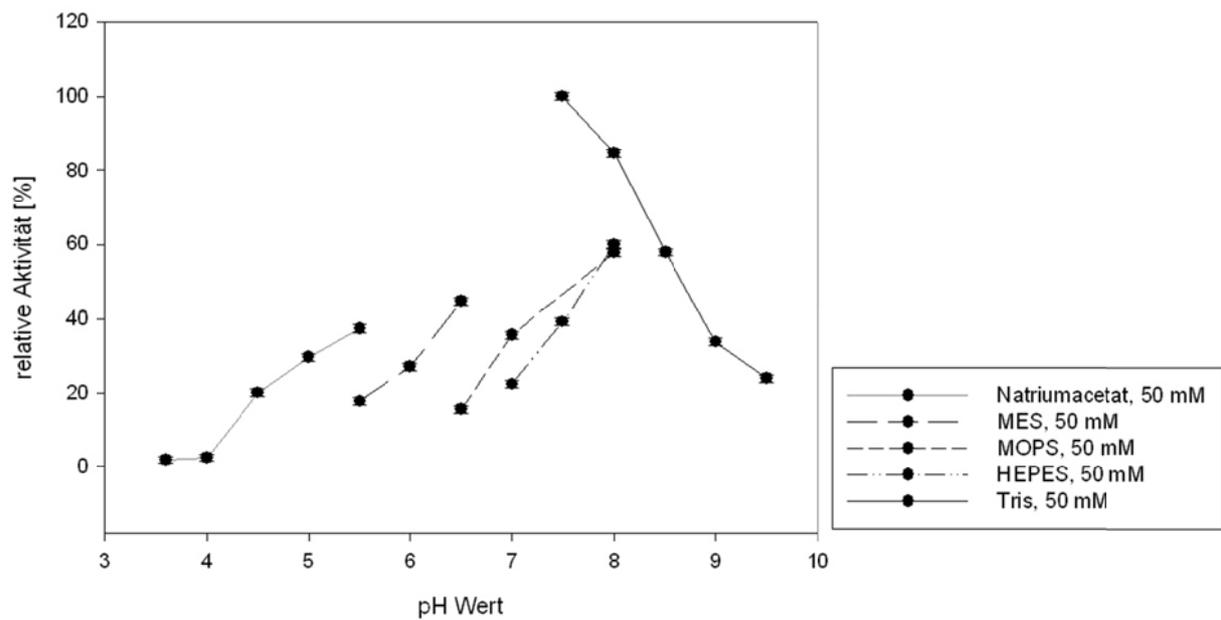


Abbildung 49: pH Optimum von Fvp37.

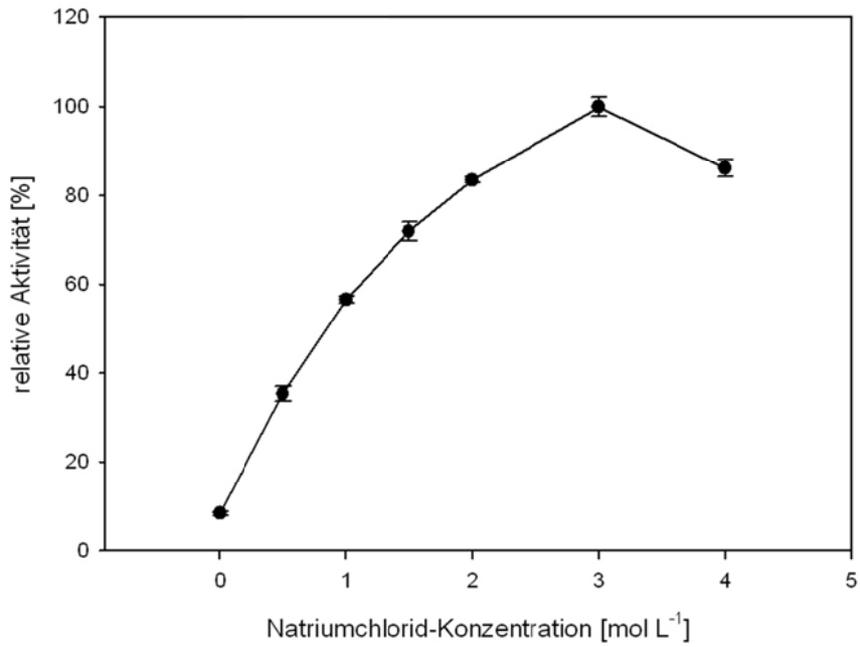


Abbildung 50: Aktivität von Fvp37 bei Zugabe von Natriumchlorid in verschiedenen Konzentrationen.

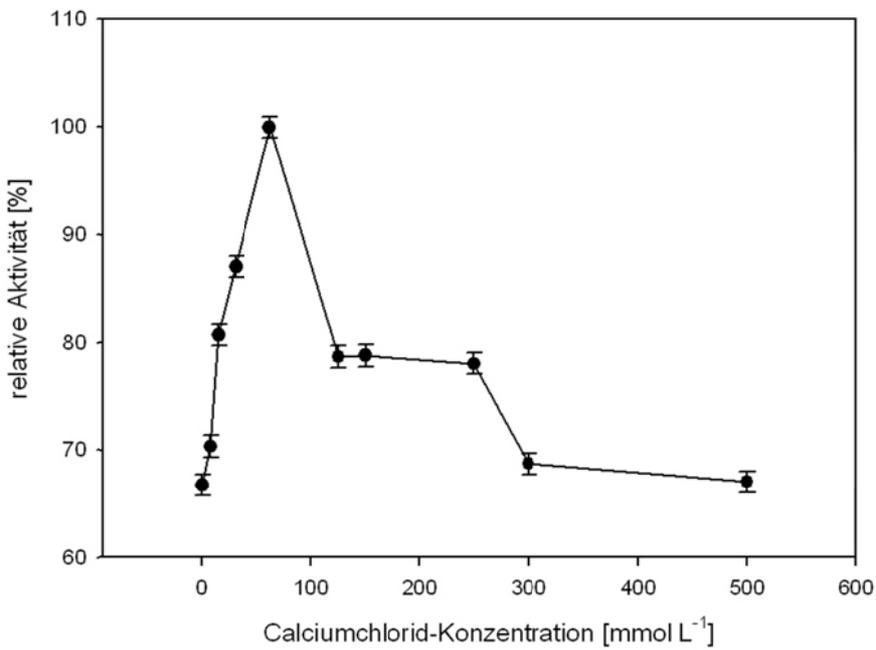


Abbildung 51: Aktivität von Fvp37 bei Zugabe von Calciumchlorid in verschiedenen Konzentrationen.

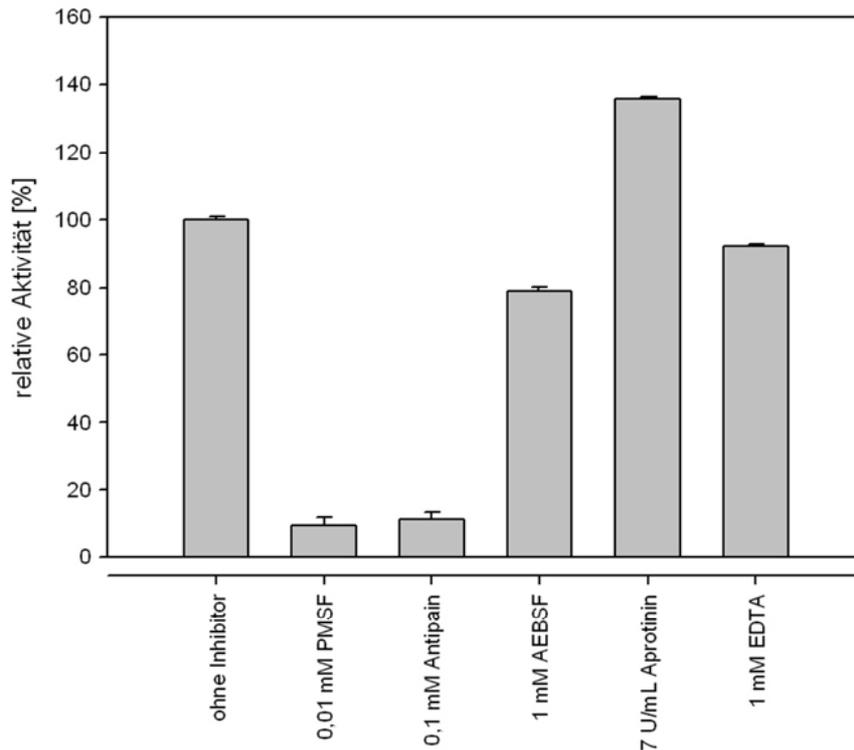


Abbildung 52: Inhibition von Fvp37 durch verschiedene Serinpeptidasehemmer

Fvp27

Das Aktivitätsoptimum von Fvp27 beim Abbau des Substrates Z-Gly-Pro-pNA lag bei 45 °C und pH 6,0 (Abbildung 53 und Abbildung 54). Beide Optima waren relativ schmal. Bei 40 °C lag die Aktivität nur bei 80 % des Maximalwerts, bei 50 °C sogar nur bei 40 %. Ähnlich war dies auch beim pH Wert. Bei pH 5,5 und 6,5 wurden nur ca. 70 % Restaktivität erreicht. Die Aktivität wurde nicht so stark durch den verwendeten Puffer beeinflusst wie bei Fvp37. Auch ließ sich Fvp27 kaum mit typischen Serinpeptidaseinhibitoren hemmen (maximal 61 % Restaktivität mit 0,1 mmol L⁻¹ PMSF und 74 % mit 1 mmol L⁻¹ Antipain) (Abbildung 55).

2 Ergebnisse

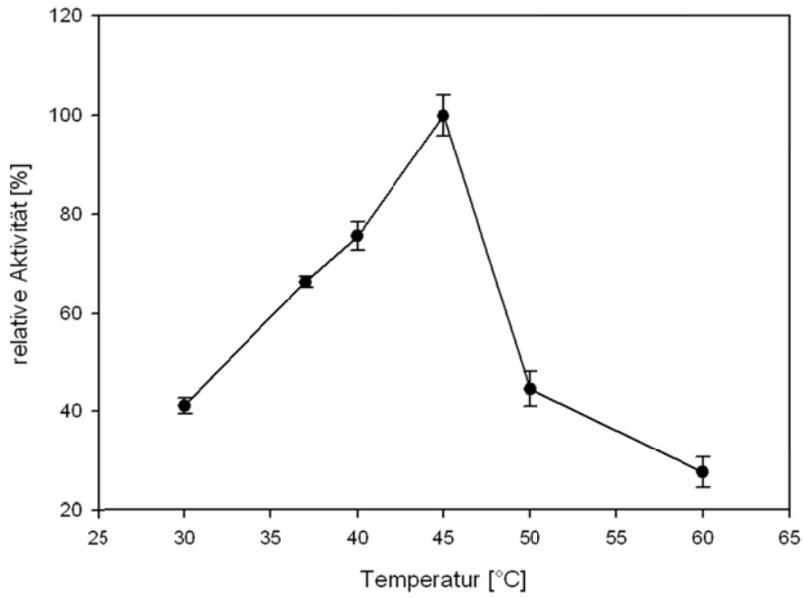


Abbildung 53: Temperaturoptimum von Fvp27.

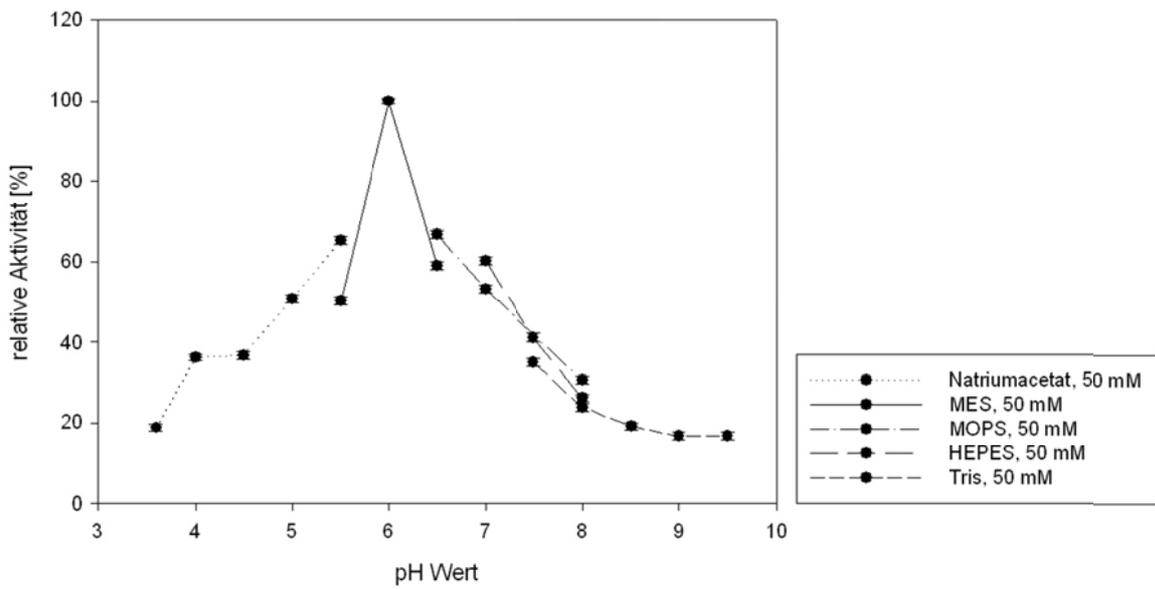


Abbildung 54: pH Optimum von Fvp27.

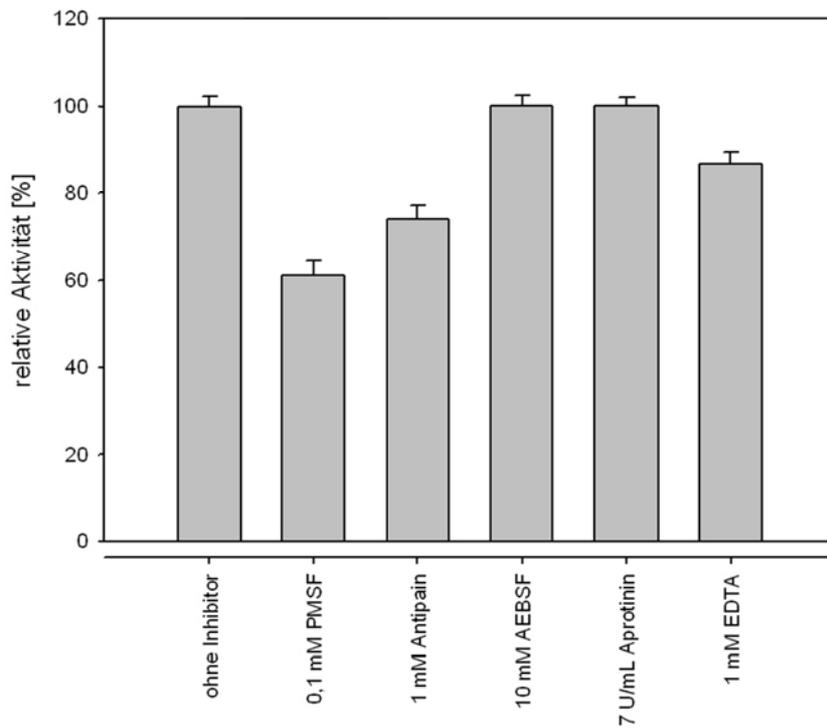


Abbildung 55: Inhibition von Fvp27 durch verschiedene Serineptidasehemmer.

Fvp150

Die optimalen Reaktionsbedingungen für Fvp150 wurden mit dem Substrat Azocasein bestimmt. Fvp150 erreichte maximale Aktivität bei 40 °C und pH 6 in 50 mM MES Puffer (Abbildung 56 und Abbildung 57).

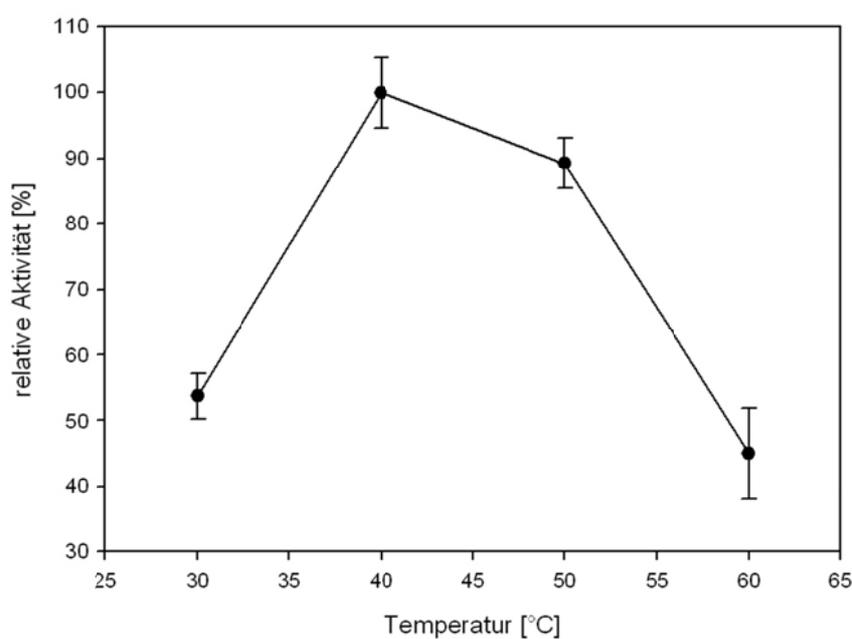


Abbildung 56: Temperaturoptimum von Fvp150.

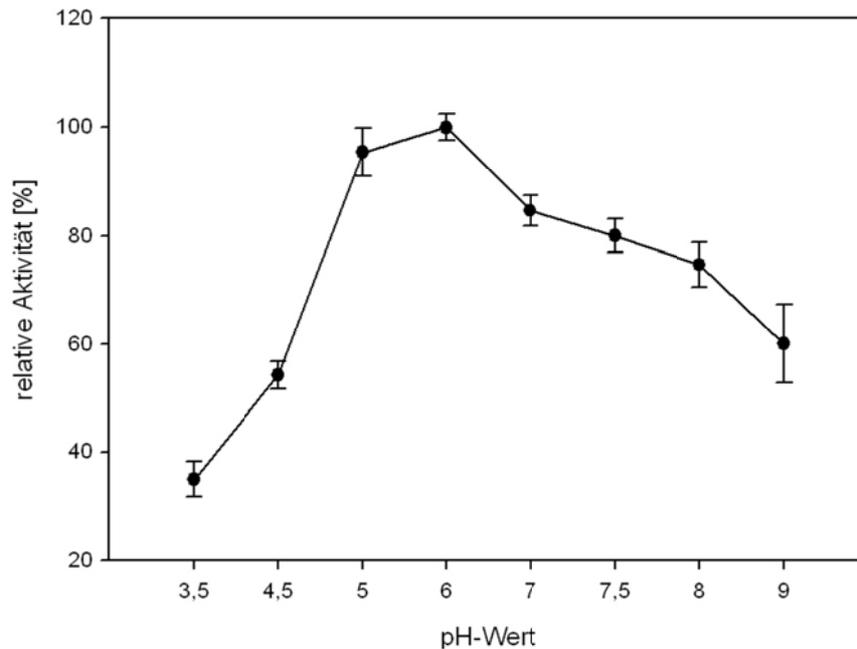


Abbildung 57: pH Optimum von Fvp150.

2.4.5 Bestimmung der Temperatur- und Langzeitstabilität der Peptidasen

Um alle Peptidasen zu erfassen, wurde die peptidolytische Aktivität semiquantitativ mittels Gelatinezymografie ermittelt. Zur Bestimmung der Temperaturstabilität wurden Proben mit verdünntem Peptidasekonzentrat über 120 Minuten bei 40 °C – 70 °C inkubiert. Es zeigte sich, dass bei 50 °C nur noch wenig, ab 60 °C keine Restaktivität mehr vorhanden war (Abbildung 58).

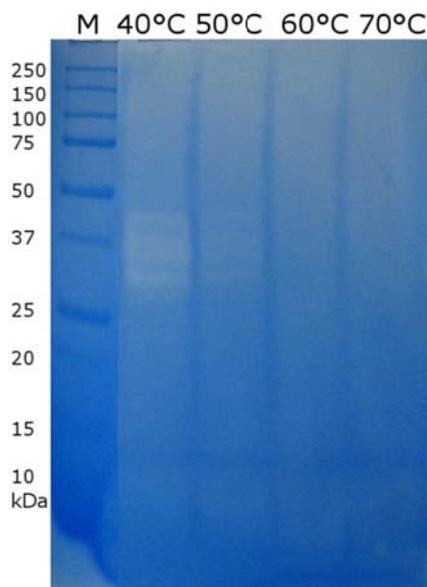


Abbildung 58: Gelatinezymografie mit Proben von verdünntem Peptidasekonzentrat, inkubiert für 120 Minuten bei verschiedenen Temperaturen zur Ermittlung der Temperaturstabilität.

Im Zuge der Hydrolyseversuche mit dem Substrat BSA wurde außerdem die in den Proben enthaltene peptidolytische Restaktivität bestimmt, um zu entscheiden, wann der Versuch beendet werden konnte. Dabei zeigte sich, dass alle Peptidasen auch nach 90 Stunden Inkubation bei 37 °C noch eine deutliche Restaktivität hatten (siehe Abbildung 59), die allerdings ebenfalls nicht quantitativ bestimmt wurde.

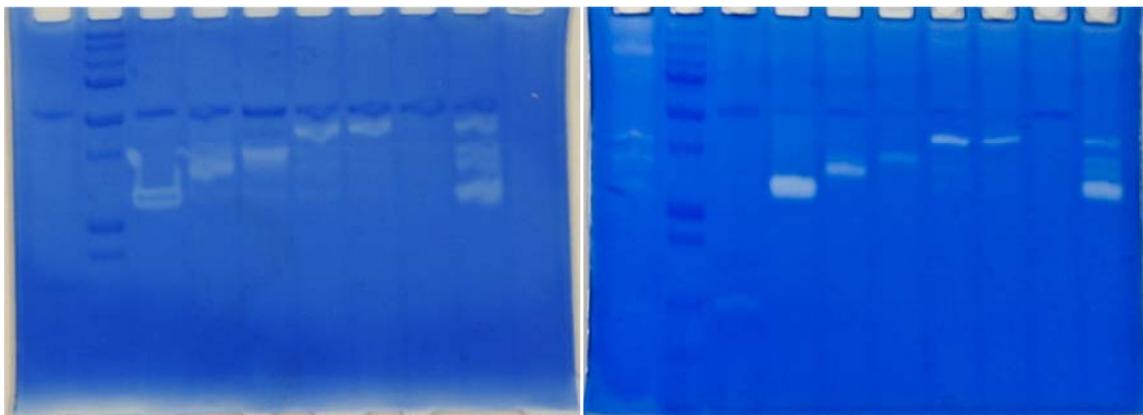


Abbildung 59: Zymografien zur Bestimmung der peptidolytischen Restaktivität einzelner Peptidasen. Links: Vor Versuchsbeginn, rechts: nach 90 h Inkubation bei 37 °C.

2.4.6 Zusammenfassung der Charakterisierung der aufgereinigten Peptidasen

Die Ergebnisse der Peptidasecharakterisierung wurden im Folgenden tabellarisch zusammengefasst.

Tabelle 13: Zusammenfassung der Charakterisierung von Fvp150.

Fvp150	
Familie	Metallopeptidase, keine Homologien zu bekannten Peptidasen
Native Molmasse	~ 150 kDa
Denaturierte Molmasse	59 kDa
Isoelektrischer Punkt (pI)	7,1
Substrate	Ala-Ala-Pro-Phe-pNA, Gly-Gly-Leu-pNA, (Azo)-Casein, (Azo-)Gelatine
Optimale Reaktionsbedingungen	40 °C und pH 6 in 50 mM MES Puffer

Tabelle 14: Zusammenfassung der Charakterisierung von Fvp37.

Fvp37	
Familie	Serinendopeptidase (Subtilase) S08
Unterfamilie	<i>Pleurotus ostreatus</i> -type Peptidase S08.139
Native Molmasse	37 kDa
Denaturierte Molmasse	37 kDa
Isoelektrischer Punkt (pI)	4
Substrate	Ala-Ala-Pro-Phe-pNA, Gly-Gly-Leu-pNA, BSA, Angiotensin, Gelatine
Optimale Reaktionsbedingungen	40 °C in Tris, 50 mM, pH 7,0 + 3 M NaCl und 60 mM CaCl ₂

Tabelle 15: Zusammenfassung der Charakterisierung von Fvp32.

Fvp32	
Familie	C-terminal processing peptidase family S41
Native Molmasse	35 kDa
Isoelektrischer Punkt (pI)	4
Substrate	BSA, Gelatine

Tabelle 16: Zusammenfassung der Charakterisierung für Fvp27.

Fvp27	
Familie	Prolylspezifische Serinpeptidase S28
Unterfamilie	Acid prolyl endopeptidase S28.004
Native Molmasse	27 kDa
Denaturierte Molmasse	49,7 kDa
Isoelektrischer Punkt (pI)	3,8
Substrate	Gly-Pro-pNA, Casein, Gelatine
Optimale Reaktionsbedingungen	pH 5,5 in MES 50 mM und bei 45 °C

Tabelle 17: Zusammenfassung der Charakterisierung von Fvp15

Fvp15	
Familie	Metalloendopeptidase Deuterolysine(like) M35
Native Molmasse	15 kDa
Denaturierte Molmasse	12,7 kDa
Isoelektrischer Punkt (pI)	3,8
Substrate	BSA, Gelatine, Protamin
Optimale Reaktionsbedingungen	pH 5,5 50 mM MES and Natriumsuccinat pH 5,5, 50 mM

2.5 Formation of Sotolon – Enzyme Catalysis or Chemical Reaction?

9th Wartburg Symposium on Flavor Chemistry & Biology, April 13th – April 16th, 2010, Eisenach, Germany, in press

U. Krings, A. Grimrath, D. Linke, S. Schindler, R. G. Berger

Institut für Lebensmittelchemie im Zentrum Angewandte Chemie, Gottfried-Wilhelm-Leibniz Universität Hannover, Callinstraße 5, D-30167 Hannover, Germany

2.5.1 Abstract

The basidiomycete *Laetiporus sulphureus* (edible “chicken mushroom”) imparted a strong seasoning odour when grown on a substrate containing wheat gluten as the sole carbon and nitrogen source. Secreted fungal peptidases hydrolysed the gluten substrate, and numerous potent heterocyclic flavours, among them sotolon (3-hydroxy-4,5-dimethyl-2[5H]-furanone), emerged in the liquefying hydrolysate. Presumed precursors of sotolon, such as acetaldehyde, α -ketobutyric acid, α -ketoglutaric acid, glutamic acid, isoleucine, and ascorbic acid were added to the fungal cells. Upon addition of isoleucine and ferrous irons sotolon became measurable within two days. Small amounts of 4-hydroxyisoleucine (HIL) were identified in the culture supernatant of *L. sulphureus* by HPLC-FD and LC-SIM-MS/MS. Hence, an enzymatic formation of sotolon via HIL cannot be excluded; however, balancing biochemical vs chemical pathways, a slow chemical hydroxylation of the isoleucine released during the enzymatic hydrolysis of gluten seems more likely, because Fe^{3+} was a regular constituent of the culture medium.

2.5.2 Introduction

The enzymatic hydrolysis of plant proteins belongs to the traditional food biotechnologies and produces seasonings with meat-like odour and taste. Substrates rich in glutamine, such as soybean flour or wheat gluten are matured for weeks or months in the presence of peptidases secreted by mixed microbial populations of *Aspergilli*, *Lactobacilli* and yeasts. In search for other organisms generating extracellular peptidases, wood-destroying basidiomycetes do not appear to be preferable candidates. However, when grown on various standard nutrient media or on agro-industrial side streams, many species examined produced several extracellular peptidases from different families.

Surface cultures of *Laetiporus sulphureus* imparted a strong seasoning odour when grown on a wheat gluten substrate. Numerous potent heterocyclic flavours, among them sotolon, were identified. This compound, also known as caramel-, sugar-, or fenugreek-lactone, occurs naturally in fenugreek and lovage and is one of the most powerful flavour compounds known. It was also found in fermented foods, such as wine, sake, salami, and seasonings (*Sulser* lactone), and in over-stored soft drinks. It has a typical and annoyingly stable odour reminiscent of fenugreek and curry at high concentrations, and caramel / maple syrup / burnt sugar attributes at concentrations near its threshold [60], [61], [62]. Although the flavour of both enantiomers is quite similar, the perception threshold of (*S*)-sotolon ($0.8 \mu\text{g L}^{-1}$) in dilute alcoholic solution (12 %) is >100 times lower than that of (*R*)-sotolon ($89 \mu\text{g L}^{-1}$).

Because of the very low natural abundance of sotolon, commercial recovery from plant sources appears impossible and this, in turn, has stimulated the search for biotechnological routes of production. Sotolon has been reported as a distinctive flavour compound of mushrooms such as Huitlacoche (*Ustilago maydis*), Oyster mushroom (*Pleurotus sp.*), and Tawny lactarius (*Lactarius helvus*) [63], [64].

However, little work was reported on cellular approaches on the generation of natural sotolon. Peraza-Luna *et al.* [65] have detected sotolon in hairy root cultures of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*) in both flask cultures and an airlift bioreactor. Two papers [66] [67] describe the formation of sotolon using various microorganisms with *Agaricus blazei* showing the highest conversion rates. A biochemical pathway has not been described yet.

2.5.3 Experimental

Cultivation of *Laetiporus sulphureus*

L. sulphureus (isolated from wood in Lower Saxony, Germany, and identified according to ITS sequences) precultured on agar slants and inoculated in 250 mL Erlenmeyer flask containing liquid minimal medium and gluten pellets (Nestle, PTC, Singen, Germany) was grown as surface culture for two month in dim light at room temperature. A portion of 50 g of gluten pellets was heat sterilised and then mixed with 80 mL of minimal medium (1.5 g L⁻¹ KH₂PO₄, 0.5 g L⁻¹ MgSO₄, and 1 mL L⁻¹ trace element solution; FeCl₃ x 6 H₂O, 0.08 g L⁻¹; ZnSO₄ x 7 H₂O, 0.09 g L⁻¹; MnSO₄ x H₂O, 0.03 g L⁻¹; CuSO₄ x 5 H₂O, 0.005 g L⁻¹, Titriplex III (EDTA), 0.4 g L⁻¹, and adjusted to pH 6.0 with 1 M NaOH).

GC-MS of volatiles

Aliquots (25 mL) of the liquid culture medium were extracted three times with 20 mL azeotropic pentane/diethyl ether (1:1.2, v/v). The combined and dried (Na₂SO₄^{sicc.}) organic phases were concentrated to approx. 1 mL and injected into Fisons GC 8000 gas chromatograph connected to a Fisons MD 800 mass selective detector (interface: 230 °C, ion source: 200 °C, quadrupole: 100 °C, EI ionization (70 eV), scan range m/z 33-300 amu) equipped with a cool on-column injector, a Zebron ZB-WAX (Phenomenex, USA) fused silica capillary column (30 m x 0.32 mm i.d. x 0.25 µm film thickness) and helium (38 cm s⁻¹) as the carrier gas.

HPLC-FD of amino acids

100 µL borate buffer and 20 µL OPA-reagent were mixed with 10 µL internal standard (10 µM Glu-Glu) and 10 µL filtered (0.45 µm cellulose acetate) culture broth, reacted at ambient temperature for 2 min, and replenished with 50 µL of 1 M acetic acid. A 20 µL was injected onto a Shimadzu HPLC system (Shimadzu GmbH, Duisburg, Germany) equipped with a RF-10A XL fluorescence detector (excitation 330 nm, emission 460 nm). Separation was performed using a Nucleodur C18 Pyramid column (250 x 4 mm, 5 µm, Macherey-Nagel, Düren, Germany) at a flow rate of 1 mL min⁻¹ using the following gradient system with methanol (A) and 0.1 M sodium acetate containing 0.044 % triethylamine at pH 6.5 (B): 0-5 min 10% A, 5 –

8 min 15% A, 8 – 40 min 60% A, 40 – 50 min 90% A and 50 – 60 min 10 % A. The relative composition of amino acids was determined in triplicate and calculated according to an external calibration curve.

HPLC-MS2

A Varian HPLC 212-LC coupled to a 320-MS Triple Quad LC- MS² was used in the ESI positive mode: capillary 30 V, needle voltage 5000 V, nebulizer gas 379 kPa at 50 °C, drying gas 124 kPa at 200 °C, and argon at 200 mPa and 15 V collision energy. The same gradient with 0.5 mL min⁻¹, a Phenomenex 2.6 µm RP₁₈ phase (100 x 4.6 mm) and ammonium acetate instead of sodium acetate were used.

2.5.4 Results

During an extended screening of basidiomycota for their capability to secrete peptidases, static surface cultures of *L. sulphureus* attracted attention. The cells grew well on a wheat gluten substrate as the sole carbon and nitrogen source and secreted peptidases which rapidly hydrolysed the sticky gluten substrate (Figure 60). Formation of a liquid phase occurred after 12 to 15 days depending on conditions.

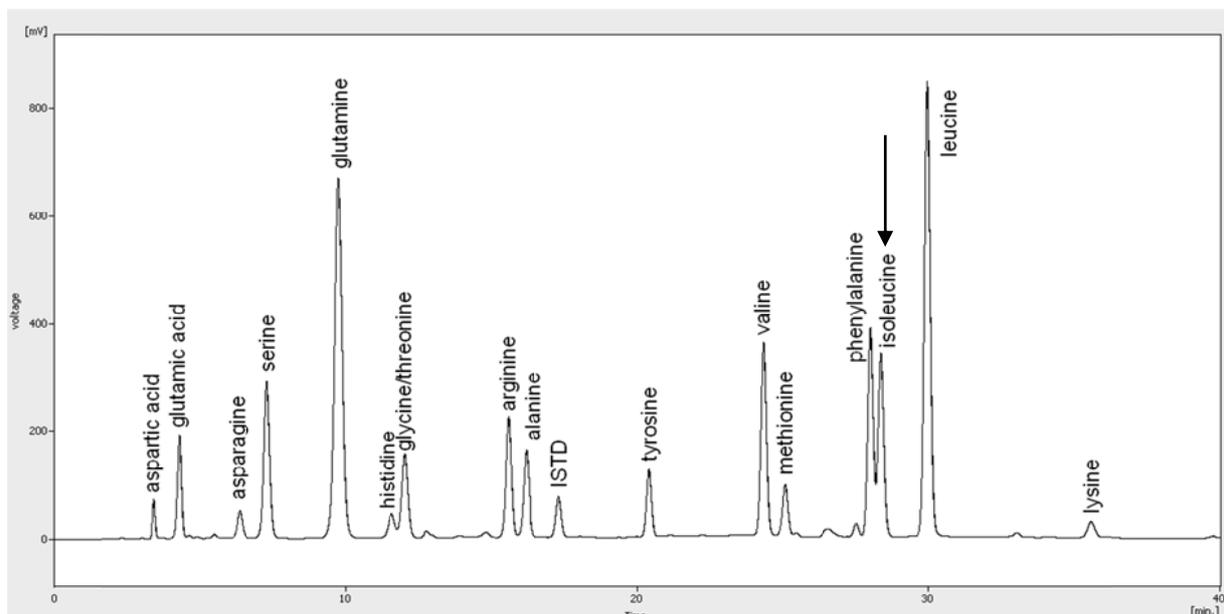


Figure 60: Amino acid pattern generated from gluten by extracellular peptidases of the edible mushroom *Laetiporus sulphureus* ("Chicken Polypore"); isoleucine marked.

After a few weeks the hydrolysates started to impart a strong seasoning odour. GC-MS analyses showed numerous heterocyclic flavours, among them sotolon (Figure 61). The chemical structures of these volatiles suggested that they were generated from the liberated amino acids through deamination, hydroxylation and cyclisation reactions. The fungal cells were incubated with compounds suggested by literature as sotolon precursors, such as acetaldehyde, α -ketobutyric acid, α -ketoglutaric acid, glutamic acid, isoleucine, and ascorbic acid [65], [66]. When isoleucine and ferrous iron were supplemented, a measurable generation of sotolon started already after two days. Low concentrations of 4-hydroxyisoleucine (HIL) were identified in the culture supernatant of *L. sulphureus* using HPLC-FD and LC-SIM-MS/MS (Figure 62).

The protonated molecular ion of HIL at m/z 148 was selected for low energy collision induced fragmentation reaction to confirm HIL findings. The RI and fragmentation pattern were compared to a standard of HIL. As HIL was neither identified in gluten nor in acid hydrolysates thereof, an enzymatic formation of sotolon *via* HIL cannot be excluded. However, balancing biochemical vs chemical pathways, a slow chemical hydroxylation of the isoleucine released during the gluten hydrolysis seems more likely, because Fe^{3+} was present as a constituent of the culture medium.

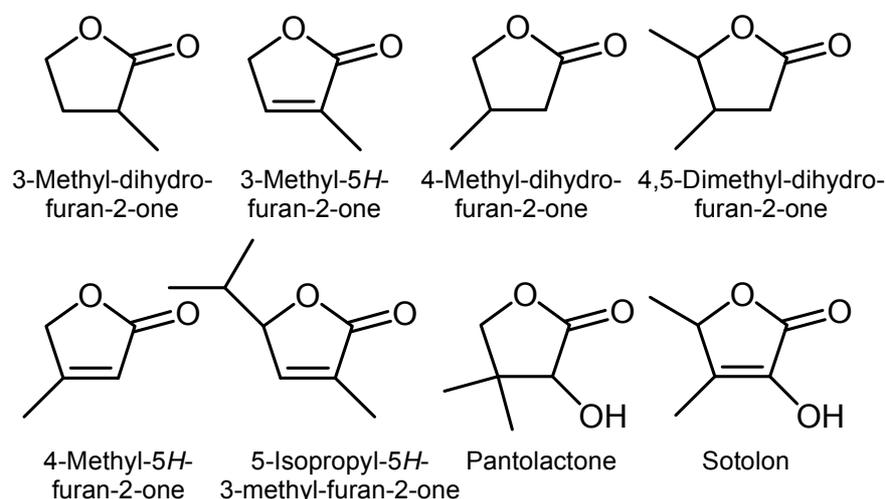


Figure 61: Heterocycles in the supernatant of *L. sulphureus* on gluten.

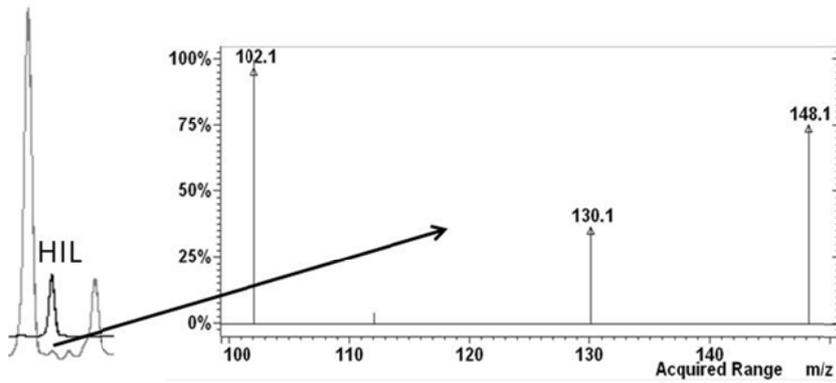


Figure 62: Formation of hydroxyisoleucine (HIL) concomitant to gluten hydrolysis

It is a long-standing observation that cultured microbial cells produce a surplus of reduction equivalents. As the nutrient medium contained EDTA, once formed Fe^{2+} ions are stabilized and may have been available to aid in catalysing the crucial hydroxylation step. The transamination of HIL then yielded 4-hydroxy-3-methyl-2-ketopentanoic acid, the immediate precursor of sotolon.

3 Diskussion

Einfluss der Kultivierung auf die Bildung von Peptidasen

Bei der Kultivierung von 28 Agaricomyceten wurde nach Spezies gesucht, die bei Induktion mit Gluten extrazelluläre Peptidasen produzierten. Die Organismen wurden so gewählt, dass eine möglichst große Vielfalt unter den Arten erreicht wurde, wobei die Kriterien weniger die verwandtschaftliche Beziehung sondern mehr die Lebensweise der Arten umfassten. So wurden drei Pilze ausgewählt, die ausschließlich saprobiontisch in der Bodenstreu leben, die restlichen Basidiomyceten waren xylotroph und unterschieden sich in ihrer Pathogenität, Substratwahl (Laub- oder Nadelholz) und der Fäuleform, wobei die Mehrheit der gewählten Arten Weißfäulepilze waren. Es zeigte sich, dass fast alle Arten in der Lage waren, in submersen Kulturen, die Gluten als einzige C- und N-Quelle enthielten, zu wachsen. Dabei wurden neben Peptidasen mit dem API-ZYM® Assay auch eine Vielzahl anderer extrazellulärer Enzyme detektiert, die wahrscheinlich ebenfalls eine Rolle bei der Ernährung des Pilzes spielen.

Der Substratabbau war dabei oft von einer Färbung des Kulturmediums begleitet, welches bei einigen Arten nach ein bis zwei Wochen eine tief dunkelbraune, opake Färbung bekam. Obwohl die Färbung auf einen verstärkten Glutenabbau hindeutete, korrelierte sie nicht mit der gemessenen peptidolytischen Aktivität und könnte z. B. auch durch die Bildung von Melaminen oder Polyphenolen erklärt werden. Da das für diese Messung verwendete Substrat Azocasein allerdings nicht von allen Peptidasen gleich gut hydrolysiert werden kann, ist ein Zusammenhang zwischen Färbung und Peptidaseaktivität nicht auszuschließen. Es konnte ebenfalls keine Unterscheidung zwischen Weiß- und Braunfäulepilzen bezüglich ihrer Fähigkeit Gluten abzubauen gemacht werden, obwohl die Braunfäulepilze im Schnitt etwas länger brauchten, um die Idiophase zu erreichen.

Als Organismus mit der höchsten Peptidaseproduktion erwies sich *Flammulina velutipes*, ein in Eurasien vorkommender, meist schwach parasitischer oder saprobiontischer Weißfäulepilz an Laubholz. Da dieser Pilz in Asien ein beliebter Speise- und Heilpilz ist, finden sich in der Literatur zahlreiche Veröffentlichungen und Patente, welche sich mit dessen Kultivierung und den gesundheitsfördernden Inhaltsstoffen befassen. Auch antibakterielle, antimikrobielle und antioxidative Effekte wurden nachgewiesen [68], [69].

Eine extrazelluläre Peptidase (FVP-I) von *F. velutipes* mit einer Molmasse von 37 kDa wurde bereits beschrieben [42], [43]. Diese fibrinabbauende Peptidase, welche aufgrund ihrer N-terminalen Anfangssequenz zur Familie der Fungalsine (M36) zugeordnet wurde, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht eindeutig nachgewiesen werden. Denn obwohl diese Peptidase mittels Gelatinezymografie nachweisbar sein soll, konnte sie in der vorliegenden Arbeit keiner Bande zugeordnet werden. Hierfür kann es verschiedene Gründe geben:

1. Da in den Arbeiten von [42] und [43] ein *F. velutipes* Stamm aus Südasien, in dieser Arbeit jedoch ein Stamm aus Deutschland verwendet wurde, könnte es sein, dass diese Peptidase aufgrund genetischer Unterschiede im deutschen Stamm nicht konstitutiv generiert wird.
2. Es wäre auch möglich, dass FVP-I nur auf dem beschriebenen Substrat (Kartoffelstärke) gebildet wird.
3. Die wahrscheinlichste Erklärung ist, dass FVP-I in zu geringer Menge sekretiert wurde und deshalb von der im nativen Zustand gleich großen Fvp37 überlagert wurde. Als Beweis für diese Theorie kann herangezogen werden, dass in diversen Aufreinigungsversuchen (besonders Ionenaustauschchromatografie mit schwachem Anionentauscher, siehe Anhang) bei der Reinigungskontrolle via Zymografie mehrfach zwei 37 kDa große, peptidolytisch aktive Banden detektiert wurden, die in unterschiedlichen Fraktionen eluierten. Ein zweiter Beweis wäre, dass bei der Enzyminhibition mit PMSF, welches Fvp37 hemmte, die Zymografie trotzdem noch eine abgeschwächte Bande entsprechender Größe zeigte.

Bei der Sequenzierung von Fvp37 wurden aber trotzdem keine Proteinsequenzen generiert, welche auf eine M36 Peptidase hingedeutet hätten. Somit kann zusammenfassend festgestellt werden, dass die FVP-I zwar vermutlich auch bei der Induktion mit Gluten sekretiert wird und somit einen Anteil am Glutenabbau haben könnte, die vorhandene Menge jedoch zu gering war, um sie separat zu identifizieren.

Bei der Kultivierung von *F. velutipes* auf unterschiedlichen Substraten sollte gezielt die Produktion extrazellulärer Peptidasen induziert werden. Dies ist besonders mit Gluten, Hanf, Biertreber und Schafwolle gelungen. Für einige der hier verwendeten und verwandte Substrate wurde eine peptidaseinduzierende Wirkung bereits für andere Mikroorganismen (besonders Ascomyceten) beschrieben [1].

In industriellen Prozessen zur Peptidasegewinnung werden z. B. proteinreiche Substrate wie Sojabohnenmehl, Casein, Gelatine und Rückstände wie Getreidetrester unter Zugabe von kohlenhydratreichen Substraten wie Stärke, Gerste oder Laktose verwendet. Generell wird die Aktivität durch komplexere Substrate (Sojabohnenmehl, Weizenkleie) stärker induziert [70], [71]. Auch durch die Kombination verschiedener Substrate konnte die Peptidaseproduktion erfolgreich gesteigert werden (z. B. Reiskleie mit Reisschalen) [72]. Dieser Effekt wurde bei der Kultivierung von *F. velutipes* auf verschiedenen Substratkombinationen nicht beobachtet.

In Versuchen mit verschiedenen Ascomyceten hemmten hohe Konzentrationen von Kohlenhydraten oder freien Aminosäuren die Peptidaseproduktion [70]. Die Produkthemmung der Peptidasen durch freie Aminosäuren wurde bei *F. velutipes* in Hydrolyseversuchen ebenfalls beobachtet (Daten nicht gezeigt) und ist ein Problem, welches durch die Entziehung der freien Aminosäuren aus dem Hydrolyseprozess gelöst werden könnte.

Die Art der Kultivierung kann einen großen Einfluss auf das Mycelwachstum und die Art und Aktivität der produzierten Peptidasen haben. Die Konzentration der von *Rhizoctonia solani* sekretierten Peptidasen variierte z. B. in Abhängigkeit von Stickstoffverfügbarkeit und Stickstoffquelle. Bei Supplementierung mit organischem Stickstoff wurde das Wachstum und die Peptidaseproduktion angeregt, mit anorganischem Stickstoff hingegen gehemmt [73].

Besonders der pH-Wert sowie die Art und Textur des Substrates haben bei dem Koji-Schimmelpilz *Aspergillus sojae* einen starken Einfluss auf die Peptidaseexpression. Der Pilz kann verschiedene Arten von Peptidasen produzieren (alkalische, saure und neutrale Endopeptidasen sowie Exopeptidasen), welche durch unterschiedliche Kultivierungskonditionen induziert werden. In kommerziellen Produktionsprozessen werden daher Konditionen gewählt, welche das beste Gesamtergebnis erzielen [74].

Auch die Wahl der Fermentationsart (Submers- oder Festbettfermentation) hat großen Einfluss auf die Peptidaseproduktion, was in dieser Arbeit auch für *F. velutipes* bestätigt worden ist. Bei einigen Ascomyceten (z. B. *Aspergillus mucor*) wurde die Peptidaseproduktion durch Erhöhung der Flüssigkeitsmenge deutlich verringert. [70], [75], [76]. Bei der Festbettfermentation wächst der Organismus direkt auf dem Substrat, welches nur wenig Wasser enthält [77]. Für *A. oryzae*, einen

Schlüsselorganismus in der Herstellung von Sojasoße, wurde nachgewiesen, dass nur bei Festbettfermentation (Koji) ein effektives Enzymsystem induziert wird, um Soja- und Weizenprotein abzubauen [78]. Eine Erklärung für die Peptidaseinduktion in Submerskulturen könnte die schlechte Zugänglichkeit der ausreichend vorhandenen Nährstoffe wegen des geringen Flüssigkeitsgehaltes in Koji-Kulturen sein. Dies konnte indirekt für *A. oryzae* nachgewiesen werden, der in einem Festbettfermenter verstärkt Gluconeogenese betrieb, was auf massive Versorgungsmängel hindeutete [78].

Die zum Zweck der Peptidasegewinnung entwickelte Kultivierungsmethode mit *F. velutipes* wurde wegen der Parallelen zum Koji-Prozess in der Sojasoßenherstellung Koji-Kultivierung genannt. Die dabei verwendeten, speziell für die Koji-Fermentation entwickelten Glutenpellets (dehydriertes und durch Extrusion pelletiertes Gluten) bewirkten bei Ascomyceten eine Steigerung der Enzymsekretion und somit eine Verbesserung des Gesamtprozesses, was z. B. für die beiden relevanten Koji-Pilze *Aspergillus sojae* und *A. oryzae* nachgewiesen wurde [79]. Auch für *F. velutipes* konnte gezeigt werden, dass die Kultivierung in Form einer Festbettfermentation, in welcher Koji-Gluten, das bis zum Sättigungspunkt mit mineral- und spurenelementhaltigem Wasser gesättigt wurde, eine 6-fache Erhöhung der sekretierten Peptidaseaktivität gegenüber submerser Kultivierung mit pulverförmigem Gluten bewirkte.

F. velutipes zeigte bei der Kultivierung auf unterschiedlichen Substraten variierende Muster der Peptidasesekretion. Besonders auffällig waren dabei die drei Substrate Hanffaser, Biertreber und Schafwolle, welche neben Gluten auch den stärksten induzierenden Effekt hatten. Beim Wachstum auf Biertreber wurden nur Fvp250 und Fvp150 gebildet, auf Hanffaser fehlte nur Fvp27 (prolylspezifische Peptidase) und die auf Gluten immer nur schwach bis nicht gebildete Fvp75 wurde in größerer Konzentration sekretiert. Beim Wachstum auf Schafwolle, supplementiert mit Vollmedium, war das Peptidasemuster besonders überraschend, da hier Fvp250, Fvp150, Fvp75 nur sehr schwach und die normalerweise in geringen Konzentrationen sekretierte Fvp32 (Carboxserinpeptidase) stärker vorhanden waren und zudem eine Peptidase mit nativer Größe von 65 kDa zu sehen war.

Da sich die Substrate in Hinsicht auf Inhaltsstoffe, Textur und pH Wert stark unterschieden, scheint der Pilz in der Lage zu sein, Peptidaseexpressionsmuster an

die gegebenen Umstände anpassen zu können, wobei Fvp250 und Fvp150 anscheinend auf jedem Substrat sekretiert wurden. Generell war auch eine Reduktion der Peptidasemenge messbar, wenn ein Substrat eine leicht verfügbare C-Quelle enthielt. So wurde z. B. durch die Zugabe von gut erschließbaren Stickstoff- oder Kohlenhydratquellen die Bildung von Peptidasen bei *A. niger* unterdrückt [80]. Die Kultivierung auf Hanf, Hopfen oder Schafwolle bewirkte dagegen eine allgemeine Steigerung der Peptidasesekretion, was eventuell auf fungizide Inhaltsstoffe dieser Substrate zurückzuführen ist.

F. velutipes wuchs auf Substraten, welche einen niedrigen pH Wert hatten, sehr schlecht (Apfeltreber) oder überhaupt nicht (Hagebuttentreber, Sanddornpresskuchen). Von anderen Organismen ist bekannt, dass das Peptidaseexpressionsmuster bei hohen und niedrigen pH Werten variiert. So sekretiert der Agaricomycet *Rhizoctonia solani* (u. a. Kartoffelfäule) bei saurem pH Wert (pH 4 – 5) Peptidasen mit einem Optimum bei niedrigen pH Werten, bei Erhöhung des pH Wertes auf pH 7,5 des Mediums hingegen alkalische Peptidasen [73]. Viele Basidiomyceten sind in der Lage, bei schwach gepufferten Substraten den pH Wert des Mediums zu beeinflussen, wobei sich nach wenigen Tage Kultivierung oft ein saurer pH Wert einstellt, weshalb eventuell die Anpassung ihres Sekretionsmusters an wechselnde pH Werte in der Umgebung nicht notwendig ist [81]. Das peptidolytische Expressionsmuster von *F. velutipes* scheint jedenfalls nicht so flexibel zu sein. So wurden z. B. keine Hinweise darauf gefunden, dass exklusiv bei sehr niedrigen pH Werten Aspartatpeptidasen gebildet wurden wie bei *R. solani*. Da *F. velutipes* natürlicherweise in Holzkörpern wächst, deren pH Werte generell im sauren Bereich liegen [82], ist dies überraschend. Da für die Serinpeptidase Fvp27 ein pH Optimum bei pH 5,5 und für die Metallopeptidase FVP-I bei pH 6 [43] nachgewiesen wurde, ist es aber möglich, dass *F. velutipes* auch so über eine ausreichende Aktivität von sauren Peptidasen verfügt.

Auf der anderen Seite zeigte *F. velutipes* die Fähigkeit, auch bei pH Werten über pH 8 zu wachsen. Dies war für eine erfolgreiche Kultivierung mit Koji-Gluten sehr wichtig, da sich durch den fortschreitenden Abbau und die Verstoffwechslung des proteinogenen Substrats Ammoniumionen in der Kultur konzentrierten, was den pH-Wert sukzessiv erhöhte. Diese pH Toleranz scheint eine Besonderheit bei *F. velutipes* zu sein. So stellte z. B. *A. niger* die Peptidasebildung bei Anhebung des pH Wertes in den alkalischen Bereich ein [80].

Die Ergebnisse zeigen, dass es oft schwierig ist, die Auswirkungen eines Substrates oder einer Kultivierungsmethode auf die Sekretion von Peptidasen abzuschätzen, da beide den Organismus oft sehr komplex beeinflussen. Es stellt sich die Frage welche Funktionen die *F. velutipes* Peptidasen neben dem Substratabbau haben könnten.

Für den phytopathogenen Basidiomyceten *R. solani* wurde nachgewiesen, dass die Verfügbarkeit von Stickstoff im Nährmedium die Zusammensetzung der produzierten Peptidasen verändert, indem organisch gebundener Stickstoff sowohl das Mycelwachstum als auch die Peptidaseproduktion stimulierte. Bei Supplementation mit anorganischem Stickstoff fand keine Induktion statt [73]. Gleichzeitig induzierte die Anwesenheit von thermostabilen Proteinen aus Kartoffeln die Produktion von trypsinartigen Peptidasen, die Zugabe von Hefeextrakt hingegen die von Subtilisinen. Da die Bildung von Subtilisinen gleichzeitig die der trypsinartigen Peptidasen unterdrückt, wurde auf einen Mechanismus geschlossen, der den Pilz je nach verfügbarer Stickstoffquelle entweder saprobiontisch (Subtilisine) oder pathogen (trypsinartige Peptidasen) agieren lässt.

Auch bei einigen Schimmelpilzen der Gattung *Fusarium* besteht eine klare Korrelation zwischen der Sekretion von trypsinartigen Peptidasen und der Pathogenität des jeweiligen Organismus, woraus eine direkte Beteiligung dieser Peptidasen am pathogenen Prozess gefolgert wurde [83].

Würde man einen ähnlichen Mechanismus für den ebenfalls fakultativ phytopathogenen *F. velutipes* annehmen, würde die Kultivierung auf Gluten also eher das saprobiontische Peptidasesystem aktivieren, was auch durch die Anwesenheit von Fvp37, einer Subtilase, untermauert wird. Aber obwohl auch *R. solani* ein Basidiomycet ist, wurden in den Genomen der Basidiomyceten *U. maydis* und *C. cinerea* keine homologen Sequenzen zu trypsinartigen Peptidasen (Familie S1) gefunden [55]. Dies deutet darauf hin, dass auch *F. velutipes* eventuell keine trypsinartige Peptidase bilden kann und somit auch keine Parallelen zu den gefundenen Peptidasen als Pathogenitätsindikatoren in *R. solani* und *Fusarium sp.* vorhanden sind. Auch im API-ZYM® Assay wurde im peptidasehaltigem Kulturüberstand keine trypsin- oder chymotrypsinartige peptidolytische Aktivität detektiert, was diese Vermutung unterstützt.

Es wäre jedoch trotzdem denkbar, dass die von *F. velutipes* gebildeten Peptidasen weitere Funktionen haben. Eine Studie zur Peptidaseproduktion von gemeinsam kultivierten Mycorrhizapilzen und Saprobionten kam zu dem Ergebnis, dass vor allem

Peptidasen, welche im alkalischen Bereich aktiv waren, eine wichtige Rolle im Mycoparasitismus zu spielen scheinen, während Aspartatpeptidasen eher eine Rolle bei der Ernährung des Pilzes zukommt [84].

Bei *F. velutipes* konnten bei der Kultivierung auf Koji-Gluten keine Unterschiede in der Zusammensetzung des Peptidasemusters in Tropho- und Idiophase festgestellt werden, wie dies z. B. bei [52] der Fall war. Trotzdem war der Übergang zur Idiophase an einer sprunghaft ansteigenden peptidolytischen Gesamtaktivität und parallel dazu einer Steigerung des Protein- und Aminosäuregehaltes in der Kultur gut erkennbar.

Auch bei anderen Basidiomyceten ist ein festes Muster, wann, wo und wie spezielle Peptidasen ausgeschieden werden, oft nicht eindeutig festzulegen. Sowohl junge als auch alte Mycelzellen können selektiv Peptidasen ausscheiden. Diese unterschiedlichen Sekretionsmuster könnten mit der Physiologie verschiedener Spezies zusammenhängen [85].

Glutenabbau durch extrazelluläre Peptidasen von *F. velutipes*

In dieser Arbeit wurden acht extrazelluläre Peptidasen identifiziert, die von *F. velutipes* beim Wachstum auf Gluten generiert wurden. Fünf dieser Peptidasen konnten aufgereinigt und vier sequenziert werden, so dass eine Zuordnung zu Peptidasefamilien möglich war. Dies ließ auch Rückschlüsse auf den katalytischen Typ, den Aufbau des aktiven Zentrums und spezifische Aktivitäten zu.

Es ist davon auszugehen, dass die einzelnen Peptidasen nicht additiv, sondern synergistisch beim Glutenabbau wirken, wobei die Bedeutung der einzelnen Peptidasen im Folgenden abgewogen werden soll. Erläuterungen zu den verwendeten Spaltstellentermini finden sich unter 4.7.

Subtilisine, zu denen Fvp37 gehört, sind Serinpeptidasen, deren katalytische Triade aus den drei Aminosäuren Asparagin, Histidin und Serin besteht. Der Reaktionsmechanismus ist bekannt [86]. Sie kommen in Eu- und Prokaryonten vor und haben eine gute Stabilität im Bereich von pH 7 – 10. Subtilasen werden kovalent durch Standard-Serinpeptidaseinhibitoren wie PMSF inaktiviert. Sie repräsentieren die größte bekannte Familie unter den Serinpeptidasen. Das 1974 gefundene Subtilisin Carlsberg (S08.001) aus *Bacillus licheniformis*, dessen jährliche Produktionsmenge bei 500 t liegt, wird verbreitet in Reinigungsmitteln eingesetzt [1].

Subtilisine spalten relativ unspezifisch. Die höchste Spezifität besteht an den Spaltstellenpositionen S1 und S4. In der Position S1 werden Aminosäuren mit großen, nicht beta-verzweigten, hydrophoben Seitengruppen präferiert [87], in der P4 Position dagegen jegliche hydrophobe Seitenketten [88], [89]. Der pI liegt meist im alkalischen Bereich (7,8 bis ~ 11) [90]. Der pI von Fvp37 liegt dagegen bei 4. Mittels Sequenzvergleich konnte eine hohe Homologie mit der Subtilase S08.139 (PoSI *Pleurotus ostreatus*-Typ Peptidase) aus *P. ostreatus* festgestellt werden [10].

In *Phanaerochaete chrysosporium* wurde eine Peptidase gefunden, die ebenfalls der Unterfamilie S08.139 zugeordnet werden konnte [11]. Auch im Genom des vollständig sequenzierten Basidiomyceten *Coprinopsis cinerea* konnte eine entsprechende Sequenz identifiziert werden [55]. Da PoS1 im Vergleich mit anderen Subtilisinen eine leicht unterschiedliche Sequenz aufweist, wird vermutet, dass dieses Enzym auch nach Lysin in P1 Position schneiden kann, was eine Besonderheit für Subtilasen wäre [91]. Neben ihrer Rolle für die Ernährung wird auch ein regulatorischer Zusammenhang der PoS1 mit einer Peroxidase (POXA1b) postuliert [10].

Die Familie S41, zu der Fvp32 gehört, teilt sich in zwei Subfamilien auf. Die tertiären Strukturen beider Unterfamilien sind bekannt und zeigen, dass diese sehr unterschiedliche katalytische Mechanismen haben. Die "C-terminal processing peptidase-2" vom Typ S41 A, zu der aufgrund der Sequenzhomologien wahrscheinlich auch Fvp32 gehört, verfügt über eine katalytische Diade mit zwei Aminosäuren in der Reihenfolge Serin und Lysin. Innerhalb der Familie sind weder die katalytisch aktiven Aminosäuren noch deren Position konserviert. Allerdings enthalten alle Peptidasen der Familie sogenannte PDZ Domänen (modular aufgebaute Proteininteraktionsdomänen), deren Affinität zu C-Termini von Polypeptiden bekannt ist und die somit wahrscheinlich für die C-terminale Spezifität verantwortlich sind [92]. Die "C-terminal processing peptidase-2" vom Typ S41 A erkennt z. B. ein Tripeptid X-Y-Z am C-terminalen Peptidende, wobei X vorzugsweise Ala oder Leu, Y Ala oder Tyr und Z Ala ist. Die Abspaltung erfolgt dann in variablem Abstand zum C-Terminus [55].

Zur Familie der Prolylspezifische Exopeptidasen (Fvp27) gehören sowohl Amino- als auch Carboxypeptidasen, die prolylspezifisch spalten. Die Pro-X Carboxypeptidase

(S28001) [93] spaltet Aminosäuren mit der generellen Struktur –Pro–X, wobei das C-terminale X eine Aminosäure oder Schutzgruppe sein kann [94]. Die Dipeptidylpeptidase II (S28A002), eine Aminopeptidase, spaltet ebenfalls prolylspezifisch an der generellen Struktur –Pro–X, allerdings ist hier die Aminosäure X N-terminal.

Der optimale pH Wert dieser Enzymgruppe liegt um pH 5, wobei die pH Toleranz zwischen den einzelnen Peptidasen unterschiedlich ist und auch vom Substrat beeinflusst wird. Die Pro-X Carboxypeptidase ist am aktivsten, wenn sich Lysin oder Isoleucin in P2 und Prolin in P1 Stellung befinden [95] und wird durch PMSF komplett inhibiert, wobei nur eine schwache inhibitorische Wirkung auf Fvp27 nachgewiesen wurde. Prolylspezifische Peptidasen sind von großer Bedeutung für die Hydrolyse von prolinreichen Substraten. Eine Dipeptidylpeptidase aus *Aspergillus oryzae* nimmt z. B. eine entscheidende Rolle beim Abbau von glutenbasierten Substraten ein, da in Hydrolyseversuchen ohne dieses Enzym die Konzentration langer Peptidketten im Hydrolysat zunahm und sich die Konzentration der Dipeptide verringerte [32].

Deuterolysine, zu denen Fvp15 gehört, spielen eine wichtige Rolle bei der Aromabildung von Sojasoße, indem sie Sojabohnenproteine spezifisch hydrolysieren. Deuterolysine sind extrazelluläre Metallopeptidasen und enthalten zwei zinkbindende Histidine, welche für die Aktivität des Enzyms essentiell sind [96]. Sie sind äußerst thermostabil, mit einer Denaturierung bei ca. 70 °C und Renaturierbarkeit bis 100 °C. Deuterolysine sind besonders aktiv auf basischen Substraten wie Histonen, Protaminen und Salminen [97]. Basische Aminosäuren wie Arginin oder Lysin werden allgemein in P1' Position bevorzugt. Mit laborüblichen Substraten wie z. B. Caseinen oder Albuminen werden nur sehr geringe Aktivitäten erreicht. Die Spezifität weicht also insgesamt stark von der vieler anderer Enzyme ab. Es ist wahrscheinlich, dass Deuterolysine eine minimale Peptidlänge benötigen, um diese hydrolysieren zu können.

Insgesamt weisen die bekannten Sequenzen von Fvp15 zu allen Gruppen der Deuterolysinfamilie geringe, aber trotzdem noch signifikante Homologien auf. Einige Partialsequenzen wiesen auch hohe Homologien zur Familie der Fungalysine (M36) auf. Fvp15 ist mit 12 kDa ein sehr kleines Enzym, es gab aber keine Hinweise darauf, dass es sich bei der nativen Fvp15 um ein Oligomer handelt.

Die aufgereinigten Peptidasen von *F. velutipes* bauten eine Vielzahl unterschiedlicher Substrate ab. Dabei wurden einige Substrate nur von speziellen Peptidasen hydrolysiert (kurze synthetische Peptide, Protamin, Angiotensin, Casein), während andere Substrate für mehrere Peptidasen ein geeignetes Substrat darstellten (Gelatine, BSA). Warum allerdings einige Peptidasen zwar Gelatine, aber keine Azogelatine hydrolysierten, konnte nicht eindeutig geklärt werden.

Die Kernfrage bei der Identifizierung peptidolytischer Aktivitäten war, ob mit dem Peptidasegemisch aus *F. velutipes* das Substrat Gluten hydrolysiert werden konnte. Dass dies der Fall war, wurde durch die Bestimmung des Hydrolysegrades mittels RP-HPLC Aminosäureanalytik gezeigt. Es soll an dieser Stelle kurz demonstriert werden, dass alleine die vier Peptidasen Fvp37, Fvp32, Fvp27 und Fvp15 in der Lage sind, Glutenproteine effektiv abzubauen.

Hierfür wurde folgende Überlegung angestellt: Das in dieser Arbeit verwendete Weizengluten besteht zum Großteil aus den wasserunlöslichen Proteinfractionen der Glutenine und Gliadine. Glutenine bestehen zu 20 % aus hochmolekularen (HMW, "high molecular weight") und zu 80 % aus niedermolekularen (LMW, "low molecular weight") Einheiten [21]. Diese Einheiten werden von mehreren Genen codiert und bestehen zu einem Großteil aus den konservierten und vielfach wiederholten Motiven GQQPGQ und GQQPGQGQQGYPTS. Abbildung 63 zeigt eine solche LMW Einheit. Alle Aminosäuren, die fett markiert wurden, können von mindestens einer der genannten Fvp Peptidasen in P1 oder P1' Stellung gespalten werden. Es handelt sich dabei um abgeleitete Spaltpräferenzen, die auf den Spezifitätsmatrices der Peptidasefamilien basieren, denen die Fvp Peptidasen zugeordnet wurden.

10	20	30	40	50	60
<u>MK</u> TFLV <u>FALL</u>	<u>AVVATSTIAQ</u>	<u>METSCIPGLE</u>	<u>RPWQEQPLPP</u>	<u>QHTLFPQQQP</u>	<u>FPQQQQPPFS</u>
70	80	90	100	110	120
<u>QQQPSFLQQQ</u>	<u>PILPQLPFSQ</u>	<u>QQQPVLPPQS</u>	<u>PFSQQQLVLP</u>	<u>PQQQYQQVLQ</u>	<u>QQIPIVQPSV</u>
130	140	150	160	170	180
<u>LQQLNPKVVF</u>	<u>LQQQCNPVAM</u>	<u>PQRLARSQML</u>	<u>QQSSCHVMQQ</u>	<u>QCCQQLPQIP</u>	<u>EQSRYDVIRA</u>
190	200	210	220	230	240
<u>ITYSIIHQEQ</u>	<u>QQGFVQAQQQ</u>	<u>QPQQLGQGVVS</u>	<u>QSQQQSQQQL</u>	<u>GQCSFQQPQQ</u>	<u>QLGQQPQQQQ</u>
250	260	270	280	290	
<u>VLQGTFLQPH</u>	<u>QIAHLEVMTS</u>	<u>IALRTLPTMC</u>	<u>SVNVPLYSST</u>	<u>TSVPFSVGTG</u>	<u>VGAYL</u>

Abbildung 63: Glutenin, low molecular weight subunit PTDUCD1, Sequenz von UniProt [98].

Das gleiche Prinzip der Spaltstellenpräferenz wurde auch auf eine Gliadinsequenz angewendet. Es ist deutlich zu erkennen, dass die *F. velutipes* Peptidasen auch dieses Protein zu kurzen Peptiden abbauen können (Abbildung 64).

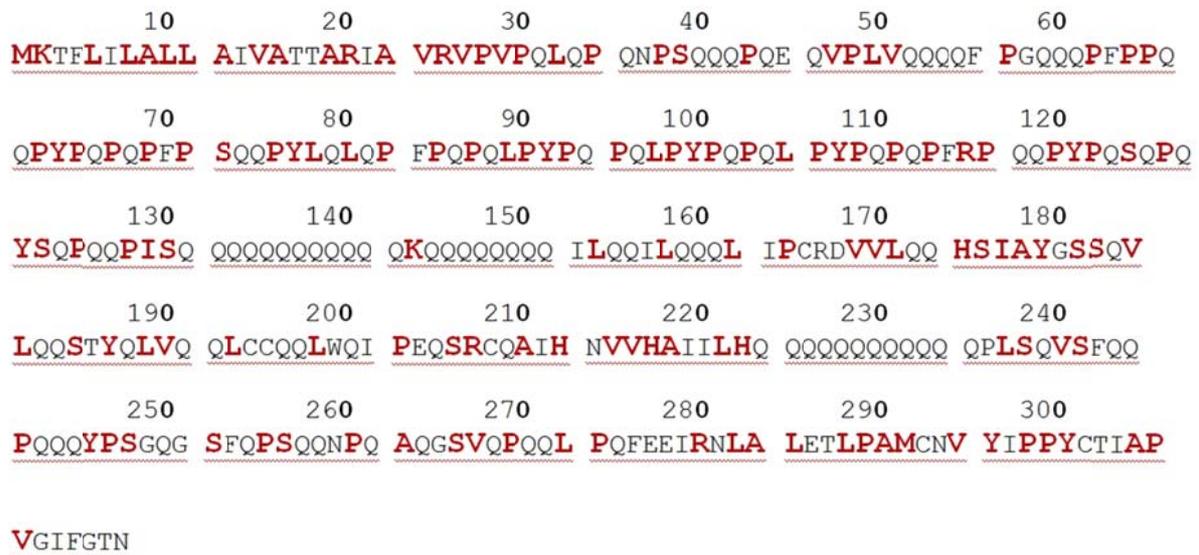


Abbildung 64: α - β -Gliadin MM1, 307 Aminosäuren, Sequenz von UniProt [98].

Da sich in Koji-Kulturen alle im Gluten enthaltenen Aminosäuren (besonders Glutamin und Glutaminsäure) wiederfinden, kann neben dieser Überlegung weiter gefolgert werden, dass auch die Peptidbindungen zwischen den Aminosäuren, welche hier nicht fett markiert wurden, hydrolysiert werden können. Ob die Hydrolyse dieser restlichen Aminosäuren, besonders der glutaminreichen Motive, durch die bisher nicht genauer charakterisierten Peptidasen geschieht oder als Nebenaktivität der bereits bekannten Peptidasen, muss offen bleiben.

Generell sind pilzliche Peptidasen dafür bekannt, dass sie im Vergleich zu Peptidasen anderer Organismen bei der Hydrolyse von proteinogenen Substraten die positive Eigenschaft haben, dass entstehende Hydrolysate nicht bitter sind. In der Industrie spielen pilzliche Peptidasen bei der Entbitterung von Proteinhydrolysaten daher eine wichtige Rolle. Anwendungsbereiche finden sich dabei in diätischen und medizinischen Produkten, in Säuglingsnahrung und in Würzmitteln wie Sojasoße, bei denen Bitterkeit ein großes Problem darstellt [1].

Da die Bitterkeit eines Produkts proportional zur Anzahl von Peptiden aus Aminosäuren mit hydrophoben Seitenketten, insbesondere Prolin, ist, sind für die Entbitterung besonders Peptidasen von Bedeutung, die diese Aminosäuren abspalten können [1], [99]. Bei der Hydrolyse von prolinreichen Substraten wie

Gluten ist es ein generelles Problem, dass prolinreiche Peptide oft nicht weiter abgebaut werden können. Selbst Peptidasen mit einer breiten Substratspezifität oder solche, die prolylspezifischen Peptidasen ähneln (Spaltpräferenz an Aminosäuren mit hydrophoben Seitenketten wie Tryptophan, Phenylalanin, Methionin) versagen. Dies begründet sich in der einmaligen Struktur des Prolins, dessen Seitenkette aus einem Pyrrolidinringsystem besteht. Peptidasen, die die Fähigkeit haben, Prolin spezifisch abzuspalten, wurden inzwischen in vielen Organismen gefunden, unter anderem auch in Asco- und Basidiomyceten [100].

Von besonderem Interesse ist diese Fähigkeit auch unter dem Gesichtspunkt der Detoxifizierung von Gluten für Zöliakiepatienten. Gliadine (besonders einige Gruppen der α - und β -Gliadine) können bei Betroffenen durch komplexe Reaktionen mit Darmschleimhaut und Immunsystem schwere allergische Reaktionen auslösen. Es konnten einige Peptide als Primärauslöser der allergischen Reaktionen identifiziert werden, die durch keine bekannte humane gastrische oder pankreatische Peptidase abgebaut wurden [101] [102].

Eine prolylspezifische Peptidase in *Aspergillus niger* setzte die Bitterkeit von Caseinhydrolysaten stark herab und verminderte zusätzlich auch potente allergene Faktoren des Glutens für Zöliakiepatienten [103]. Gleichzeitig zur Entbitterung wurde eine signifikante Verringerung hydrophober Peptide registriert. Die hierfür verantwortliche Peptidase wurde als zur Familie S28 zugehörig identifiziert, zu der auch Fvp27 gehört. Auch andere Studien kamen zu dem Ergebnis, dass prolylspezifische Peptidasen für die Detoxifikation von Gluten für Zöliakiepatienten eingesetzt werden können, da sich auch hier die Anzahl potentiell immunstimulierender Peptide durch Einsatz einer prolylspezifischen Peptidase rasch verminderte [104].

Diese Ergebnisse unterstreichen die Bedeutung von Fvp27 für die erfolgreiche Glutenhydrolyse. Sie werfen jedoch auch die Frage auf, inwiefern weitere Enzyme am Abbau beteiligt sein müssen, die das Substrat entsprechend vorhydrolysieren, um für Fvp27 geeignete Substratpeptide zu generieren.

Besonders für verschiedene *Aspergillus* Arten, die als Kojipilze in der Sojasoßenproduktion eine Schlüsselrolle spielen, wurde die Bedeutung von Peptidasegemischen in der Hydrolyse komplexer Substrate nachgewiesen.

So wurde gezeigt, dass *Aspergillus fumigatus* eine prolylspezifische Peptidase sowohl unter alkalischen als auch sauren Verhältnissen produziert, die im Zusammenspiel mit anderen Exopeptidasen, welche je nach pH Wert des Mediums variierten, effektiv prolinreiche Peptide abbaute. Ohne prolylspezifische Peptidase agierten X-Pro Sequenzen als Stoppsignal [105].

Ein starker synergistischer Effekt zwischen einer unspezifischen Monoaminopeptidase und einer X-Prolyl Dipeptidyl Aminopeptidase aus *Aspergillus oryzae* wurde nachwiesen, indem mit der Kombination dieser zwei Enzyme plus Subtilisin (E.C. 3.4.21.62) einen Hydrolysegrad von 64 % für Gluten erreicht wurde [106].

Der Hydrolysegrad wurde bei der Zugabe der X-Prolyl Dipeptidyl Aminopeptidase, nachdem das Subtilisin entfernt worden war (Inkubation beider Enzyme nicht gleichzeitig, sondern nacheinander), nicht erhöht, womit eine additive Rolle der prolylspezifischen Peptidase ausgeschlossen werden konnte. Dies belegt die große Bedeutung der kombinierten Anwendung verschiedener Enzyme für die effektive Hydrolyse komplexer Substrate (z. B. Gluten, Casein, Lutein oder Sojaprotein), wobei prolylspezifische Peptidasen immer eine Schlüsselrolle sowohl für den Hydrolysegrad als auch die Aromabildung / Entbitterung spielten. Für den effektiven Proteinabbau genügte ein System aus drei Peptidasen (Subtilase, prolylspezifische Aminopeptidase und unspezifische Aminopeptidase) aus, um hohe Hydrolysegrade zu erreichen, wobei diese drei Enzyme auch aus verschiedenen Organismen stammen konnten [106].

Im Fall von *F. velutipes* wurde sowohl eine Subtilase (Fvp37) als auch eine unspezifische Exopeptidase (Fvp32) im extrazellulären Peptidasegemisch identifiziert, die in Anlehnung an diese Ergebnisse neben Fvp27 ebenfalls besonders wichtig für die Glutenhydrolyse sind.

Dennoch sollte die Bedeutung der weiteren Peptidasen aus *F. velutipes* nicht unterschätzt werden. Auch Fvp150 spielt mit großer Wahrscheinlichkeit eine wichtige synergistische Rolle bei der Hydrolyse von Gluten. Obwohl es bisher nicht gelungen ist, die hydrolytische Aktivität dieser Peptidase genau zu spezifizieren, konnte doch gezeigt werden, dass sich Fvp150 in ihrer Spezifität von den anderen *F. velutipes* Peptidasen unterscheidet, was auf eine andere Spaltstellenspezifität schließen lässt. Auch Fvp15, eine deuterolysinartige Peptidase, hat eine Spaltspezifität und Selektivität, die von den anderen *F. velutipes* Peptidasen abweicht. Neben dem

möglichst vollständigen Abbau aller Glutenproteine zu einzelnen Aminosäuren sind Peptidasen gleichzeitig auch am Aromabildungsprozess des Hydrolysates beteiligt. Und gerade Fvp15 könnte für diesen von großer Bedeutung sein.

Aromabildung in Glutenhydrolysaten

Dass an der Sojasoßenherstellung eine erstaunlich hohe Anzahl von verschiedenen extrazellulären Peptidasen mitwirkt, wurde für *A. oryzae* nachgewiesen. Bei Kultivierung auf Koji-Gluten wurden allein sieben verschiedene extrazelluläre Peptidasen sowie eine Glutaminase und diverse weitere Enzyme identifiziert [22].

Wird der Koji-Fermentationsprozessschritt bei der Herstellung von Sojasoße betrachtet, wird deutlich, dass die beteiligten Peptidasen einen entscheidenden Beitrag an der Bildung typischer Aromakomponenten haben [22].

Zum Verständnis der für die Aromabildung bei der Hydrolyse von pflanzlichen Proteinen wichtigen Prozesse wird im Folgenden kurz auf die Vorgehensweise bei der mehrstufigen Herstellung von Sojasoße eingegangen. Die verwendeten Mikroorganismen und Fermentationsbedingungen variieren regional und produktbedingt. In Japan wird neben Sojabohnen auch Weizengluten eingesetzt. Die Produktionszeit liegt traditionell bei 1 – 2 Jahren, wird aber in modernen Prozessen meist verkürzt. Zunächst werden die befeuchteten Sojabohnen unter Dampfdruck gekocht, der Weizen geröstet und gemahlen. Beides wird vermischt, mit Koji (Schimmelpilzsporenmasse z. B. von *Aspergillus flavus var. oryzae*, oder nah verwandten Arten wie z. B. *A. sojae*) beimpft und für 24 – 48 Stunden inkubiert, wobei pilzliche Peptidasen beginnen die pflanzlichen Proteine abzubauen. Danach wird die Kojimasse mit Wasser, 15 – 17 % NaCl (w/v), halotoleranten Bakterienstämmen und Hefen (*Pediococcus soyae*, *Tetragenococcus halophilus*, *Zgosaccharomces rouxii*, *Candida famata*) als so genannte Moromi für 6 – 8 Monate bei Raumtemperatur fermentiert. Durch diese Prozesse werden Soja- und Weizenproteine fast komplett zu Aminosäuren und kurzen Peptiden hydrolysiert. Die gereifte Moromi wird schließlich ausgepresst und pasteurisiert [15].

Die Entwicklung von Aromastoffen während der Fermentation von Sojabohnen hängt dabei stark von der Art des verwendeten Kojipilzes ab [107]. Als wichtige Aromen der malzig, karamellartig und herzhaft-würzig riechenden Sojasoße gelten die Furanone 4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2*H*)-furanon, 4-Hydroxy-5-ethyl-2-methyl-3(2*H*)-furanon

(oder 4-Hydroxy-2-ethyl-5-methyl-3(2*H*)-furanon) und 3-Hydroxy-4,5-dimethyl-2(5*H*)-furanon (Sotolon), wobei aber noch weitere Aromastoffe (3-Methylbutanal, Methional, Ethanol, Ethyl 2-methylpropanoat Phenylacetaldehyd, Essigsäure, 3-Methylbuttersäure und 2-Phenylethanol) zu den wichtigsten Aromakomponenten gezählt werden [61], [108]. Insgesamt wurden über 300 flüchtige Aromastoffe identifiziert [109], unter anderem Lactone und Pyrazine [110]. Sotolon konnte als Komponente mit der zweithöchsten Aromaaktivität identifiziert werden [61]. Aufgrund der geringen Thermostabilität verliert sich das Sotolonaroma allerdings bei der Zugabe zu heißen Gerichten.

Die Hauptbestandteile, welche zum Geschmack von Sojaprodukten beitragen, sind Salz, organische Säuren, Zucker, Mononatriumglutamat, Aminosäuren und Maillardpeptide [111], wobei die Wahl des Substrates, der (Koji-) Organismen und die Reifungszeit auch hier die kritischen Faktoren für die Geschmacksbildung sind [112]. Es ist anzunehmen, dass diese Inhaltsstoffe ebenso bei der Fermentation von reinem Weizengluten tragend für die Aroma- und Geschmacksbildung sind, wobei die Konzentration der bei der Hydrolyse freigesetzten Aminosäuren vor allem enzymatisch bedingt ist. Für einen hohen Glutamatgehalt sind Glutaminasen [EC 3.5] von besonderer Bedeutung, die das freie Glutamin durch Desaminierung in Glutaminsäure umsetzen. Eine Asparaginase mit einer Glutaminasenebenaktivität wurde in *F. velutipes* nachgewiesen [113].

Es ist bekannt, dass auch Basidiomyceten für die Hydrolyse von Sojaprotein geeignet sind [14], wobei aber keine Untersuchungen zu Hydrolysegrad und Aromaprofil der Hydrolysate vorliegen.

Dass auch bei Gluten-Fermentationsprozessen mit Basidiomyceten für Sojasoße typische Aromastoffe gebildet werden können, wurde für *L. sulphureus* demonstriert. Neben anderen Lactonen wurde die Bildung von Sotolon nachgewiesen, welches einer der Schlüsselaromastoffe in Sojasoße ist [114].

Da bei der Untersuchung der Fruchtkörper von *L. sulphureus* völlig andere Aromaprofile gefunden wurden [26], [27], lässt sich die Bildung von Sotolon auf die Kombination mit dem Substrat Gluten zurückführen. Fraglich ist, ob das Sotolon auf enzymatischem Weg über 4-Hydroxyisoleucin als Präkursor gebildet wurde. Wegen der Anwesenheit von Fe³⁺ im Kulturmedium ist aber wahrscheinlicher, dass ein chemischer Bildungsweg vorlag.

4-Hydroxy-5-ethyl-2-methyl-3(2*H*)-Furanon (HEMF), eine weitere Schlüsselaromakomponente in Sojasoße, wird auf biosynthetischem Weg gebildet, wahrscheinlich als indirektes Produkt des Pentosephosphat-Zyklus über D-Ribulose-5-Phosphat, welches sich in Moromi nachweisen lässt [115]. Da es aber ebenfalls beim Maillardprozess aus Pentosen geformt werden kann, ist auch hier der enzymatische Entstehungsweg in Fermentationsprozessen nicht gesichert [60].

Extrazelluläre Enzyme sind bei der Bildung von HEMF Präkursoren (D-Xylulose-5-Phosphat) aus proteinogenen Substraten von großer Bedeutung. Die Identität dieser Präkursoren konnte jedoch noch nicht festgestellt werden. Beim Einsatz eines Enzymgemisches aus Peptidasen, Cellulasen und Hemicellulasen für den Sojaproteinabbau wurde die größte Konzentration HEMF gebildet, aber auch Peptidasen allein waren schon effektiv [116]. Es wurde zudem nachgewiesen, dass die Bildung von D-Xylulose-5-Phosphat durch die pilzlichen Enzyme im Koji und nicht erst während der Moromifermentation geschieht.

Als Peptidasen wurden ein ungereinigter Enzymextrakt aus *Aspergillus sojae*, Molsin aus *Aspergillus saitoi* (eine Subtilase) und Thermoase aus *Bacillus thermoproteolyticus rokko* (eine pepsinartige Aspartatpeptidase) eingesetzt.

Bei der Verwendung von Weizengluten wurde dagegen auch mit dem vollen Enzymgemisch kein HEMF gebildet, eine geringe Menge Gluten als Beigabe zum Sojamehl wirkte sich dagegen bildungssteigernd aus, woraus gefolgert wurde, dass sich HEMF Präkursoren vor allem in Sojabohnen befinden [116].

Da die Glutenhydrolysate von *F. velutipes* und *L. sulphureus* jeweils typisch würzige, fleischige Aromen aufwiesen, wobei für *L. sulphureus* diese Beobachtung durch weitergehende Untersuchungen auch belegt werden konnten, lässt sich vermuten, dass auch hier ähnliche enzymatische Prozesse wie bei [116] bei der Entstehung von Lacton-Aromapräkursoren stattfinden könnten. Hervorzuheben ist dabei, dass die Kultivierung nur einen kojiartigen Fermentationsprozess darstellt und kein weiterer Organismus (Hefe) eingesetzt wurde, um die postulierten Präkursoren weiter zu verstoffwechseln. Dass in *L. sulphureus* Glutenhydrolysaten kein HEMF gefunden wurde, dafür aber eine Reihe anderer aromaaktiver Lactone wie Sotolon, könnte die Annahme von [116] bestätigen, dass dieser Aromastoff in größeren Konzentrationen nur aus Sojaprotein generiert werden kann. Offen bleibt, ob in Kulturen von *L. sulphureus* auf Sojaprotein eventuell neben Sotolon auch HEMF nachgewiesen werden könnte.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass verschiedene Basidiomyceten, besonders *F. velutipes*, Peptidasen bildeten, die effektiv Gluten hydrolysieren konnten. Aus der Vielzahl der dabei gebildeten Peptidasen wurden fünf charakterisiert, von denen vier einer Peptidasefamilie zugeordnet werden konnten. Fvp37, Fvp27 und Fvp15 gehören zu Peptidasefamilien, deren Bedeutung für die Hydrolyse von pflanzlichen Proteinen bereits nachgewiesen wurde [55], [106]. Für *L. sulphureus* wurde zudem gezeigt, dass während des hydrolytischen Proteinabbaus auch Aromaschlüsselkomponenten wie Sotolon gebildet wurden.

Peptidasen aus Basidiomyceten bieten sich daher für die enzymatische Hydrolyse von pflanzlichen Proteinen an und stellen somit einerseits eine Alternative zur Salzsäurehydrolyse, bei der als Nebenprodukte karzinogene Chlorpropanole (z. B. 3-Chlorpropan-1,2-diol) anfallen, andererseits auch zu traditionellen Hydrolyseverfahren (z. B. der Sojasoßenherstellung) dar. Im Vergleich mit den bisher zur enzymatischen Glutenhydrolyse eingesetzten Peptidasen, die z. B. von *Aspergilli* produziert werden, waren Peptidasen aus Basidiomyceten bezüglich des Hydrolysegrades überlegen. Des Weiteren handelt es sich bei *F. velutipes* um einen beliebten Speise- und Heilpilz, während viele *Aspergillus* Arten als humanpathogen eingestuft werden und ihr zur Produktion von Enzymen für die Lebensmittelchemie somit grundsätzlich kritisch betrachtet wird. Der Einsatz von Speise- anstelle von Schimmelpilzen könnte auch zu einer höheren Verbraucherakzeptanz der Produkte führen.

Weitere Anwendungsgebiete für Peptidasen aus Basidiomyceten

Aber auch für weitere Zwecke, die im Folgenden kurz angesprochen werden, können Peptidasen oder Proteinhydrolysate, die unter Einsatz von Peptidasen aus Basidiomyceten hergestellt wurden, interessant sein.

Der Einsatz von heterolog exprimierten Peptidasen ist dabei in vielen Fällen denkbar, wobei hier wenig Erfahrung mit Basidiomyceten vorliegt. Ein generelles Problem bei der heterologen Expression eukaryontischer, extrazellulärer Enzyme in Prokaryonten (z. B. Bakterien wie *Escherichia coli*) ist die Bildung von "inclusion bodys", oder inaktiven Zymogenen, da die Peptidasen nicht korrekt sekretiert und aktiviert werden können. Derartige Hindernisse können aber durch geeignete Strategien überwunden werden, oder es können andere, eukaryontische Expressionssysteme gewählt

werden. Mehrere extrazelluläre Peptidasen verschiedener *Aspergilli* wurden schon kloniert und heterolog exprimiert, wobei die Ergebnisse nur zum Teil zufriedenstellend waren. Wegen der beigemessenen Bedeutung an der Aromabildung in Fermentationsprozessen lag der Schwerpunkt hierbei auf alkalischen Peptidasen [1].

Proteinhydrolysate sind in den letzten Jahren neben ihrer würzenden Funktion auch als funktionelle Lebensmittel interessant geworden. Sojasoße hat z. B. einen positiven Einfluss auf das menschliche Verdauungssystem und beinhaltet bioaktive Stoffe welche z. B. antikanzerogene und antibiotische Wirkungen haben sollen [15], [117]. Die Konzentration und Zusammensetzung dieser Stoffe hängt dabei hauptsächlich vom verwendeten Mikroorganismus ab. Da die Fruchtkörper vieler Basidiomyceten auch in der traditionellen Medizin verwendet werden, wäre der erfolgreiche Einsatz dieser Pilze für die Herstellung von funktionellen Lebensmitteln durchaus denkbar. Da Basidiomyceten in ihrer natürlichen Umgebung antibakterielle und antimykotische Stoffe synthetisieren um zu überleben, ist es überraschend, dass bisher keine Antibiotika gezielt aus Basidiomyceten produziert werden [4].

Beispielsweise scheinen fibrinspezifische Peptidasen aus Organismen, die für die Lebensmittelproduktion eingesetzt werden, besonders für medizinische Zwecke geeignet zu sein [36]. Sie haben daher ein hohes Potential als Zusätze für Lebensmittel verwendet zu werden, die zur Verhinderung kardiovaskulärer Erkrankungen eingesetzt werden könnten. Da auch *Flammulina velutipes* eine extrazelluläre fibrinspezifische Peptidase (Fungalysin) sekretiert, wäre der Einsatz dieses Pilzes im medizinische Bereich denkbar. Eine weitere Anwendungsmöglichkeit für pilzliche Peptidasen könnte aber z. B. auch die Hydrolyse von tierischem Protein sein [118].

Zusammenfassend kann also gesagt werden, dass die Peptidasen aus *F. velutipes* ein hohes Potential zum Einsatz bei der Herstellung von Lebensmitteln und im medizinischen Bereich haben.

4 Material und Methoden

4.1 Kultivierung

Folgende Basidiomyceten wurden zur Untersuchung ihrer extrazellulären, peptidolytischen Aktivität kultiviert:

Agaricus arvensis (DSMZ, Nr. 8327), *Armillaria mellea* (CBS, Nr. 100.12), *Collybia dryophila* (DSMZ, Nr. 8356), *Fomitopsis pinicola* (DSMZ, Nr. 4957), *Flammulia veluptipes* (DSMZ, Nr. 1658), *Ganoderma applanatum* (CBS, Nr. 250.61), *Gloeopyllum odoratum* (CBS, Nr. 444.61), *Grifola frondosa* (CBS, Nr. 480.63), *Hirneola auricula-judae* (DMSZ, Nr. 11326), *Hericium erinaceus* (CBS, Nr. 260.74), *Kuehneromyces mutabilis* (DMSZ, Nr. 1684), *Laetiporus sulphureus* (DSMZ, Nr. 11211), *Lycoperdon perlatum* (DSMZ, Nr. 8678), *Macrolepiota procera* (DSMZ, Nr.3399), *Meripilus giganteus* (CBS, Nr. 561.86), *Marasmius scorodonius* (CBS, Nr. 850.87), *Phaenochaete chrysosporium* (Identifikation anhand von ITS Sequenzen), *Phallus impudicus* (DSMZ, Nr. 3400), *Phellinus* ssp. (Isolat aus Holz in Niedersachsen, Identifikation anhand von ITS Sequenzen), *Pleurotus ostreatus* (Identifikation anhand von ITS Sequenzen), *Polyporus* (Isolat aus Holz in Niedersachsen, Identifikation anhand von ITS Sequenzen), *Polyporus umbellatus* (CBS, Nr. 483.72), *Serpula lacrymans* (CBS, Nr. 751.79), *Sparrassis crispa* (CBS, Nr. 408.71), *Trametes* ssp (DSMZ, Nr. 11309, (Identifikation anhand von ITS Sequenzen), *Tremella mescentaria* (DSMZ, Nr. 1557), *Wolfiporia cocos* (CBS, Nr. 279.55) und *Xerula radicata* (DSMZ, Nr. 4830).

4.2 Medien

Tabelle 18: Medien für die Kultivierung: SNL Medium

SNL-Medium (nach Sprecher, 1959)	
Chemikalie	Konzentration
D(+)-Glucose-Monohydrat	30,0 g L ⁻¹
L-Asparagin-Monohydrat	4,5 g L ⁻¹
Hefeextrakt	3,0 g L ⁻¹
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	1,5 g L ⁻¹
Magnesiumsulfat (MgSO ₄)	0,5 g L ⁻¹
Spurenelementlösung (s.u.)	1,0 mL L ⁻¹
Auffüllen mit dest, H ₂ O, Einstellung auf pH 6,0 mit 1 M NaOH	

Tabelle 19: Medien für die Kultivierung: Minimalmedium

Minimalmedium (modifizierte SNL)	
Chemikalie	Konzentration
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	1,5 g L ⁻¹
Magnesiumsulfat (MgSO ₄)	0,5 g L ⁻¹
Spurenelementlösung (s.u.)	1,0 mL L ⁻¹
Auffüllen mit dest, H ₂ O,	

Tabelle 20: Medien für die Kultivierung: Spurenelementlösung

Spurenelementlösung	
Chemikalie	Konzentration
FeCl ₃ x 6 H ₂ O	0,08 g L ⁻¹
ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	0,09 g L ⁻¹
MnSO ₄ x H ₂ O	0,03 g L ⁻¹
CuSO ₄ x 5 H ₂ O	0,005 g L ⁻¹
Titriplex III (EDTA)	0,4 g L ⁻¹
Auffüllen mit dest, H ₂ O,	

4.3 Kulturführung

Kultivierung auf Agar in der Petrischale

SNL wurde mit 1,5 % Agar autoklaviert und in Petrischalen gegossen. Von der Originalpetrischale wurde ein Stück bewachsener Agar ausgestochen und auf die neue Petrischale gelegt. Diese wurde dann mit Parafilm verschlossen und bei 25 °C

dunkel inkubiert. Nachdem der Agar in der Petrischale voll bewachsen war wurden die Kulturen im Kühlschrank gelagert (Haltbarkeit: mehrere Monate).

Vorkultur in SNL (Vollmedium)

Erlenmeyerkolben (300 mL, ohne Schikane) wurden mit 100 mL SNL Medium befüllt und zusammen autoklaviert. Von einer bewachsenen Agarplatte wurde ein 1 x 1 cm² Stück ausgestochen, in den Kolben mit SNL gegeben und mit dem Ultra Turrax zerkleinert. Die Kulturen wuchsen bei ca. 24 °C über 6 – 8 Tage (während dieser Zeit bildeten sich Myzelpellets) und wurden dann weiterverwendet.

Hauptkultur auf Glutenpellets

Die Glutenpellets wurden trocken bei 130 – 135 °C sterilisiert, wobei die Sterilisationszeit mindestens 8 Stunden betragen musste. Danach wurden die Pellets mit Minimalmedium (steril) gemischt, mit Pilzmyzel aus Vorkultur (oder ersatzweise frisch homogenisiertem Myzel von Agarplatte) inokuliert und bei 24 °C statisch inkubiert.

Das optimale Mischungsverhältnis von Glutenpellets und Minimalmedium war 1 : 1,8 (w/v), erfolgreich kultiviert werden konnte im Bereich von 1 : 1,5 bis 1 : 2.

Bei der Entwicklung der Kultivierungsmethode wurden folgende Vorgehensweise für die Sterilität des Substrates und ein optimales Pilzwachstum als besonders wichtig erkannt:

Da Glutenpellets und das Minimalmedium im Autoklaven zu einem festen Klumpen zusammenklebten, wurden beide getrennt sterilisiert. Während der Sterilisation im Erlenmeyerkolben wurden die Glutenpellets alle 3 – 4 Stunden aufgeschüttelt um ein Verklumpen zu verhindern.

Um ein optimales Myzelwachstum zu ermöglichen, wurde die Flüssigkeitsmenge so gewählt, dass sich gerade so viel Medium im Behältnis befand, dass diese nur in den Glutenpellets gebunden vorlag. Wurde das Verhältnis der Flüssigkeitsmenge geändert, führte dies zur Austrocknung der oberen oder einem Überschwemmen der unteren Glutenpellets. Beides hatte negative Auswirkungen auf die Entwicklung des Pilzes.

4.4 Bestimmung der Peptidaseaktivität

Die Peptidaseaktivität von Kulturüberständen, Peptidasekonzentraten und aufgereinigten Peptidasen wurde mit verschiedenen Methoden bestimmt.

Als Puffer für Aktivitätsbestimmungen wurde standardmäßig Natriumphosphat, 50 mM, pH 7,0 verwendet, für die Bestimmung der pH Optima zusätzlich Natriumacetat (pH 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5), MES (pH 5,5, 6,0, 6,5), MOPS (6,5, 7,0, 8,0), HEPES (7,0, 7,5, 8,0), Tris (7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5) und Borat (pH 8,5, 9,0, 9,5, 10,0), alle 50 mM.

Proteinkonzentrationen wurden mit dem D_cProtein Assay (BIO-RAD no. 500-0113) gemessen.

4.4.1 Bestimmung der Peptidaseaktivität mit Azocasein

Hierbei handelt es sich um eine fotometrische Endpunktmessung für die unspezifische Bestimmung von Peptidaseaktivitäten [46]. Das Azocasein wird dabei durch peptidolytische Aktivität gespalten, wodurch es mit Trichloressigsäure nicht mehr ausgefällt werden kann. 1 aU entspricht der Enzymaktivität, die eine Erhöhung der Extinktion um 0,01 bei 37 °C hervorruft. Wegen der hohen Protein- und Aminosäurekonzentrationen in Kulturüberständen und Peptidasekonzentraten wurde die Methode so modifiziert, dass 0,9 mg Azocasein pro mg Gesamtprotein eingesetzt wurden.

Dieser Assay eignet sich im Allgemeinen als Anhaltspunkt für den Nachweis von Peptidasen. Da jedoch das Substrat Casein nicht von allen Peptidasen abgebaut wird, ist die Aussagekraft dieses Assays für Proben, die mehrere Peptidasen enthalten, eingeschränkt.

4.4.2 Bestimmung der Peptidaseaktivität mit Azogelatine

Die Synthese von Azogelatine erfolge nach der Vorschrift aus [119]. Es wurden 20 g L⁻¹ Gelatine und 4 g L⁻¹ Natriumcarbonat in 275 mL bidest. H₂O gelöst und auf 54 °C temperiert (=Lösung A). für Lösung B wurden 0,01 mol L⁻¹ Sulfanilsäure und 0,01 mol L⁻¹ Natriumhydroxid in 30 mL bidest. H₂O gelöst, darauf wurden 0,01 mol L⁻¹ Natriumnitrit und 0,02 mol L⁻¹ Salzsäure hinzugefügt und für zwei

Minuten gerührt. Danach wurden zu Lsg. B $0,02 \text{ mol L}^{-1}$ NaOH zugefügt, für 5 sec. weitergerührt und dann Lösung A zu Lösung B gegeben und 5 min weitergerührt. Die resultierende, dunkelorange Lösung wurde über Nacht gegen 4 L H_2O dialysiert und danach lyophilisiert. Das Lyophilisat wurde in bidest. H_2O resuspendiert (10 % (w/v)). Der Azogelatine Assay wurde ansonsten wie der Azocasein Assay durchgeführt.

4.4.3 Bestimmung der Peptidaseaktivität mit Gelatinezymografie

Diese Methode diente zur Visualisierung peptidolytischer Aktivität in nativen Polyacrylamidgelen und erfolgte nach [47] und [48]. Es wurden 0,33 g gelöste Gelatine pro 1 mL Gel einpolymerisiert. Die Probenvorbereitung und Durchführung der Elektrophorese erfolgte wie in 4.5.2 beschrieben.

Die Gele wurden nach der Elektrophorese der aufgetragenen Proteine in einer Renaturierungslösung (2,5 % Triton X-100) gewaschen, danach in einem geeigneten Puffer für 1 bis 24 Stunden inkubiert und schließlich mit Coomassie Brilliant blue gefärbt. Es handelt sich um eine Negativfärbung. An den Stellen im Gel, an denen sich Peptidasen befinden wird die Gelatine abgebaut und die peptidolytische Aktivität wird durch weiße Banden sichtbar.

4.4.4 Bestimmung der Peptidaseaktivität mit synthetischen Peptiden und BSA

Es wurden folgende Substrate verwendet: N-Succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-*para*Nitroanilid, Z-Gly-Gyl-Leu-*para*Nitroanilid, Z-Gly-Pro-*para*Nitroanilid und Leu-*para*Nitroanilid.

Alle Messungen mit *para*Nitroanilid markierten Peptiden wurden in 96-Well Mikrotiterplatten mit einem Snergy 2™ Mikrotiterplattenlesegerät mit Gen5 – Software ausgeführt (BioTek, Winooski, Vermont, USA).

Für die Assays wurden jeweils 7,5 μL Substrat (2 mM,) und 20 – 5 μL Enzymlösung in einem Totalvolumen von 150 μl vermessen. Als Puffer wurde standardmäßig Natriumphosphat, 50 mM, pH 7 verwendet.

Der molare Extinktionskoeffizient von *p*-Nitroanilin wurde als $5392.7 \mu\text{l} \mu\text{mol}^{-1}$ bei 405 nm bestimmt. Die Maximalgeschwindigkeit v_{max} [$\text{mA} \cdot \text{min}^{-1}$] der Zunahme der Absorption wurde über 30 – 60 Minuten bei 37 °C bestimmt.

Die Peptidase-Aktivitäten wurden nach folgender Gleichung berechnet:

$$E_A [\text{mU} \cdot \text{mL}^{-1}] = v_{\text{max}} [\text{mA} \cdot \text{min}^{-1}] \cdot \frac{V_{\text{ges}} [\mu\text{L}]}{\varepsilon \cdot V_{\text{Enzym}} [\text{mL}]}$$

V_{ges} : Gesamtvolumen in Well [μl]

ε : Extinktionskoeffizient ($5392,7 \mu\text{l} \mu\text{mol}^{-1}$ bei $150 \mu\text{l}$ Gesamtvolumen)

V_{Enzym} : Volumen Enzymprobe [ml]

Eine Unit peptidolytischer Aktivität entspricht der Konzentration an Enzym die benötigt wird, um $1 \mu\text{mol}$ *p*-Nitroanilid pro Minute umzusetzen.

BSA (bovine serum albumin) wurde in einer Endkonzentration von $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ als Substrat mit je $10 \mu\text{L}$ in NaPhosphatpuffer, 50 mM, pH 7,0. eingesetzt Die Versuchsansätze wurden bei 900 U / min über einen Zeitraum von 90 h bei 37 °C inkubiert, wobei nach 0, 6, 18 und 24 h Proben genommen wurden. Die Proben wurden mittels hochauflösender SDS-PAGE analysiert (je $10 \mu\text{L}$ / Tasche) (siehe 4.5.2). Dabei wurde vor allem beobachtet, ob BSA abgebaut wurde und ob neue Peptidbanden entstanden. Da es sich bei der SDS-PAGE um eine semiquantitative Methode handelt, wurden beim BSA-Abbau nur Trends registriert.

4.5 Aufreinigung von Peptidasen

4.5.1 Analytische und präparative Isoelektrische Fokussierung (IEF)

Die analytische IEF wurde durchgeführt mit einem Pharmacia LKB Multiphor II. Es wurden Servalyt™ Precote Gele mit immobilisiertem pH-Gradienten (pH 3-10) (Serva) verwendet. Die Probenauftragsmenge betrug 10 µL. Die Durchführung erfolgte gemäß der beiliegenden Betriebsanleitung. Elektrophoresebedingungen: 2000 V, 6 mA, 12 W, 3500 Vh. Für die Auswertung wurden die Gele entweder direkt mit Coomassie G gefärbt (Visualisierung von Proteinbanden) oder mit einem gelatinehaltigen Gel überschichtet, welches nach erfolgter Inkubation ebenfalls mit Coomassie gefärbt wurde (Zymografie zur Visualisierung peptidolytischer Aktivität).

Für die präparative IEF wurde das Rotofor® System (Bio-Rad) verwendet. Die Durchführung erfolgte gemäß der Betriebsanleitung. Als Anoden- und Kathodenelektrolyte wurden je 0,1 M Natriumhydroxyd und Phosphorsäure verwendet. Für die einzelnen Läufe wurden 35 – 50 mL Kulturüberstand in die Trennkammer eingefüllt. Die Erfolgskontrolle erfolgte mittels Gelatinezymografie der gesammelten Fraktionen.

4.5.2 Analytische und präparative Polyacrylamid Gelelektrophorese (PAGE)

Die analytische PAGE wurde nach [48] durchgeführt. Native PAGE mit aktiven Proben wurden bei 4 °C, 10 mA / Gel und mit nichtdenaturierendem Puffer (ohne DTT) durchgeführt. Wegen des sich im Laufpuffer befindenden SDS (Natriumlaurylsulfat) liegen die Proteine bei dieser Methode zwar nicht mehr völlig nativ vor, diese wurde jedoch zur Unterscheidung von der herkömmlichen denaturierenden SDS-PAGE in dieser Arbeit als "native PAGE" bezeichnet. Es wurden das Mini Twin System (Biometra) und das Miniprotean TetraCell System (Bio-Rad) genutzt.

Tabelle 21: Zusammensetzung Single Gel

Single Gel	
dest. H ₂ O	2,1 mL
2 × Puffer	3,5 mL
AA / BAA	1,4 mL
APS-Lsg.	7,5 µL
TEMED	3,5 µL

Verwendete Lösungen:

Tabelle 22: Lösungen für die Single Gel PAGE: 2 x Puffer

2 × Puffer in dest, H₂O,	
Tris Base	76 mM
L-Serin	100 mM
Glycin	100 mM
L-Asparagin	100 mM
Auf pH 7,4 einstellen, Filter sterilisieren (Ø 0,22 µm) und bei 4 °C lagern	

Tabelle 23: Lösungen für die Single Gel PAGE: APS-Lsg.

Ammoniumperoxodisulfat-Lösung (APS-Lsg.)	
APS	400 g
dest. H ₂ O ad 1 L Lagerung bei – 20 °C	

Tabelle 24: Lösungen für die Single Gel PAGE: Probenauftragspuffer

Probenauftragspuffer in dest, H₂O	
Tris-HCl pH 6,8	150 mM
DTT	200 mM
Glycerol	40 % (v/v)
SDS	4 % (w/v)
Bromphenolblau	25 mg L ⁻¹

Tabelle 25: Lösungen für die Single Gel PAGE: 10 x Elektrophorese-Laufpuffer

Elektrophorese-Laufpuffer 10 ×	
Tris Base	30,2 g
Glycin	144,2 g
SDS	10 g
H ₂ O ad 1 L	
Der Laufpuffer wurde vor der Verwendung 1:10 mit dest. H ₂ O verdünnt	

Die präparative PAGE wurde mit Model 491 PrepCell von Bio-Rad durchgeführt. Die Durchführungsparameter entsprachen denen der analytischen nativen PAGE. Jedoch wurden hierbei bis zu 4 mL Probe über ein bis zu 12 cm hohes und 150 mL fassendes Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die Peptidasen eluierten nach 10 – 90 Stunden ihrer Molmasse nach unten aus der Gelsäule heraus und wurden mit einem Elutionspuffer (Natriumphosphat 50 mM, pH 7,0) abgespült und in 5 – 7 mL Fraktionen gesammelt. Wegen der langen Laufzeit wurden z. T. mehrere Hundert Fraktionen pro Lauf gesammelt. Die Elektrophorese wurde nach [120] durchgeführt. Die Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel ist Tabelle 26 zu entnehmen.

Tabelle 26: Gelzusammensetzung präparative PAGE nach [120]

	Trenngel	Sammelgel
H ₂ O	27,5 mL	6 mL
Lower Tris (3 M / L Tris)	12,5 mL	
Upper Tris (1 M / L Tris)		2,5 mL
BAA / AA Lsg. 37,5 : 1)	10 mL	1,5 mL
APS-Lsg. (40 %)	62,5 µL	24 µL
TEMED	30 µL	10 µL

Das Trenn- und Sammelgel wurden vor der Zugabe von APS und TEMED jeweils 15 min im Ultraschallbad entgast. Nach dem Gießen des Trenngels wurde dieses mit Isopropanol überschichtet und polymerisierte ca. 12 h aus. Das Isopropanol wurde entfernt, das Sammelgel gegossen und ebenfalls mit Isopropanol überschichtet. Nach dem Auspolymerisieren (ca. 2 h) wurde das Gel mit Elektrophorese-Laufpuffer überschichtet. Die Proteinprobe wurde mit dem gleichen Volumen Probenauftragspuffer vermischt und aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei 4 °C und 10 W durchgeführt. Es wurde der LKB Bromma 2111 Multirac Fraktionssammler mit angeschlossener Meredos SPGLV Quetschpumpe verwendet. Die Flussrate der Elution lag bei 0,4 mL min⁻¹. Es wurden Fraktionen à 6 mL gesammelt.

High Resolution PAGE

Für den Abbau von BSA wurde eine spezielle SDS-PAGE Methode verwendet [121], bei der neben Sammel- und Trenngel zusätzlich ein Spacergel zwischen Sammel- und Trenngel gegossen wurde. Auf diese Weise wurde eine besonders hohe Auflösung über den gesamten Molekularbereich erzielt.

Tabelle 27: Gelzusammensetzung High Resolution PAGE

	Chemikalie	Konzentration
Trenngel	H ₂ O	6,7 mL
	Glycerin	3,2 mL
	AA / BAA Lsg. (29 : 1)	10 mL
	Trenngelpuffer	10 mL
	APS, 40 %ige Lsg.	24 µL
	TEMED	10 µL
Spacergel	H ₂ O	6,9 mL
	Trenngelpuffer	5 mL
	AA / BAA Lsg. (37,5 : 1)	3 mL
	APS, 40 % ige Lsg.	12,5 mL
	TEMED	5 µL
Sammelgel	H ₂ O	10,3 mL
	Sammelgelpuffer	1,9 mL
	AA / BAA (37,5 : 1)	2,5 mL
	EDTA (0,2 M)	150 µL
	APS, 40 % ige Lsg.	37,5 µL
	TEMED	7,5 µL

Tabelle 28: Verwendete Lösungen für die High Resolution PAGE

Puffer	Chemikalie	Konzentration
Trenngelpuffer	Tris (Base)	3 M
	SDS	0,3 %
	Auf pH 8,9 einstellen (HCl)	
Sammelgelpuffer	Tris (Base)	1 M
	pH 6,8	
Kathodenpuffer 10x	Tris (Base)	1 M
	Tricin	1 M
	SDS	1 %
	Der Laufpuffer wurde vor der Verwendung 1:10 mit H ₂ O verdünnt	
Anodenpuffer 10x	Tris (Base)	2 M
	Auf pH 8,9 einstellen (HCl)	

4.5.3 Färbungen

Coomassie Färbung

Zur Coomassie-Färbung wurde das Gel 3-mal mit 20 ml H₂O gewaschen. Dazu wurde es jeweils 30 sec in der Mikrowelle erhitzt und dann 5 min unter Schütteln inkubiert. Auf das Gel wurde 20 ml CBB-Lösung gegeben, es wurde 10 sec in der Mikrowelle erhitzt und 15 min unter Schütteln inkubiert. Zum Entfärben des Hintergrunds wurde das Gel 10 min unter Schütteln in Wasser inkubiert.

Tabelle 29: Lösung für Coomassie Brilliant Blue Färbung

CBB-Lösung (Coomassie Brilliant Blue)	
Coomassie Brilliant Blue G-250	70 mg
konz. HCl	35 mM
H ₂ O	ad 1 L

Das Coomassie Brilliant Blue wurde vor Zugabe der konzentrierten HCl unter mehrstündigem Rühren in H₂O gelöst. Die Lösung wurde unter Lichtausschluss aufbewahrt.

Silberfärbung

Methode

- 1) Gel 30 min in Lösung I fixieren
- 2) 2 mal 10 min in Lösung II inkubieren
- 3) 1 min in Lösung III sensitivieren
- 4) 2 mal 1 min in H₂O waschen
- 5) 20 min in Lösung IV inkubieren
- 6) 2 mal 10 min mit H₂O waschen
- 7) mit Lösung V entwickeln
- 8) mit Lösung VI stoppen

Tabelle 30: Verwendete Lösungen für die Silberfärbung

Lösung	Chemikalie	Konzentration
Lösung I	Ethanol	30 % (v/v)
	Essigsäure	10 % (v/v)
Lösung II	Ethanol	20 % (v/v)
Lösung III	Na ₂ S ₂ O ₃ × 5 H ₂ O	0,2 g L ⁻¹
Lösung IV	AgNO ₃	2 g L ⁻¹
Lösung V	Na ₂ CO ₃	30 g L ⁻¹
	Formaldehyd (37 %)	0,25 mL L ⁻¹
	Na ₂ S ₂ O ₃ × 5 H ₂ O	12,5 mg L ⁻¹
Lösung VI	Tris (8 % (w/v))	50 %
	Essigsäure (4 % (v/v))	50 %

Die Lösungen III, IV und V wurden jeweils frisch hergestellt.

Geldokumentation

Die Molmassen wurden mit der VisionCapt Software von Vilber Lourmat (Eberhardzell, Deutschland) berechnet.

4.5.4 FPLC

Die "Fast Protein Liquid Chromatography" wurde für die Aufreinigung von *F. velutipes* Peptidasen verwendet.

Gerät: Biologic-Duo-Flow der Firma Bio-Rad

Detektion: Absorptionsmessung bei 280 nm

Fraktionssammler: Modell 2128 der Firma Bio-Rad

Datenaufnahme: Bio Duo Flow Workstation

Einen Überblick über die verwendeten Gelmatrices gibt Tabelle 31. Die Größe der Probenschleife, die Flussrate, Fraktionsgrößen und die gewählten Puffer und Methoden wurden entsprechend des jeweiligen Trennprinzips, Säulenvolumens und der Probenart gewählt (vereinfachte Übersicht in Tabelle 32). Genaue Angaben zu den einzelnen Läufen befinden sich im Anhang.

Tabelle 31: Verwendete chromatografische Matrices für die Aufreinigung von Peptidasen.

Säulenmatrix	Volumen	Trennprinzip
Phenyl Sepharose Fast Flow (high sub)	20 mL	Hydrophobe Interaktionschromatografie (HIC)
Phenyl Sepharose FF (high sub)	200 mL	HIC
Butyl Sepharose FF	1 mL	HIC
Octyl Sepharose FF	1 mL	HIC
Phenyl Sepharose FF (low sub)	1 mL	HIC
Polyamid für die Chromatografie	bis 300 mL	HIC
DEAE Sepharose FF	20 mL	Ionenaustauschchromatografie (IEX)
Q Sepharose FF	20 mL	IEX
SP Sepharose FF	20 mL	IEX
ANX Sepharose FF	1 mL	IEX
UNOsphere Q	2 mL	IEX
Superose 6 10/300 (Highly cross-linked agarose)	24 mL	Größenausschlusschromatografie (SEC)
Superdex 75 10/300 (Spherical composite of cross-linked agarose and dextran)	24 mL	SEC
Superdex 200 10/300 (Spherical composite of cross-linked agarose and dextran)	24 mL	SEC

Tabelle 32: Übersicht Methoden für verschiedene Säulenmatrices

Trennprinzip	Puffer	Programm	Auftagsvolumen [mL]	Fluss
HIC	A: Natriumphosphat, pH 7, 50 mM + 1 M Ammoniumsulfat B: Natriumphosphat, pH 7, 50 mM	Mit 100 % A spülen Linearer Gradient oder Stufengradient von A auf B Mit 100 % B spülen	0,2-150	1 – 2 mL min ⁻¹
IEX	Kationentauscher: A: Puffer mit pH 4 - 5, 50 mM B: Puffer mit pH 4 - 5, 50 mM + 1 M NaCl Anionentauscher A: Puffer mit pH 8 - 9, 50 mM B: Puffer mit pH 8 - 9, 50 mM + 1 M NaCl	Mit 100 % A spülen Linearer Gradient oder Stufengradient von A auf B Mit 100 % B spülen:	0,2- 4	1 – 3 mL min ⁻¹
SEC	Tris, pH 7,5, 250 mM	kein Gradient	0,2	0,2 – 0,5 mL min ⁻¹

4.6 Peptidaseinhibition

Tabelle 33: Verwendete Peptidaseinhibitoren

Inhibierte Peptidasegruppe	Inhibitor
Serinpeptidaseinhibitor	Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)
Serinpeptidaseinhibitor	4-(2-Aminoethyl)-benzensulfonylfluorid (AEBSF)
Serinpeptidaseinhibitor	Aprotinin
Serinpeptidaseinhibitor	Antipain
Metallopeptidasinhibitor	Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)
Aspartatpeptidaseinhibitor	Pepstatin
Cysteinpeptidaseinhibitor	Chymostatin

Peptidaseinhibition im Azocasein Assay

Die Inhibitoren wurden in geeigneter Endkonzentration (0,1 μM – 1 mM) zur Probe zugesetzt und 20 min bis zur Durchführung des Assays bei Raumtemperatur inkubiert. Die Inhibitoren EDTA und PMSF wurden zusätzlich in höheren Konzentrationen eingesetzt, um eine stärkere Inhibition zu erreichen.

Peptidaseinhibition in der Zymografie

1. Die Inhibitoren wurden in geeigneter Endkonzentration (0,1 μM – 1 mM) zur Probe zugesetzt und 20 min bis zur Durchführung des Assays bei Raumtemperatur stehen gelassen. Danach wurde nativer Probenpuffer hinzugegeben und die Proben auf das Zymografiegel aufgetragen.
2. Die Zymografie wurde ohne Inhibition durchgeführt. Ihre Zugabe erfolgte in geeigneter Endkonzentration (0,1 μM – 1 mM) nach dem Renaturierungsschritt zum Inkubationspuffer. Durch diese Vorgehensweise konnte ausgeschlossen werden, dass sich das Enzym bei einer reversiblen Hemmung nicht wieder regenerierte, falls der Inhibitor (z. B. EDTA) durch den Einfluss des elektrischen Feldes abgetrennt wurde.

Die Inhibitionsmethoden wurden auch kombiniert durchgeführt.

4.7 Terminologie der Spaltstellenspezifität

Die Spaltspezifität der Peptidasen wird basierend auf der Terminologie von [122] angegeben. Kristallografische Strukturen von Peptidasen zeigen, dass das aktive Zentrum normalerweise in einer Einkerbung zwischen strukturellen Domänen der Moleküloberfläche liegt. Die Substratspezifität ist daher durch die Eigenschaften der Bindungsstellen vor und nach dem katalytischen Zentrum, die in dieser Einkerbung liegen, abhängig.

Für die Beschreibung der Spaltstellenspezifität wird ein Modell herangezogen, bei dem die Seitenketten der Aminosäuren eines passenden Substrates an jeder Position vor und nach dem aktiven Zentrum passend angelegt werden können. Diese Bereiche werden ausgehend vom aktiven Zentrum her nummeriert, und zwar als S1, S2, S3... in Richtung des N-Terminus des Substrates und S1', S2', S3'... in Richtung des C-Terminus. Die entsprechenden Seitenketten des Substrates sind ebenso nummeriert als P1, P2, P3 und P1', P2', P3' usw:

Substrat: - P3 - P2 - P1 + P1' - P2' - P3' -

Enzym: - S3 - S2 - S1 * S1' - S2' - S3'-

Das aktive Zentrum ist dabei mit einem * markiert und die hydrolysierte Peptidbindung mit dem + Symbol [122].

4.8 Bestimmung der Substratspezifität mit RP-HPLC

Für verschiedene Substrate wurde mittels HPLC ein Substratabbau durch Peptidasekonzentrat oder aufgereinigte Peptidasen nachgewiesen. Die Methode wurde in Anlehnung an [123] entwickelt.

Alle Proben (Substrat + Enzym) wurden bei 40 °C über 2 h inkubiert, wobei für Substrate und Enzyme jeweils Blindproben (nur Enzym / nur Substrat) mitgeführt wurden. Danach wurden die Proben bei 13000 U / min für 5 min zentrifugiert und dann entweder sofort eingefroren oder direkt weiterverwendet. Von der 1:1 mit bidest. H₂O + 0,01 % TFA (Trifluoressigsäure) gemischten Probe wurden 20 µL eingespritzt. Es wurde eine Vydac 214TP C4 5u Säule (Grace, Illinois, USA) an einer Shimadzu SCL-10A Anlage mit einem Jasco UV-975 Detektor und einem Varian Autosampler Model 410 verwendet.

Die Absorption der Amidbindung wurde bei 225 nm vermessen. Da diese bei 192 nm maximal ist und bei 225 nm nur noch eine optische Dichte von ca. 15 % der OD bei 192 nm erreicht wird, wurden relativ hohe Konzentrationen der Substrate verwendet (Tabelle 34). Da das Casein vor der Hydrolyse ungelöst vorlag und diese unlöslichen Bestandteile der Proben vor dem Einspritzen durch Zentrifugation abgetrennt wurden, waren in einigen den Chromatogrammen (Blindwert) keine Peaks vorhanden. Es wurden Gradienten mit bidest. H₂O + 0,05 % TFA (v/v) (A) und 20 % bidest. H₂O + 80 % Acetonitril + 0,04 % TFA (v/v) (B) mit den Programmen aus Tabelle 35 und Tabelle 36 verwendet.

Tabelle 34: Konzentration Peptidasekonzentrate in HPLC.

Substrat	Endkonzentration in HPLC
Protamin	50 µg / µL
Angiotensin	20 µg / µL
Casein	30 µg / µL

Tabelle 35: Gradientenprogramm RP-HPLC 1 (für Nachweis von Protaminhydrolyse mit Peptidasekonzentrat).

Zeit	A [%]	B [%]
0	80	20
30	80	20
31	40	60
32	0	100
35	0	100
35	80	20
40	80	20

Tabelle 36: Gradientenprogramm für RP-HPLC 2 (für übrige Nachweise).

Zeit	A [%]	B [%]
0	90	10
30	90	10
31	40	60
32	0	100
35	0	100
35	90	10
40	90	10

4.9 Bestimmung der Schnittstellenspezifität mit Edman Abbau

Die N-terminalen Aminosäuren wurden mittels HPLC (Shimadzu SCL-10A) und UV-Vis Detektor (HP Series 1050) bestimmt. Hierzu wurden die Peptidasen mit dem Substrat für einen Zeitraum von 12 – 24 Stunden mit einem geeigneten Puffer inkubiert. Ergebnisse wurden mit dem Substrat Insulin b-chain (ox.) erzielt.

Durch die Hydrolyse des Substrates entstanden hierbei kleinere Peptidketten und/oder freie Aminosäuren. Nach Beendigung der Hydrolyse wurden die Proben unter Stickstoff oder in einer Speedvac getrocknet, dann mit 100 µL Edman Probenpuffer (Acetonitril:Pyridin:Triethylamin:bidest. Wasser im Verhältnis 10:5:2:3) versetzt, gemixt und wieder getrocknet. Im nächsten Schritt wurden wieder 100 µL Probenpuffer sowie 5 µL Phenolthioisocyanat (PITC) zur Probe pipettiert, nach 5 Minuten Reaktionszeit wurde die Probe erneut getrocknet. Nach der Zugabe von 75 µL Trifluoressigsäure (TFA) wurden die Proben erneut getrocknet und dann mit 50 – 250 µL 50 mM Ammoniumacetatpuffer versetzt und 20 µL dieser Lösung über

eine C18 Pyramidsäule (Macherey & Nagel) aufgetrennt. Die Absorption wurde bei 254 nm vermessen.

Es wurde ein Gradient mit Ammoniumacetat 50 mM (A) und Acetonitril (B) mit dem Programm aus Tabelle 37 verwendet.

Tabelle 37: Gradientenprogramm (linear) für die HPLC Analyse von PITC-Aminosäuren.

Zeit	A [%]	B [%]
0	100	0
15	92,5	7,5
30	75	25
35	0	100
40	100	0
45	100	0

Zu jeder Probe wurden während der Hydrolyse die jeweiligen Blindwerte für das verwendete Enzym sowie das Substrat mitgeführt. Die Kalibrierung erfolgte mittels PITC-Aminosäurederivaten, die jeweils einzeln derivatisiert und vermessen wurden.

4.10 Peptidsequenzierung

Zur Sequenzierung wurden Proteinbanden aus nativer oder denaturierender SDS-PAGE unter sterilen Bedingungen mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten, dreimal mit bidest. Wasser gewaschen und anschließend getrocknet. Nach tryptischem Verdau wurden die Proben für die Elektrospray-Massenspektrometrie (ESI-tandem MS²) vorbereitet. Für diese wurde ein Q ToF II-Massenspektrometer (Micromass) mit Nanospray-Ionenquelle und goldbeschichteten Kapillaren (Protona) verwendet. Zur kollisionsinduzierten Fragmentierung wurden mehrfach geladene Molekülionen vom Quadrupol-Analysator selektiv in die Kollisionszelle überführt. Mittels orthogonalem Flugzeit-(time of flight)-Analysator wurden die gebildeten Tochterionen getrennt und die aufgenommenen MS-MS-Spektren wurden nach Verstärkung zur Sequenzbestimmung der tryptischen Peptide verwendet. Die Sequenzabgleiche erfolgten mit dem Protein Basic Local Alignment Search Tool [54].

4.11 Allgemeine Geräte

Tabelle 38: Allgemeine Geräte

Gerät	Typ	Hersteller	Ort
Waage	SI-234	Denver Instruments	Denver, Colorado, USA
Wasseraufbereiter	GenPure UC-TOC/UF	TKA	Niederelbert
Zentrifuge	RT 7 plus	Sorvall	Waltham, Massachusetts, USA
Magnetrührer	MR 3001	Heidolph Instruments	Schwabach
Autoklav	Varioklav 75S	H+P Labortechnik	Oberschleißheim
pH-Meter	UB-5	Denver Instruments	Denver, Colorado, USA
Vakuumentrifuge	Speedvac	Thermo	Waltham, Massachusetts, USA
Ultraschallbad	Sonorex AK 100 H	Bandelin	Berlin
Sterilbank		Clean Air	Minneapolis, Minnesota, USA
Schüttler und Inkubationshaube	Certomat R und HK	Sartorius	Göttingen

4.12 Chemikalien für Proteinaufreinigung und Charakterisierung

Tabelle 39: Chemikalien für die Proteinaufreinigung und Charakterisierung

Chemikalie	Qualität	Hersteller	Ort
Acrylamid/Bisacrylamid Rotiphorese	Gel 40	Carl Roth	Karlsruhe
Ammoniumacetat	98 %	Riedel-de-Haen	Seelze
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	> 98 %	Carl Roth	Karlsruhe
Ammoniumsulfat	99,50 %	Merck	Darmstadt
Angiotensin II human	> 93 %	Sigma-Aldrich	St. Louis, Missouri, USA
Antipain-Dihydrochlorid		AppliChem	Darmstadt
Aprotinin aus Rinderlunge	80 %	Fluka	Buchs, Schweiz
Azo-Casein		Sigma-Aldrich	St. Louis, Missouri, USA
Borsäure	puriss	Fluka	Buchs, Schweiz
Bromphenolblau	f.d. Elektrophorese	Carl Roth	Karlsruhe
Casein	96 %	Carl Roth	Karlsruhe
Chymostatin	0,3 U ml ⁻¹	AppliChem	Darmstadt

Chemikalie	Qualität	Hersteller	Ort
Citronensäure-Monohydrat	99,5	Carl Roth	Karlsruhe
Coomassie Brilliant Blue G 250	pure	Serva	Heidelberg
Dc Protein Assay, Reagent A Bio-Rad Dc Protein Assay, Reagent B Bio-Rad		BioRad	München
Dimethylsulfoxid (DMSO)		Carl Roth	Karlsruhe
di-Natriumhydrogenphosphat Dihydrat	> 99 %	Carl Roth	Karlsruhe
Dithiothreitol (DTT)		Carl Roth	Karlsruhe
Ethylendiamintetraessigsäure Dinatriumsalz (EDTA, Titriplex III)	> 99 %	Merck	Darmstadt
Formaldehyd	37 % (w/v)	Sigma- Aldrich	St. Louis, Missouri, USA
Gelatine (aus Schweinehaut)		Fluka	Buchs, Schweiz
Glycin		Applichem	Darmstadt
Gly-Pro- <i>para</i> Nitroanilid Hydrochlorid		Sigma- Aldrich	St. Louis, Missouri, USA
Haemoglobin		Sigma- Aldrich	St. Louis, Missouri, USA
HEPES	> 99 %	Roth	Karlsruhe
Insulin Chain B Oxidized from bovine pancreas	> 99 %	Sigma- Aldrich	St. Louis, Missouri, USA
L-Alanin	99,50%	Fluka	Buchs, Schweiz
L-Arginin	> 99 %	Fluka	Buchs, Schweiz
L-Asparagin monohydrat		Merck	Darmstadt
L-Asparaginsäure	> 99 %	Sigma- Aldrich	St. Louis, Missouri, USA
L-Cystein	> 99,5 %	Fluka	Buchs, Schweiz
L-Glutamin	> 99,5 %	Sigma- Aldrich	St. Louis, Missouri, USA
L-Glutaminsäure Mononatriumsalz Monohydrat	> 98 %	Fluka	Buchs, Schweiz
L-Histidin	> 99 %	Carl Roth	Karlsruhe
L-Isoleucin	> 99 %	Carl Roth	Karlsruhe
L-Leucin	> 99 %	Fluka	Buchs, Schweiz
L-Leucine- <i>p</i> -Nitroanilid		Sigma- Aldrich	St. Louis, Missouri, USA
L-Lysin	> 99 %	Fluka	Buchs, Schweiz
L-Methionin	> 99 %	Fluka	Buchs, Schweiz
L-Phenylalanin		Sigma- Aldrich Aldrich	St. Louis, Missouri, USA
L-Prolin	> 99 %	Fluka	Buchs, Schweiz
L-Serin		Carl Roth	Karlsruhe
L-Threonin	> 99 %	Merck	Darmstadt
L-Tryptophan	> 99 %	Carl Roth	Karlsruhe

Chemikalie	Qualität	Hersteller	Ort
L-Tyrosin	> 99,5 %	Sigma-Aldrich	St. Louis, Missouri, USA
L-Valin	> 99 %	Fluka	Buchs, Schweiz
MES (2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure)		Carl Roth	Karlsruhe
Natriumacetat	> 99 %	Merck	Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	> 99 %	Carl Roth	Karlsruhe
N,N,N',N'-Tetramethyldiamin (TEMED)	f.d. Elektrophorese	Carl Roth	Karlsruhe
Natriumdihydrogenphosphat	p.a.	Fluka	Buchs, Schweiz
N-Succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe- <i>para</i> Nitroanilid (AAPF- <i>p</i> NA)		Sigma-Aldrich	St. Louis, Missouri, USA
N-Succinyl-Gly-Gly-Leu- <i>para</i> Nitroanilid (GGL- <i>p</i> NA)		Sigma-Aldrich	St. Louis, Missouri, USA
Pepstatin A		Applichem	Darmstadt
Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF)		Applichem	Darmstadt
Polyamid für die Chromatografie		MP Biomedicals	Solon, Ohio, USA
Precision Plus Protein Standard (All Blue)		BioRad	München
Protamin aus Lachs, Grade IV	neg. Millon Test	Sigma-Aldrich	St. Louis, Missouri, USA
Pyridin	p.a.	Fluka	Buchs, Schweiz
Rinderserumalbumin Fraktion 5 (BSA)	> 96 %	Sigma-Aldrich	St. Louis, Missouri, USA
Rotiphorese Gel 40		Carl Roth	Karlsruhe
Silbernitrat	p.a.	Carl Roth	Karlsruhe
Trichloressigsäure		Carl Roth	Karlsruhe
2-Hydroxy 1,1bis(hydroxymethyl)ethylglycin (Tricin)	> 99 %	Sigma-Aldrich	St. Louis, Missouri, USA
Trifluoressigsäure		Sigma-Aldrich	St. Louis, Missouri, USA
Trishydroxymethylaminomethan (Tris)	> 99 %	Carl Roth	Karlsruhe
Trimethylamin	purum	Fluka	Buchs, Schweiz
Tris Pufferan	> 99 %	Carl Roth	Karlsruhe
Triton X-100		Carl Roth	Karlsruhe

4.13 Lösungsmittel

Tabelle 40: Lösungsmittel

Chemikalie	Qualität	Hersteller	Ort
Acetonitril	HPLC	Acros	Geel, Belgium

4.14 Chemikalien für Nährmedien

Tabelle 41: Chemikalien für Nährmedien

Chemikalie	Qualität	Hersteller	Ort
Agarose Standard		Carl Roth	Karlsruhe
D-Glucose-Monohdrat	für die Mikrobiologie	Merck	Darmstadt
Eisen(III)chlorid-Hexahydrat	reinst	Riedel- deHaen	Seelze
Hefeextrakt	für die Mikrobiologie	Merck	Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	p.a.	Riedel-de- Haen	Seelze
Kupfer(II)sulfat-Pentahydrat	99 %	Fluka	Buchs, Schweiz
L-Asparagin-Monohydrat	für die Biochemie	Merck	Darmstadt
Magnesiumsulfat	rein	Riedel-de- Haen	Seelze
Mangan(II)sulfat-Hydrat	> 98 %	Fluka	Buchs, Schweiz
Titriplex III (EDTA)	> 99 %	Merck	Darmstadt
Zink(II)sulfat-Heptahydrat	> 99 %	Fluka	Buchs, Schweiz
Vital Weizenkleber (Gluten)		Roquette	Frankreich
pelletiertes Koji-Gluten		Nestle, PTC	Singen, Germany

4.15 Entsorgungshinweise

Biologisches Material

Pilzkulturen und Nährlösungen wurden vor der Entsorgung durch Autoklavieren (121 °C, 20 min) sterilisiert. Das sterilisierte Nährmedium und feste Bestandteile wurden als Laborabfall entsorgt.

Lösungsmittel und Chemikalien

Auf die Verwendung halogenerter Lösungsmittel wurde verzichtet. Nicht wieder verwendbare Lösungsmittelreste wurden getrennt nach folgenden Gruppen gesammelt:

- nichthalogenierte wassermischbare Lösungsmittel
- nichthalogenierte nicht wassermischbare Lösungsmittel

Trichloressigsäurehaltige Abfälle wurden getrennt gesammelt. Verwendete Lösungsmittel wurden ebenso wie andere Sonderabfälle des Labors der zentralen Entsorgung der Leibniz Universität Hannover zugeführt.

5 Anhang

5.1 Kultivierung von *F. velutipes* auf Glutenpellets

Die Entwicklung der besonderen Kultivierungsmethode orientierte sich stets an dem Ziel der Gewinnung von hohen Peptidaseaktivitäten. Dafür wurde eine Kultivierungsmethode entwickelt, bei der *F. velutipes* auf wassergesättigten Glutenpellets wuchs (Abbildung 65). Der Pilz benötigte ca. 8 – 10 Tage, um in das Substrat einzuwachsen und 13 – 18 Tage bis das Maximum an peptidolytischer Aktivität erreicht war. Nach 30 – 40 Tagen starb der Pilz schließlich ab, wie durch Versuche, bei denen in unterschiedlichen Zeitabständen neues Gluten zu bestehenden Kulturen gegeben wurde nachgewiesen wurde. Die Peptidasen wurden entweder durch Ernten und Waschen einer gesamten Kultur gewonnen, oder durch die Abnahme des sich ab der Idiophase bildenden Kulturunterstandes.

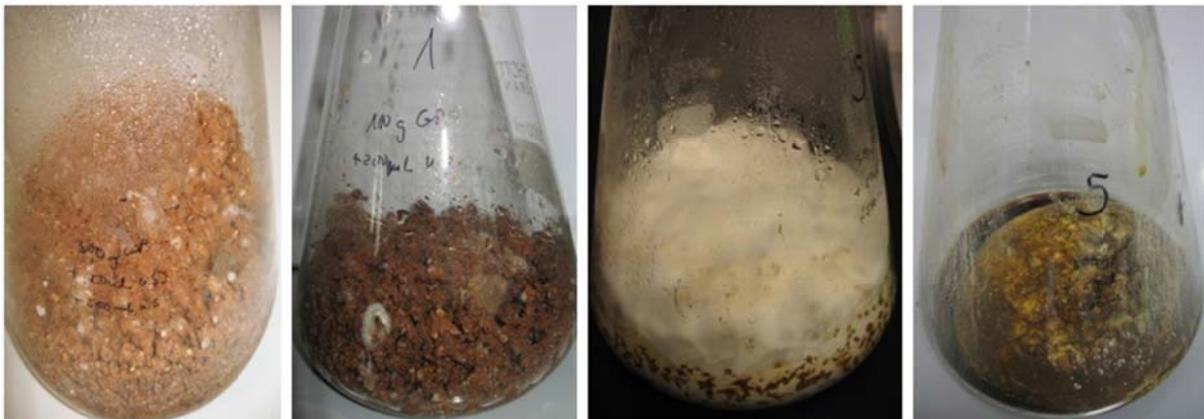


Abbildung 65: Kultivierung von *F. velutipes* auf Glutenpellets („Koji-Gluten“). Von links nach rechts: Frisch mit Mycel angeimpfte Glutenpellets, Kultur nach sieben Tagen (Trophophase), Kultur nach 16 Tagen (Idiophase) und 50 Tagen (Pilz ist abgestorben).

Zur Bestimmung des optimalen Verhältnisses von Substrat und Minimalmedium (Wasser, Spurenelemente) wurde *F. velutipes* zunächst auf Glutenpellets mit unterschiedlichem Feuchtegrad kultiviert. Die Ergebnisse zeigten, dass ein Verhältnis von ca. 1 : 1,5 optimal war.

Um dem Pilz kontinuierlich Flüssigkeit zugeben und abziehen zu können, wurde *F. velutipes* zusätzlich auch in Scheidetrichtern kultiviert (Abbildung 66). Bei dieser Art der Kultivierung zeigte sich, dass in der Trophophase das Mycel / Glutenpelletgemisch so dicht war, dass oben auf die Kultur gefülltes Wasser tagelang nicht durch die Kultur ablaufen konnte.



Abbildung 66: *F. velutipes* auf Glutenpellets in Scheidetrichterkultur.

5.2 Präparative Isoelektrische Fokussierung

Präp. IEF, bei der auch Fvp15 in der Zymografie sichtbar war.

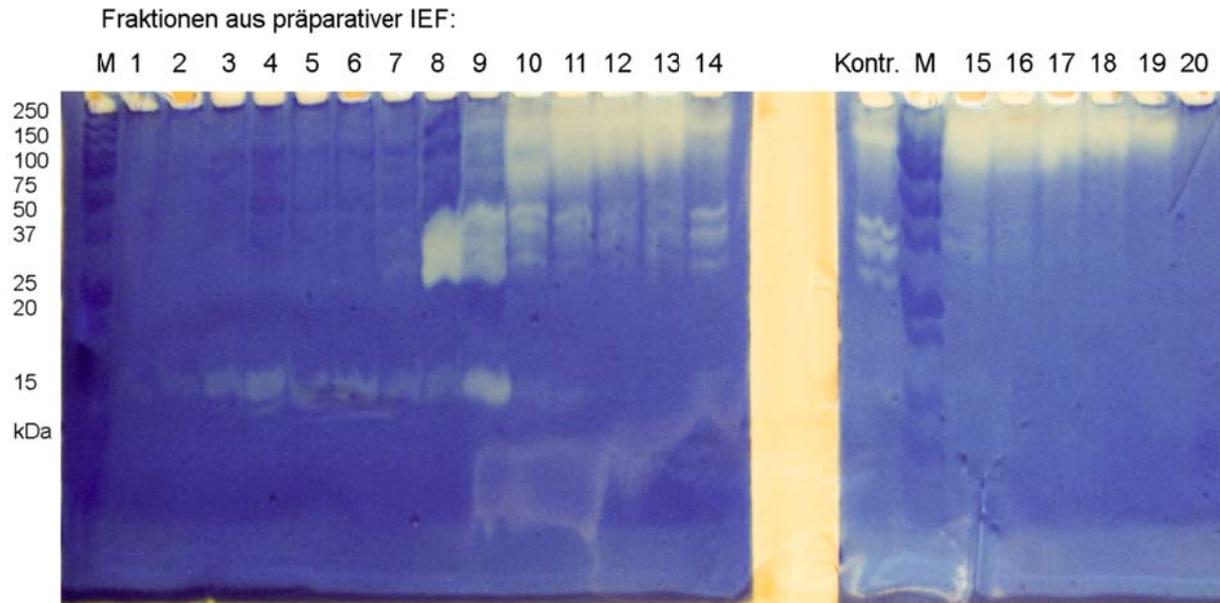


Abbildung 67: Zymografie zur Auswertung der präparativen IEF.

Tabelle 42: pH Werte der Fraktionen aus präp. IEF.

Fraktion Nr.	pH Wert der Fraktion
1	1,1
2	1,4
3	1,5
4	1,7
5	1,9
6	2,1
7	3
8	3,7
9	4,1
10	4,8
11	5,3
12	5,9
13	6,7
14	7,3
15	8
16	8,3
17	8,8
18	9,2
19	10,3
20	12,2

5.3 FPLC Chromatogramme

5.3.1 Hydrophobe Interaktionschromatografie (HIC)

Tabelle 43: HIC mit Phenyl Sepharose FF (high sub), Vorversuch zur Feststellung der Eignung von HIC zur Peptidaseaufreinigung.

FPLC 1	
Säulenmatrix	Phenyl Sepharose (high sub) FF, 1 mL
Trennprinzip	HIC
Probe	0,5 mL Koji-Kulturunterstand + 1,5 mL 2M Ammoniumsulfat
Puffer	A: Natriumphosphat, pH 7, 50 mM + 1 M Ammoniumsulfat B: Natriumphosphat, pH 7, 50 mM
Programm	1. Mit 100 % A spülen (22 mL) (Durchbruch) 2. Linearer Gradient A auf B (0 – 100 %, 20 mL) 3. Mit 100 % B spülen (4 mL) 4. Linearer Gradient von B auf A zurückspülen (10 mL) 5. Mit 100 % A spülen (4 mL)
Fluss	1 mL min ⁻¹

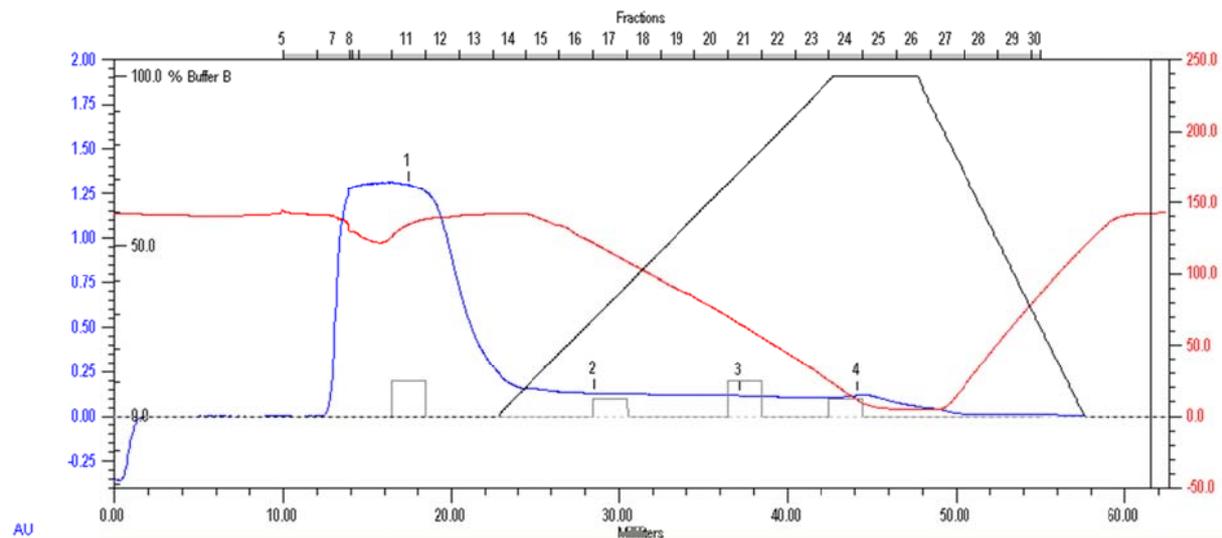


Abbildung 68: Chromatogramm zu FPLC 1.

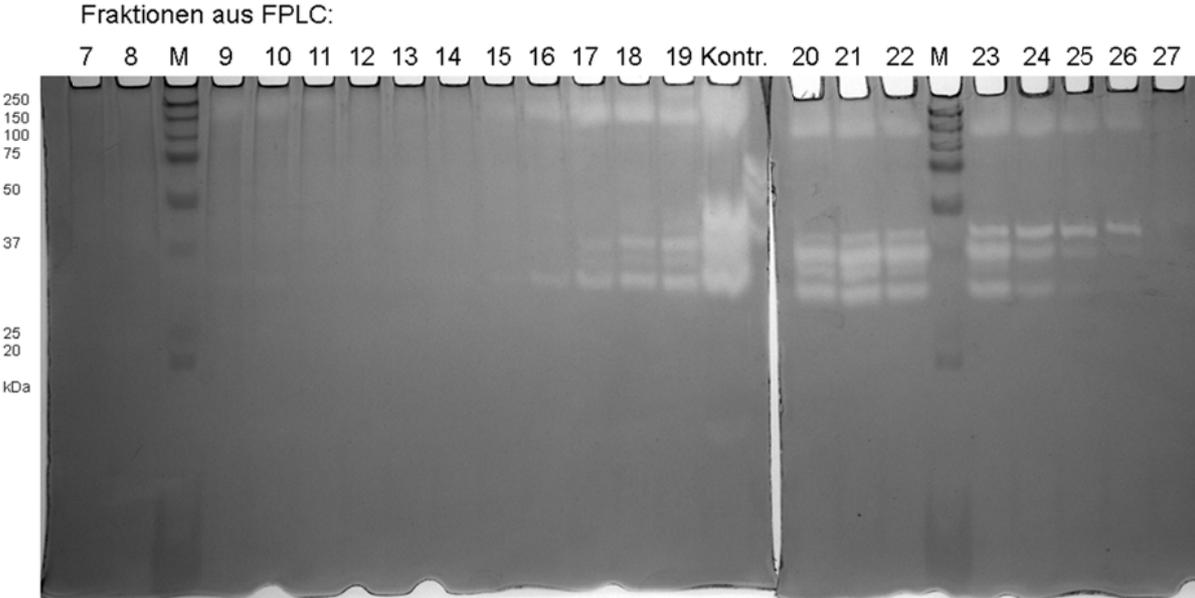


Abbildung 69: Zymografie zur Auswertung von FPLC 1.

Tabelle 44: HIC mit Butyl Sepharose, Versuch zur Aufreinigung einzelner Peptidasen mit Stufengradient.

FPLC 2	
Säulenmatrix	Butyl Sepharose FF, 1 mL
Trennprinzip	HIC
Probe	0,5 mL Koji-Kulturunterstand + 2 mL 2M Ammoniumsulfat
Puffer	A: Natriumphosphat, pH 7, 50 mM + 1 M Ammoniumsulfat B: Natriumphosphat, pH 7, 50 mM
Programm	1. Mit 100 % A spülen (23 mL) 2. Stufengradient von A auf B (10 mL) 3. Mit 100 % B spülen (10 mL)
Fluss	1 mL min ⁻¹

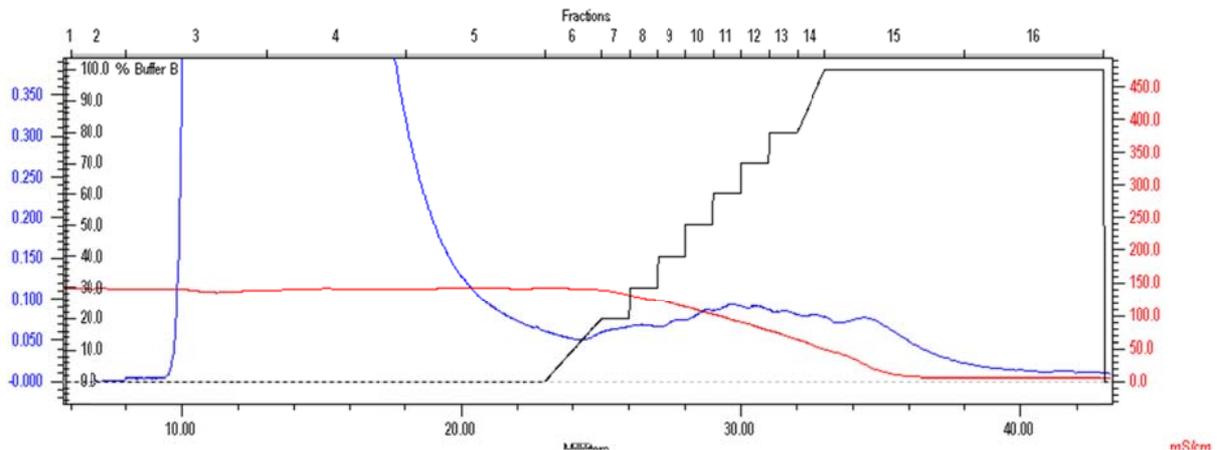


Abbildung 70: Chromatogramm zu FPLC 2.

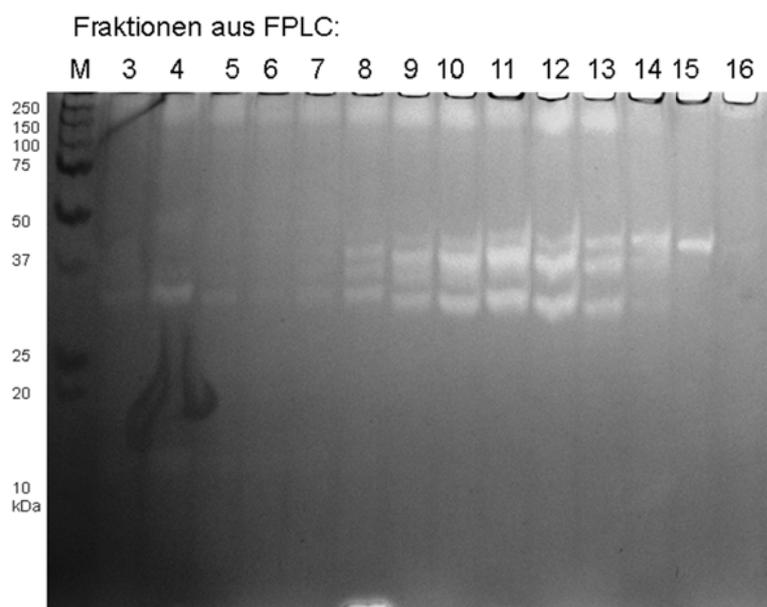


Abbildung 71: Zymografie zur Auswertung von FPLC 2.

Tabelle 45: HIC mit Butyl Sepharose, Versuch zur Aufreinigung einzelner Peptidasen mit Stufengradient.

FPLC 3	
Säulenmatrix	Butyl Sepharose FF, 1 mL
Trennprinzip	HIC
Probe	0,5 mL Koji-Kulturunterstand + 2 mL 2M Ammoniumsulfat
Puffer	A: Natriumphosphat, pH 7, 50 mM + 1 M Ammoniumsulfat B: Natriumphosphat, pH 7, 50 mM
Programm	1. Mit 100 % A spülen (45 mL) 2. Stufengradient von A auf B (40 mL) 3. Mit 100 % B spülen (20 mL)
Fluss	1 mL min ⁻¹

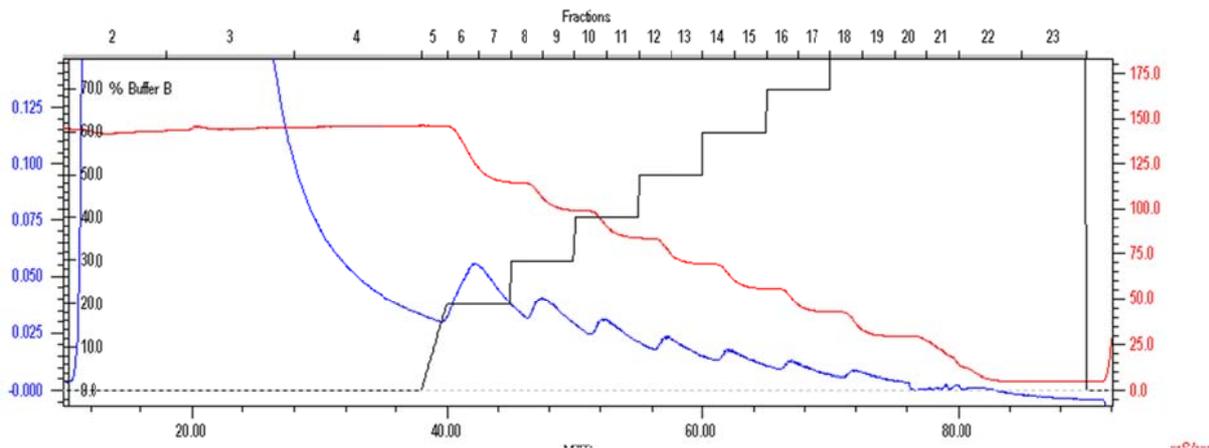


Abbildung 72: Chromatogramm zu FPLC 3.

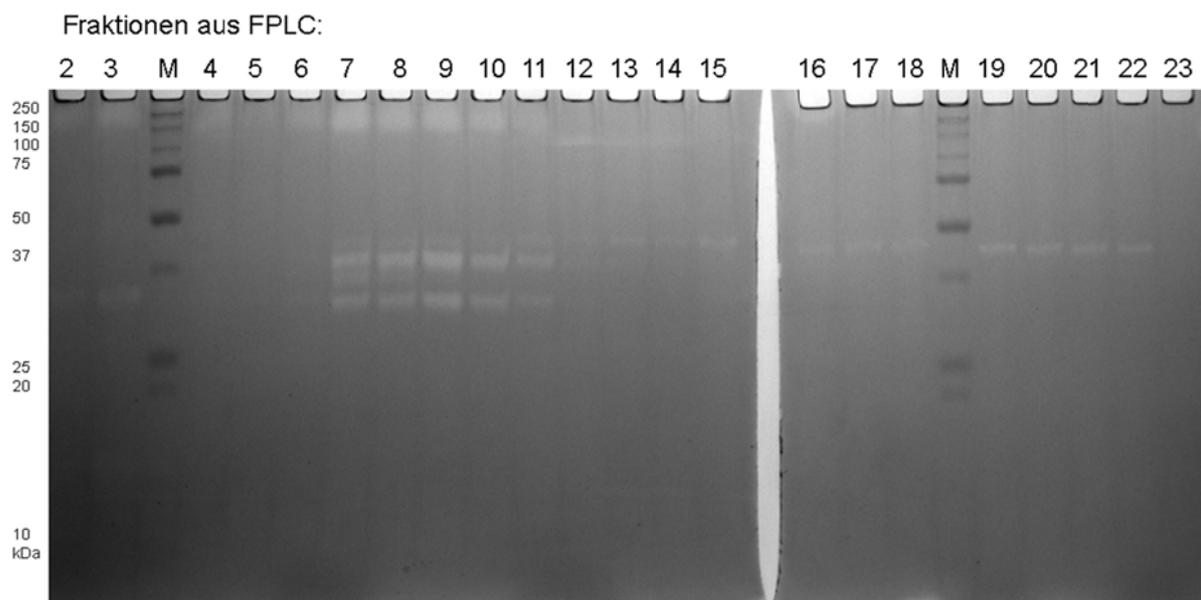


Abbildung 73: Zymografie zur Auswertung von FPLC 3.

Tabelle 46: HIC mit Butyl Sepharose, Versuch zur Abtrennung der Peptidasen vom Kulturunterstand.

FPLC 4	
Säulenmatrix	Butyl Sepharose FF, 1 mL
Trennprinzip	HIC
Probe	0,5 mL Koji-Kulturunterstand + 0,5 mL 2M Ammoniumsulfat
Puffer	A: Natriumphosphat, pH 7, 50 mM + 1 M Ammoniumsulfat B: Natriumphosphat, pH 7, 50 mM
Programm	1. Mit 100 % A spülen (52 mL) 2. kein Gradient A auf B 3. Mit 100 % B spülen (20 mL)
Fluss	1 mL min ⁻¹

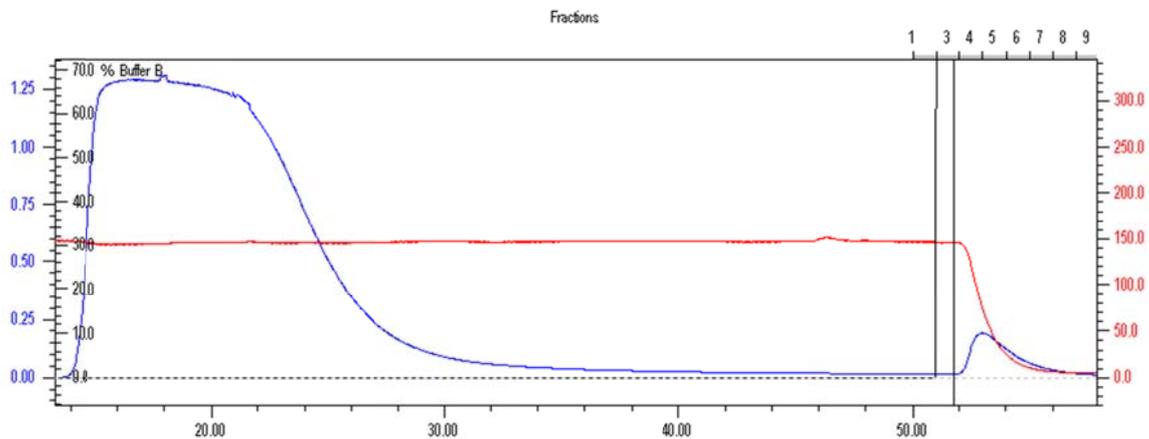


Abbildung 74: Chromatogramm zu FPLC 4.

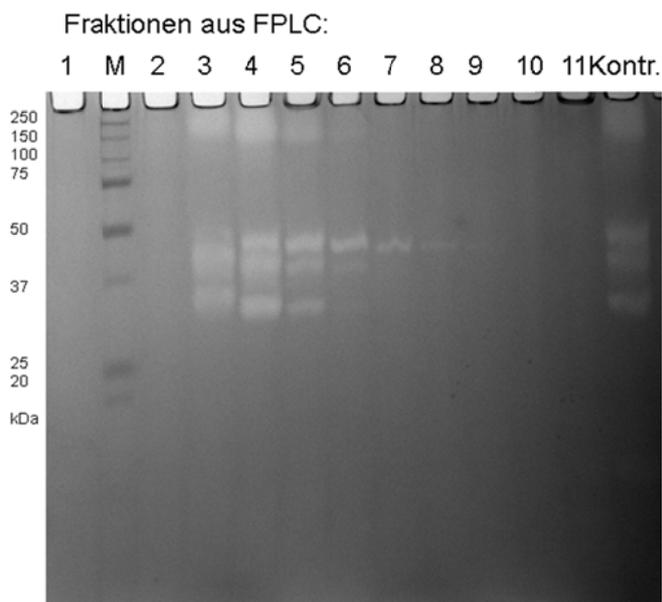


Abbildung 75: Zymografie zur Auswertung von FPLC 4.

Tabelle 47: HIC mit Phenyl Sepharose (low sub) FF zur Aufreinigung einzelner Peptidasen durch Elution mit Stufengradient.

FPLC 5	
Säulenmatrix	Phenyl Sepharose (low sub) FF, 1 mL
Trennprinzip	HIC
Probe	0,5 mL Koji-Kulturunterstand + 2 mL 2M Ammoniumsulfat
Puffer	A: Natriumphosphat, pH 7, 50 mM + 1 M Ammoniumsulfat B: Natriumphosphat, pH 7, 50 mM
Programm	1. Mit 100 % A spülen (22 mL) 2. Stufengradient A auf B (10 mL) 3. Mit 100 % B spülen (10 mL)
Fluss	1 mL min ⁻¹

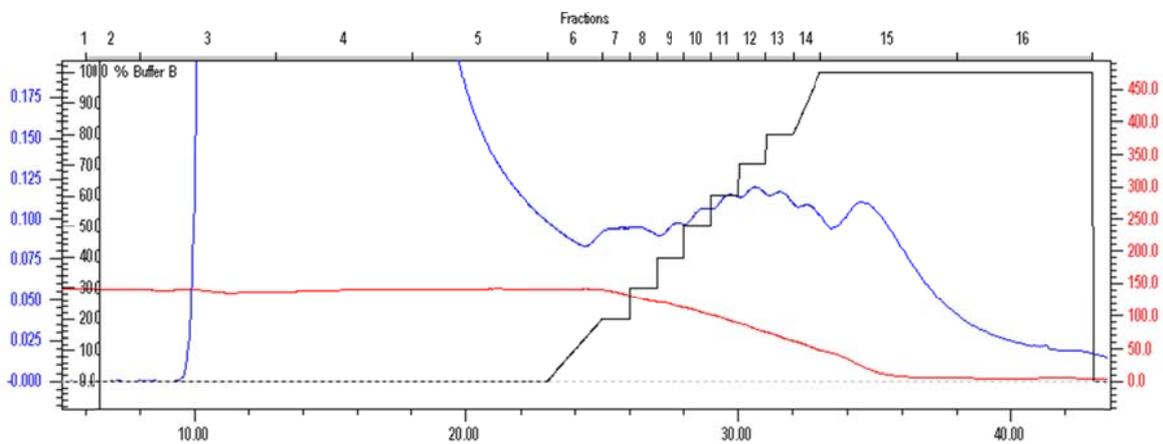


Abbildung 76: Chromatogramm zu FPLC 5.

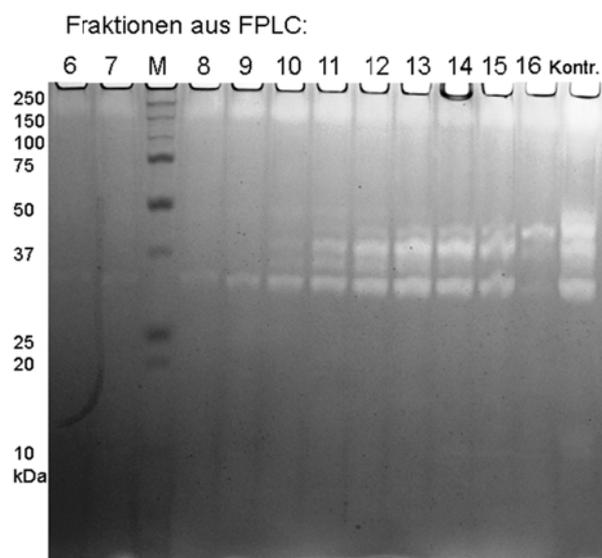


Abbildung 77: Zymografie zur Auswertung von FPLC 5.

Tabelle 48: HIC mit Phenyl Sepharose (low sub) FF zur Aufreinigung einzelner Peptidasen durch Elution mit Stufengradient.

FPLC 6	
Säulenmatrix	Phenyl Sepharose (low sub) FF, 1 mL
Trennprinzip	HIC
Probe	0,5 mL Koji-Kulturunterstand + 2 mL 2M Ammoniumsulfat
Puffer	A: Natriumphosphat, pH 7, 50 mM + 1 M Ammoniumsulfat B: Natriumphosphat, pH 7, 50 mM
Programm	1. Mit 100 % A spülen (38 mL) 2. Stufengradient A auf B (40 mL) 3. Mit 100 % B spülen (10 mL)
Fluss	1 mL min ⁻¹

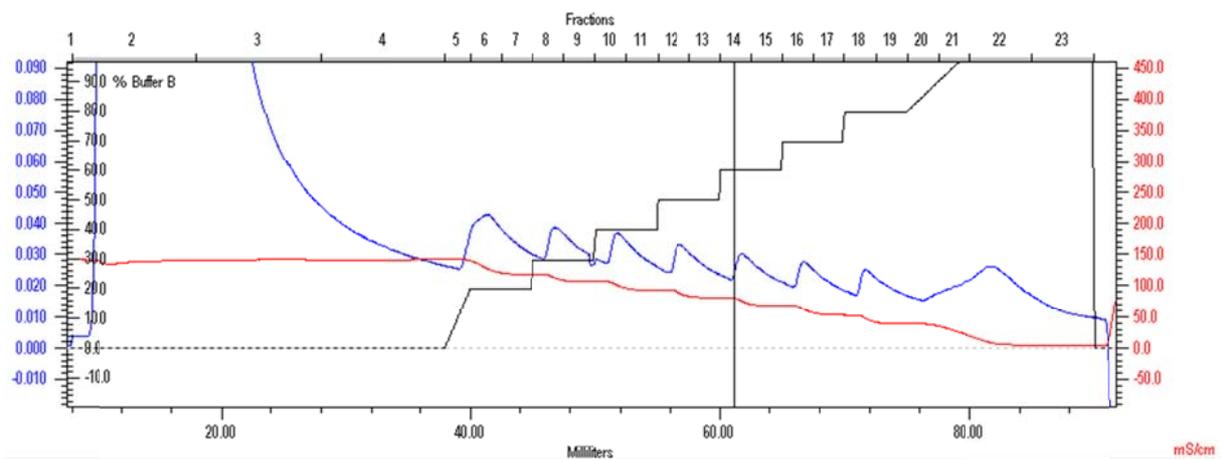


Abbildung 78: Chromatogramm zu FPLC 6.

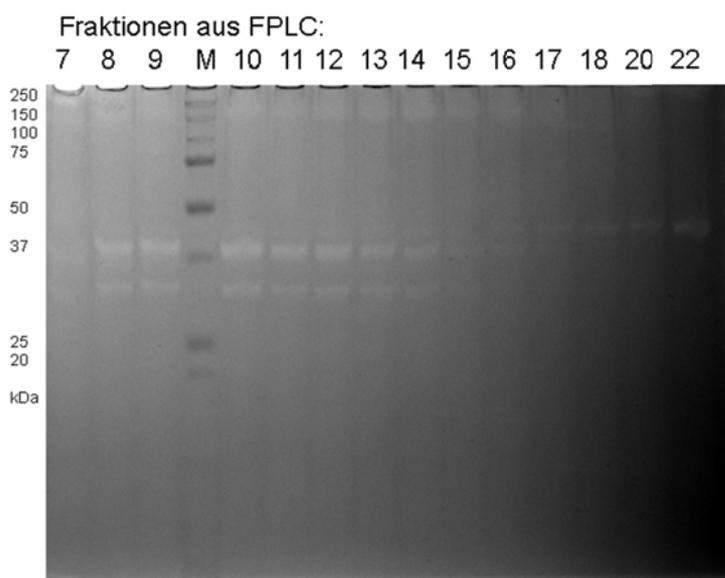


Abbildung 79: Zymografie zur Auswertung von FPLC 6.

Tabelle 49: HIC mit Octyl Sepharose FF, 2 Versuche zur Aufreinigung einzelner Peptidasen mit Stufengradient.

FPLC 7	
Säulenmatrix	Octyl Sepharose FF, 1 mL
Trennprinzip	HIC
Probe	0,5 mL Koji-Kulturunterstand + 2 mL mL 2M Ammoniumsulfat
Puffer	A: Natriumphosphat, pH 7, 50 mM + 1 M Ammoniumsulfat B: Natriumphosphat, pH 7, 50 mM
Programm	1. Mit 100 % A spülen (25 mL) 2. Stufengradient A auf B (10 mL) 3. Mit 100 % B spülen (10 mL)
Fluss	1 mL min ⁻¹

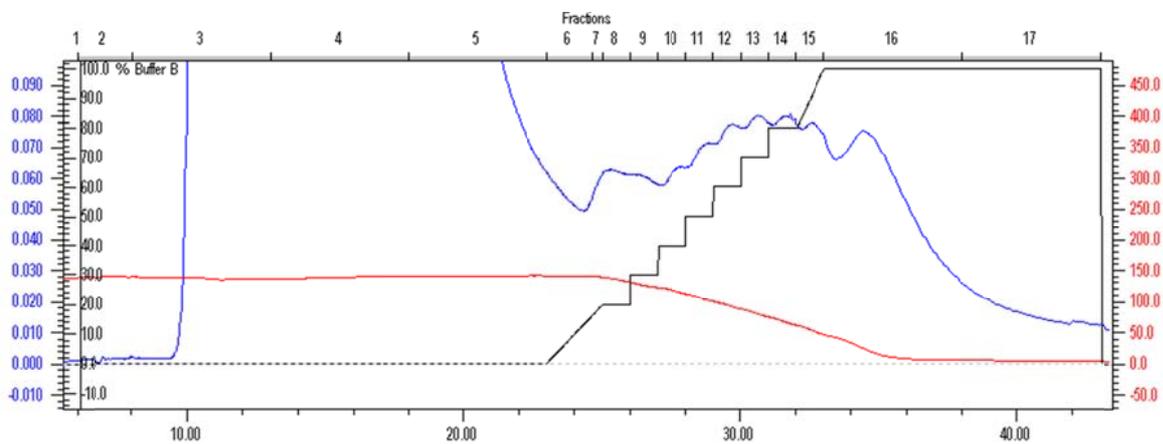


Abbildung 80: Chromatogramm zu FPLC 7.

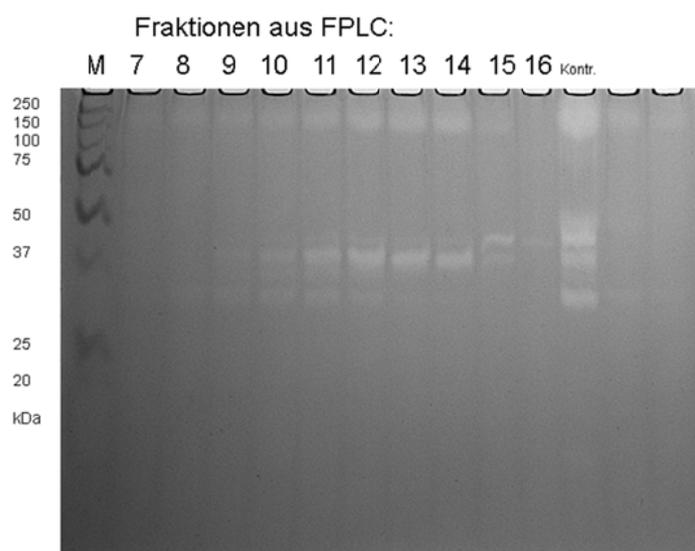


Abbildung 81. Zymografie zur Auswertung von FPLC 7.

Tabelle 50: HIC mit Octyl Sepharose FF, 2 Versuche zur Aufreinigung einzelner Peptidasen mit Stufengradient.

FPLC 8	
Säulenmatrix	Octyl Sepharose FF, 1 mL
Trennprinzip	HIC
Probe	0,5 mL Koji-Kulturunterstand + 2 mL mL 2M Ammoniumsulfat
Puffer	A: Natriumphosphat, pH 7, 50 mM + 1 M Ammoniumsulfat B: Natriumphosphat, pH 7, 50 mM
Programm	1. Mit 100 % A spülen (17 mL) 2. Stufengradient A auf B (10 mL) 3. Mit 100 % B spülen (15 mL)
Fluss	1 mL min ⁻¹

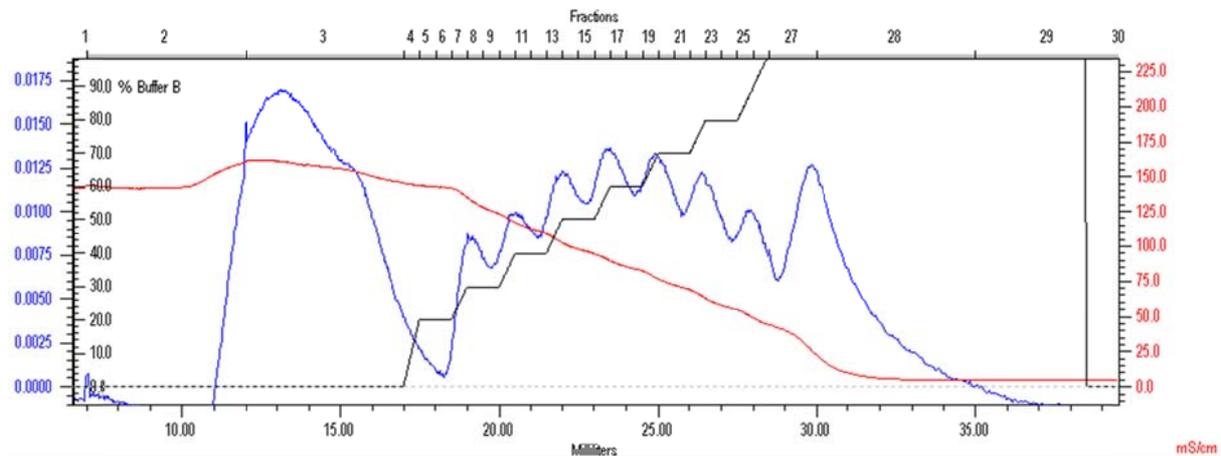


Abbildung 82: Chromatogramm zu FPLC 8

Fraktionen aus FPLC:

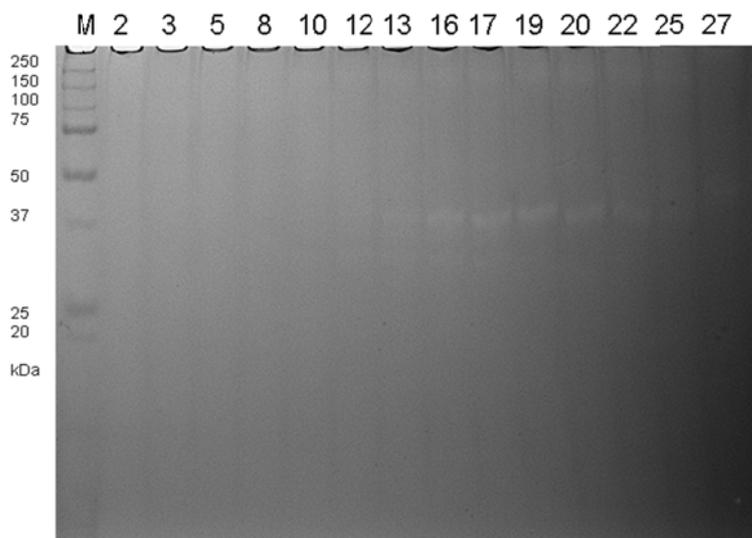


Abbildung 83: Zymografie zur Auswertung von FPLC 8.

Tabelle 51: HIC mit Phenyl Sepharose FF (high sub), Versuch zur Aufreinigung der Peptidasen vom Kulturunterstand.

FPLC 9	
Säulenmatrix	Phenyl Sepharose (high sub) FF, 20 mL
Trennprinzip	HIC
Probe	5 mL Koji-Kulturunterstand + 5 mL 2M Ammoniumsulfat
Puffer	A: Natriumphosphat, pH 7, 50 mM + 1 M Ammoniumsulfat B: Natriumphosphat, pH 7, 50 mM
Programm	1. Mit 100 % A spülen (150 mL) 2. kein Gradient A auf B 3. Mit 100 % B spülen (30 mL)
Fluss	1 mL min ⁻¹

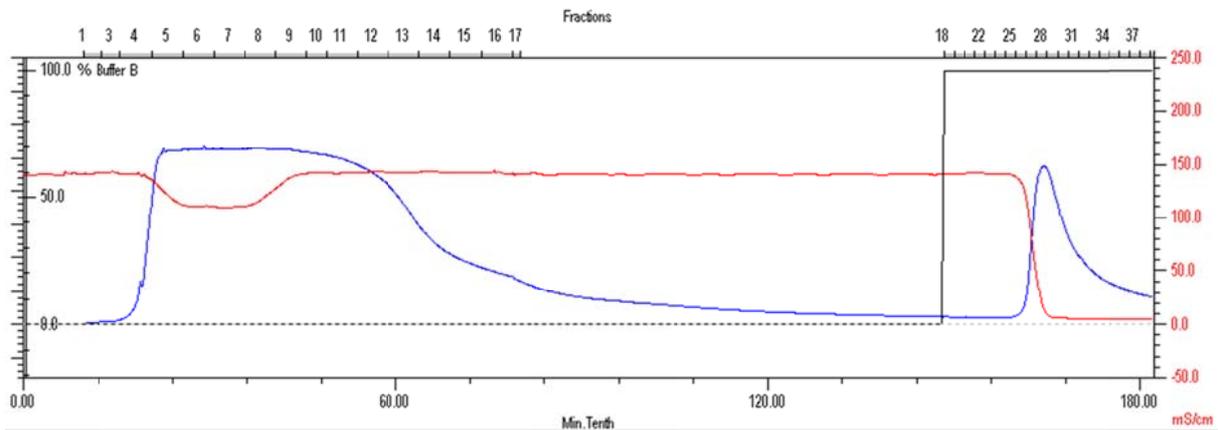


Abbildung 84: Chromatogramm zu FPLC 9.

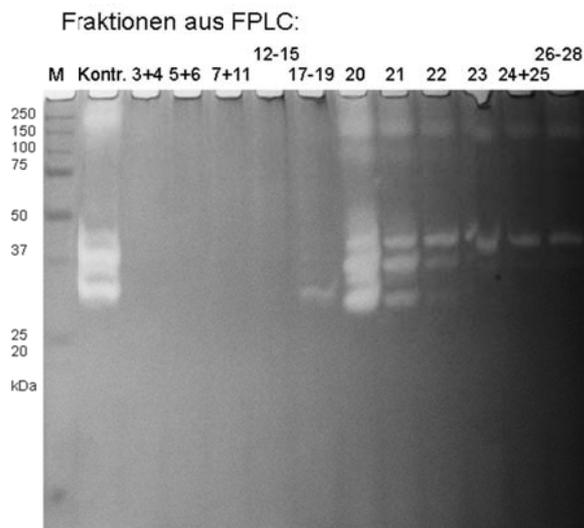


Abbildung 85: Zymografie zur Auswertung von FPLC 9.

Tabelle 52: HIC mit Phenyl Sepharose FF (high sub), Aufreinigung der Peptidasen vom Kulturunterstand im präparativen Maßstab..

FPLC 10	Präparative HIC
Säulenmatrix	Phenyl Sepharose (high sub) FF, 200 mL
Trennprinzip	HIC
Probe	150 mL Koji-Kulturunterstand + 150 mL 2M Ammoniumsulfat
Puffer	A: Natriumphosphat, pH 7, 50 mM + 1 M Ammoniumsulfat B: Natriumphosphat, pH 7, 50 mM
Programm	1. Mit 100 % A spülen (700 mL) 2. kein Gradient A auf B 3. Mit 100 % B spülen (500 mL)
Fluss	4 mL min ⁻¹

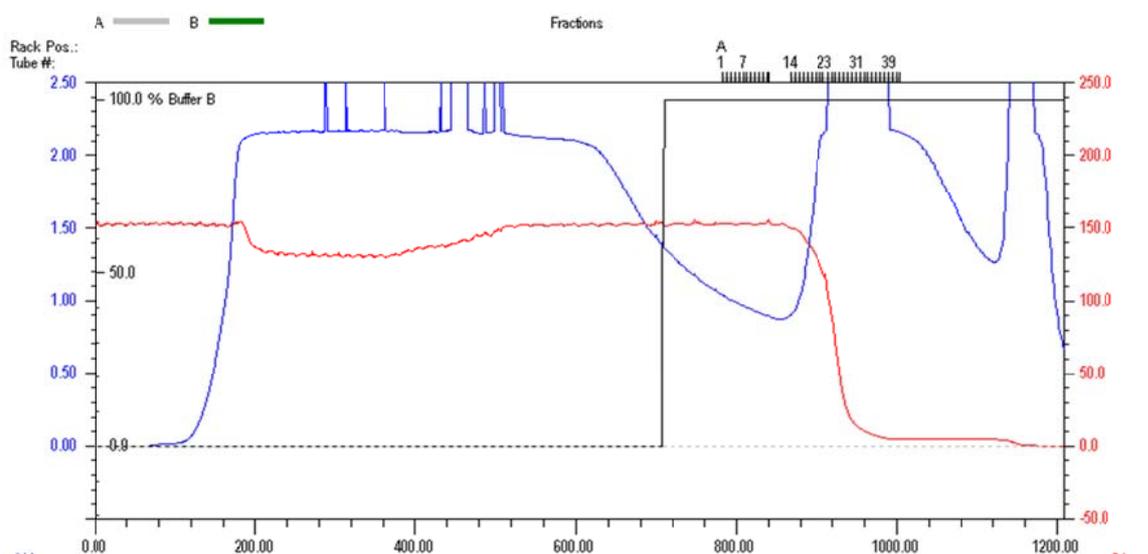


Abbildung 86: Chromatogramm zu FPLC 10.

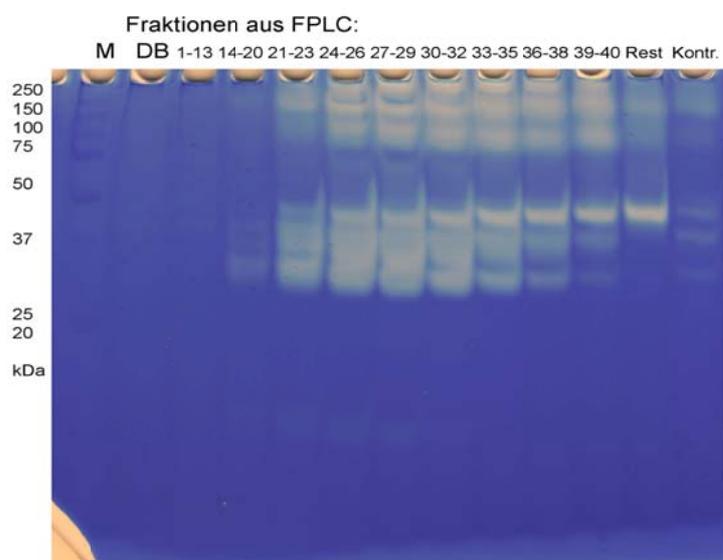


Abbildung 87: Zymografie zur Auswertung von FPLC 10.

5.3.2 Größenausschlusschromatografie (SEC)

Tabelle 53: SEC mit Superdex 75, Versuch zur Aufreinigung einzelner Peptidasen.

FPLC 11	
Säulenmatrix	Superdex 75
Trennprinzip	SEC
Probe	0,2 mL Koji-Kulturunterstand
Puffer	Tris, pH 7,5, 250 mM
Programm	Linearer Fluss, 120 min
Fluss	0,5 ml min ⁻¹

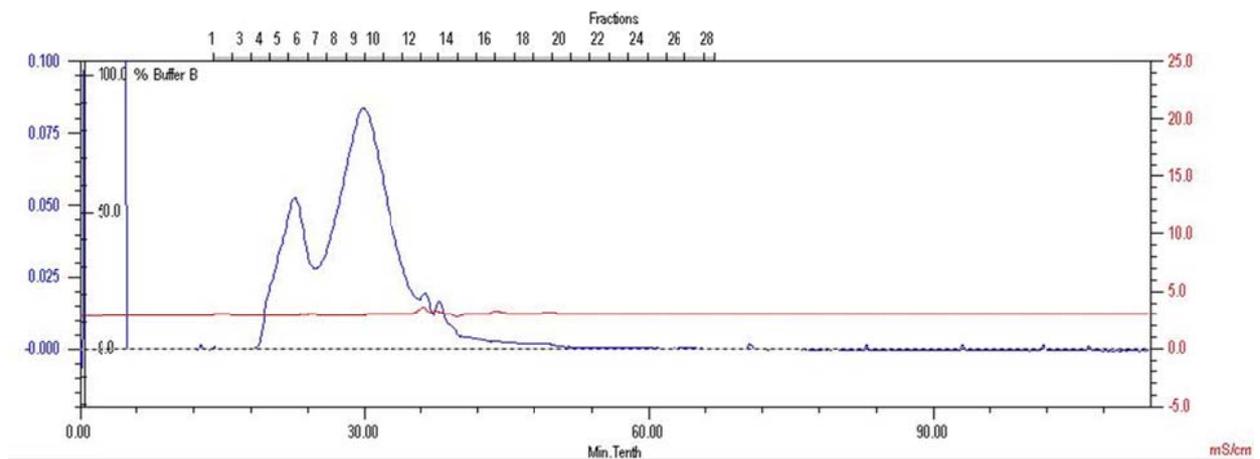


Abbildung 88: Chromatogramm zu FPLC 11.

Fraktionen aus FPLC:

Kontr. 3-5 6 7 8 9-11 12-14

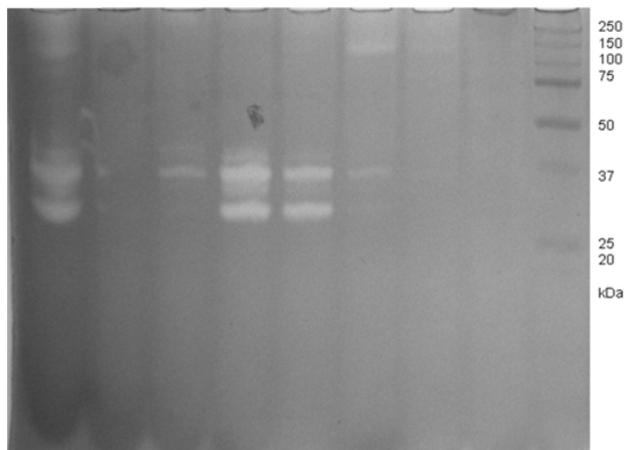


Abbildung 89: Zymografie zur Auswertung von FPLC 11.

Tabelle 54: SEC mit Superdex 75, Versuch zur Aufreinigung einzelner Peptidasen.

FPLC 12	
Säulenmatrix	Superdex 200, ca. 24 mL
Trennprinzip	SEC
Probe	0,2 mL Peptidasekonzentrat
Puffer	Tris, pH 7,5, 250 mM
Programm	Linearer Fluss,
Fluss	0,2 ml min ⁻¹

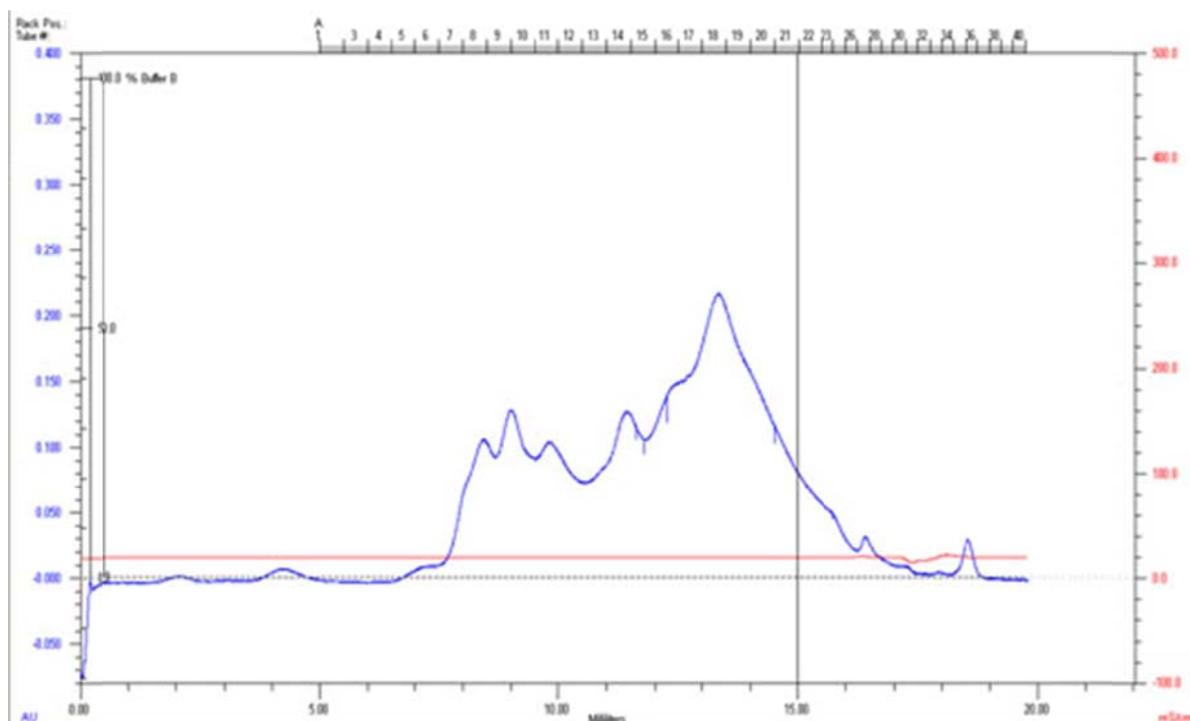


Abbildung 90: Chromatogramm zu FPLC 12.

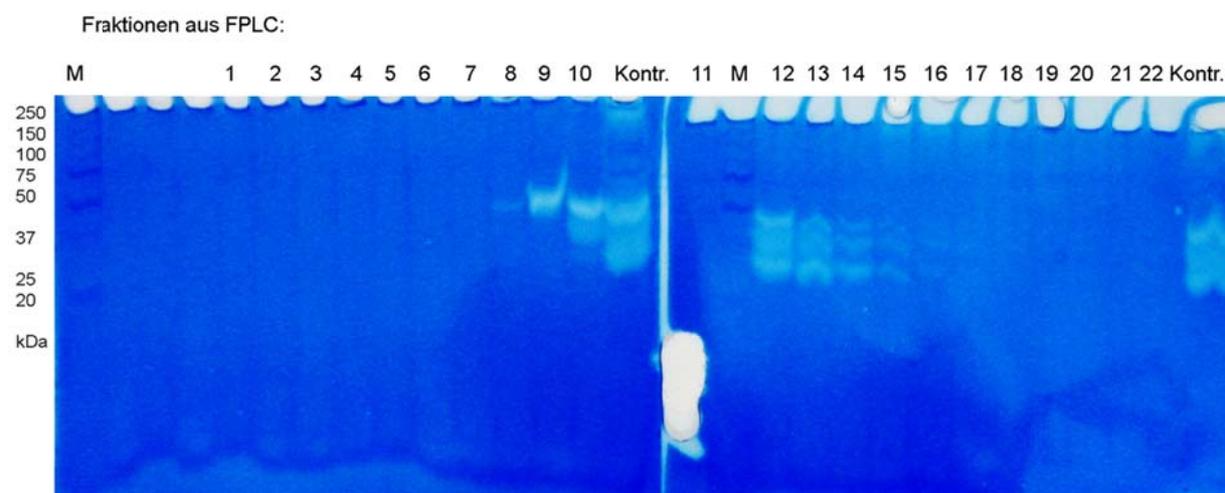


Abbildung 91: Zymografie zur Auswertung von FPLC 12.

Tabelle 55: SEC mit Superose 6 zur Aufreinigung einzelner Peptidasen.

FPLC 13	
Säulenmatrix	Superose 6, ca. 24 mL
Trennprinzip	SEC
Probe	0,2 mL Koji-Kulturunterstand
Puffer	Tris, pH 7,5, 250 mM
Programm	Linearer Fluss,
Fluss	0,2 ml min ⁻¹

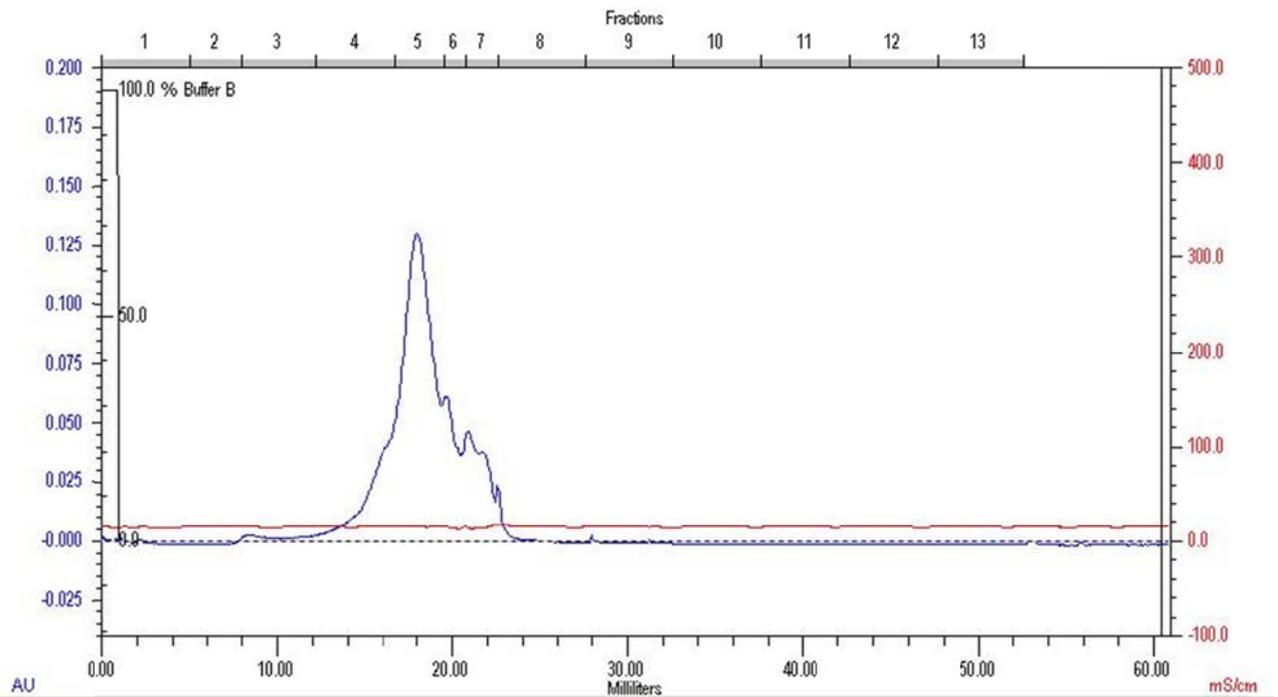


Abbildung 92: Chromatogramm zu FPLC 13.

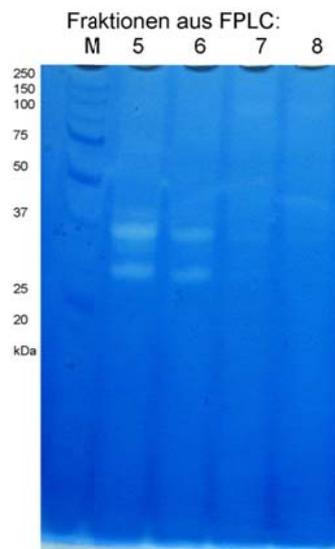


Abbildung 93: Zymografie zur Auswertung von FPLC 13.

5.3.3 Inenaustauschchromatografie (IEX)

Tabelle 56: IEX mit SP Sepharose zur Aufreinigung einzelner Peptidasen mit linearem Gradient.

FPLC 14	
Säulenmatrix	SP Sepharose FF, 20 mL
Trennprinzip	IEX
Probe	0,2 mL Peptidasekonzentrat, auf entsprechenden pH Wert eingestellt
Puffer	A: Tris-HCl, pH 4,0, 200 mM B: Tris-HCl, pH 4,0, 200 mM + 1 M NaCl
Programm	1. Mit 100 % A spülen (30 mL) 2. Stufengradient A auf B (20 mL) 3. Mit 100 % B spülen (30 mL) 4. Mit 100 % A spülen (20 mL)
Fluss	2 mL min ⁻¹

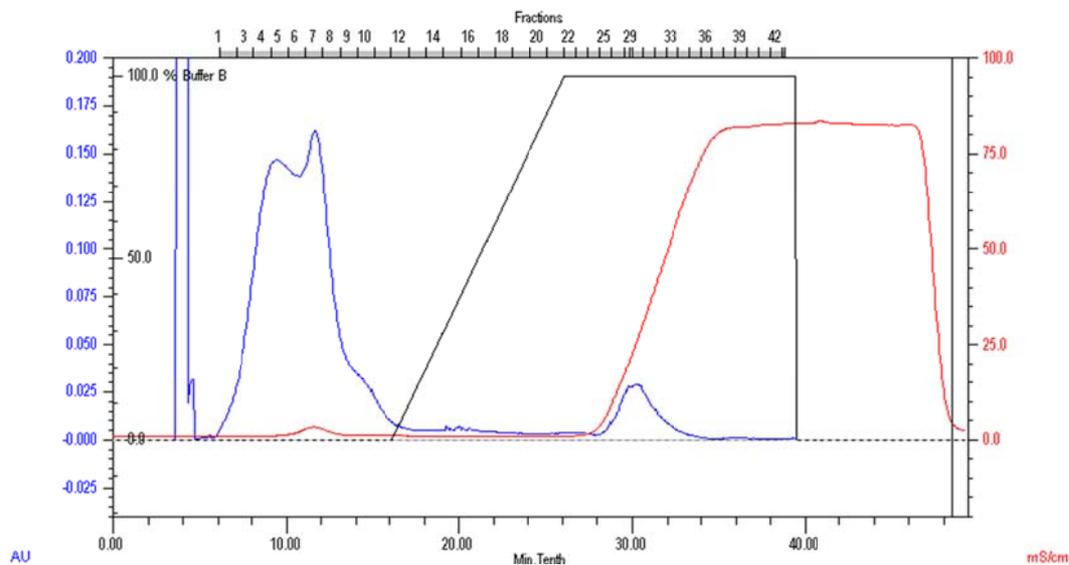


Abbildung 94: Chromatogramm zu FPLC 14.

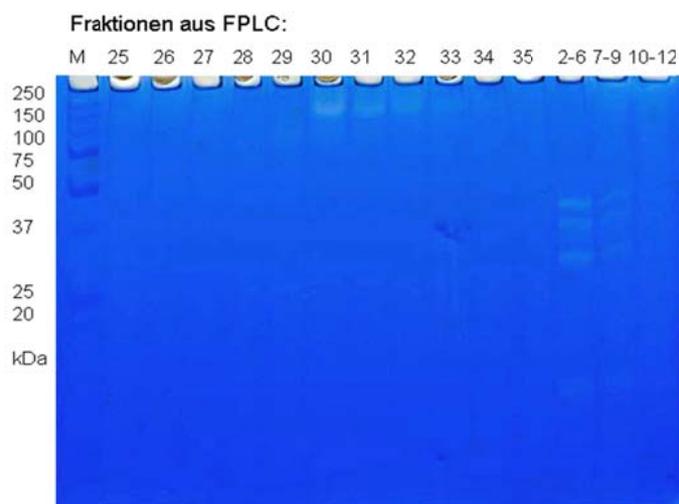


Abbildung 95: Zymografie zur Auswertung von FPLC 14.

Tabelle 57: IEX mit SP Sepharose zur Aufreinigung einzelner Peptidasen.

FPLC 15	
Säulenmatrix	SP Sepharose FF, 20 mL
Trennprinzip	IEX
Probe	0,2 mL Peptidasekonzentrat, auf entsprechenden pH Wert eingestellt
Puffer	A: Tris-HCl, pH 5,0, 200 mM B: Tris-HCl, pH 5,0, 200 mM + 1 M NaCl
Programm	1. Mit 100 % A spülen (15 mL) 2. Stufengradient und linearer Gradient im Wechsel A auf B (20 mL) 3. Mit 100 % B spülen (10 mL)
Fluss	2 mL min ⁻¹

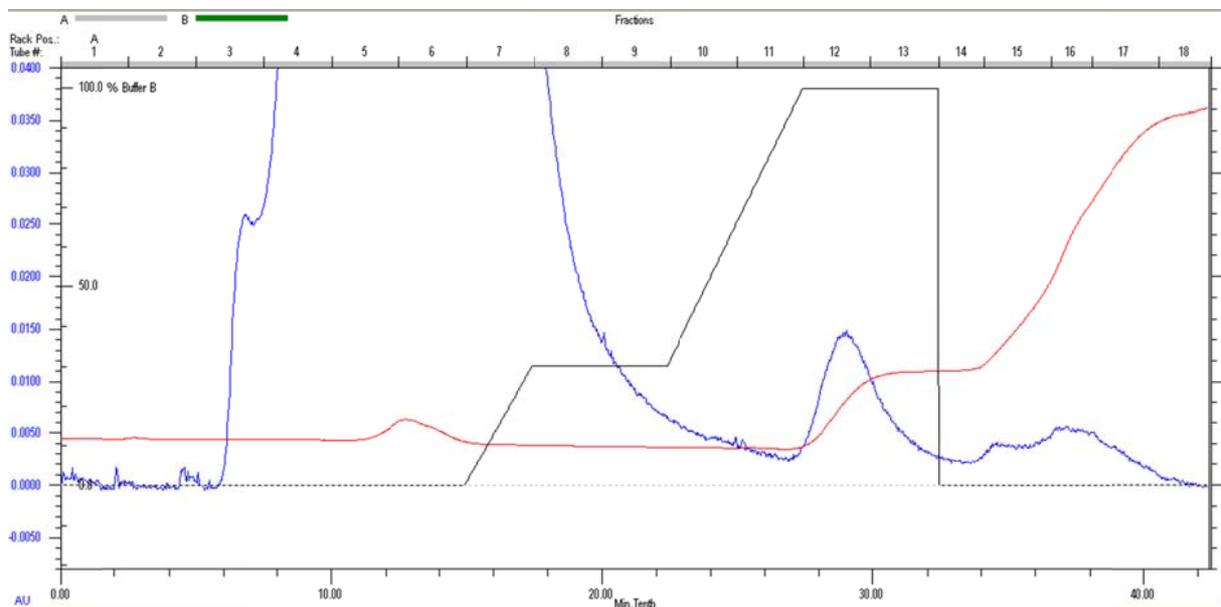


Abbildung 96: Chromatogramm zu FPLC 15.

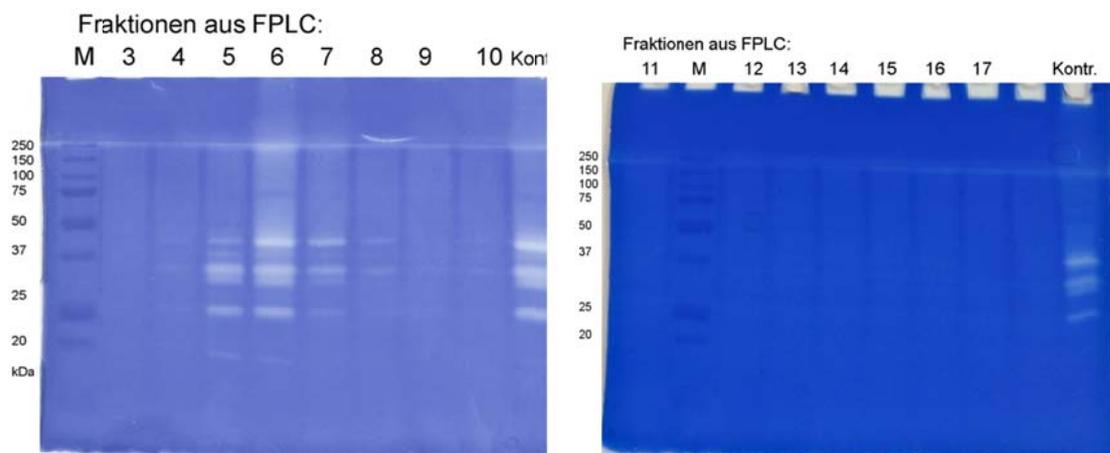


Abbildung 97: Zymografie zur Auswertung von FPLC 15.

Tabelle 58: IEX mit Q Sepharose zur Aufreinigung einzelner Peptidasen.

FPLC 16	
Säulenmatrix	Q Sepharose, 20 mL
Trennprinzip	IEX
Probe	0,5 mL Peptidasekonzentrat, auf entsprechenden pH Wert eingestellt
Puffer	A: Tris, pH 8,0, 50 mM B: Tris, pH 8,0, 50 mM + 1 M NaCl
Programm	1. Mit 100 % A spülen (80 mL) 2. Linearer Gradient A auf B (50 mL) 3. Mit 100 % B spülen (20 mL) 4. Mit 100 % A spülen (40 mL)
Fluss	2 mL min ⁻¹

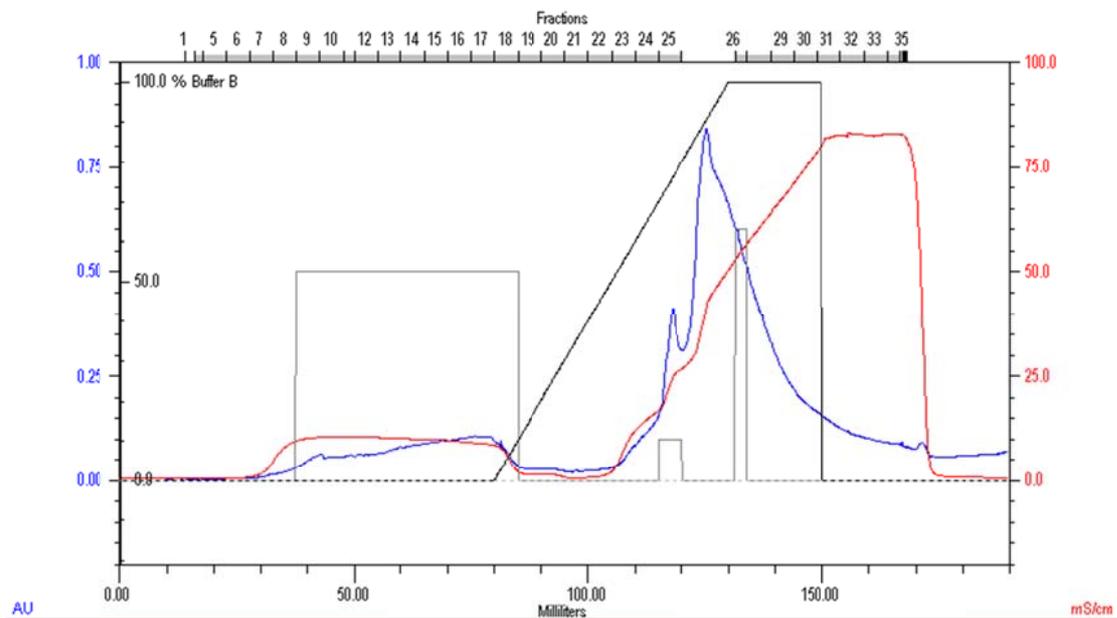


Abbildung 98: Chromatogramm zu FPLC 16.

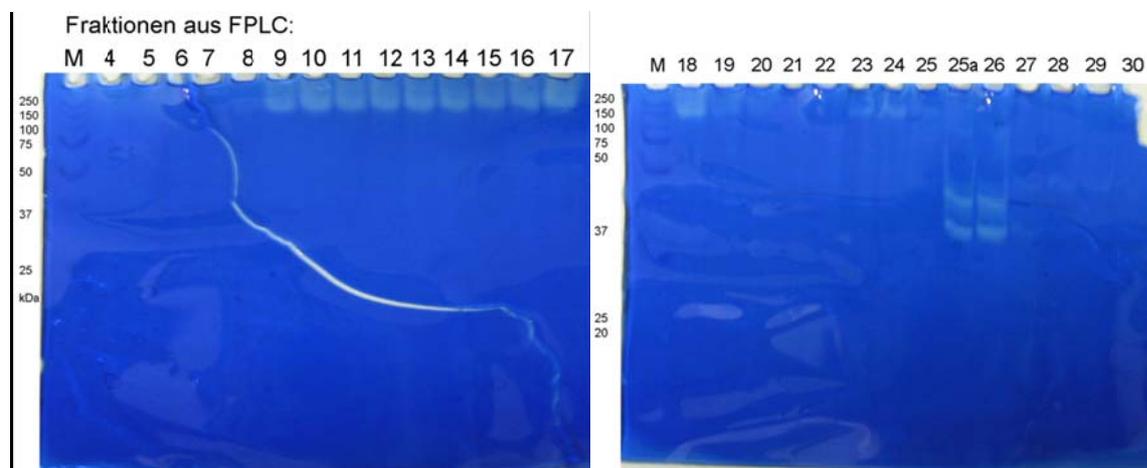


Abbildung 99: Zymografie zur Auswertung von FPLC 16.

Tabelle 59: IEX mit DEAE Sepharose zur Aufreinigung einzelner Peptidasen mit speziellem Stufengradient.

FPLC 17	
Säulenmatrix	DEAE Sepharose, 20 mL
Trennprinzip	IEX
Probe	0,5 mL Peptidasekonzentrat, auf entsprechenden pH Wert eingestellt
Puffer	A: Tris, pH 9,0, 50 mM B: Tris, pH 9,0, 50 mM + 1 M NaCl
Programm	1. Mit 100 % A spülen (15 mL) 2. Stufengradient A auf B mit 100% A dazwischen (20 mL) 3. Mit 100 % B spülen (10 mL) 4. Mit 100 % A spülen (12 mL)
Fluss	2 mL min ⁻¹

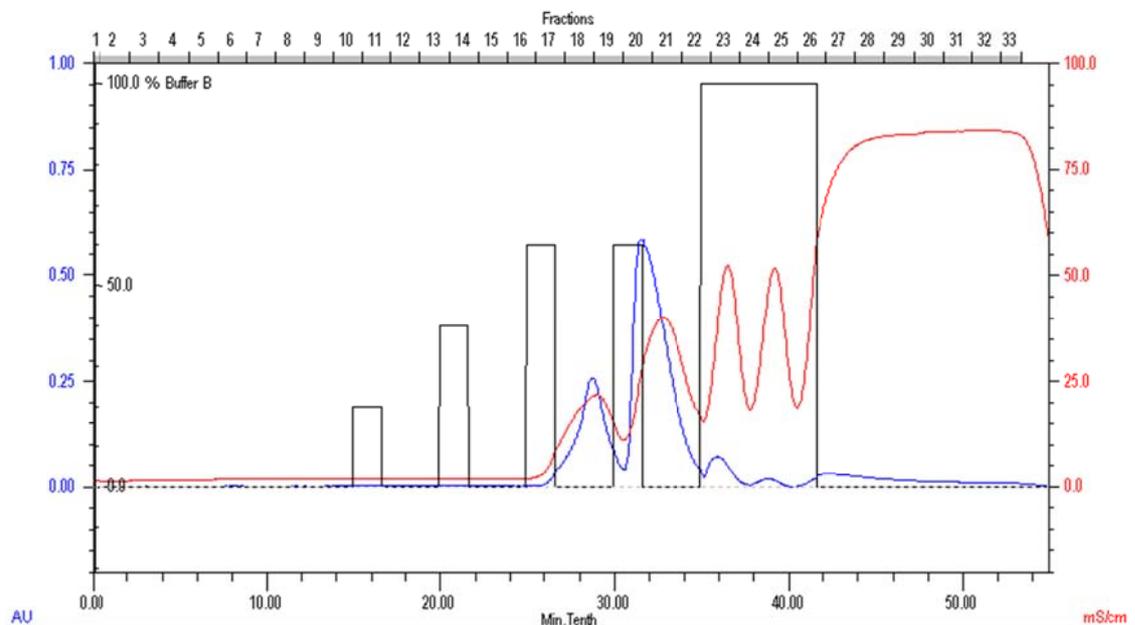


Abbildung 100: Chromatogramm zu FPLC 17.

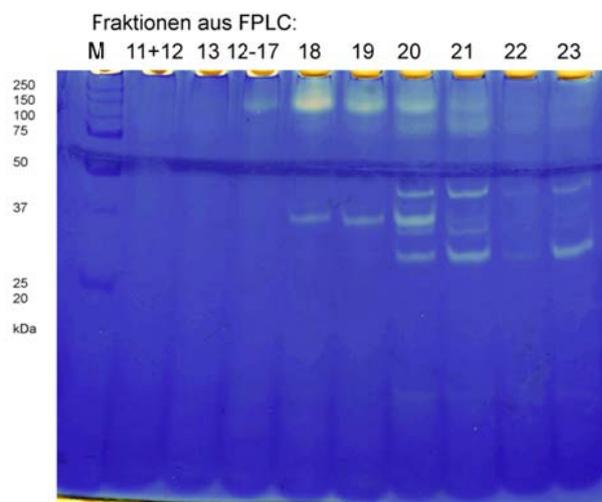


Abbildung 101: Zymografie zur Auswertung von FPLC 17.

Tabelle 60: IEX mit DEAE Sepharose zur Aufreinigung einzelner Peptidasen mit Stufengradient.

FPLC 18	
Säulenmatrix	DEAE Sepharose, 20 mL
Trennprinzip	IEX
Probe	4 mL Peptidasekonzentrat, auf entsprechenden pH Wert eingestellt
Puffer	A: Tris, pH 8,0, 50 mM B: Tris, pH 8,0, 50 mM + 1 M NaCl
Programm	1. Mit 100 % A spülen (80 mL) 2. Stufengradient A auf B (280 mL) 3. Mit 100 % B spülen (30 mL) 4. Mit 100 % A spülen (20 mL)
Fluss	2 mL min ⁻¹

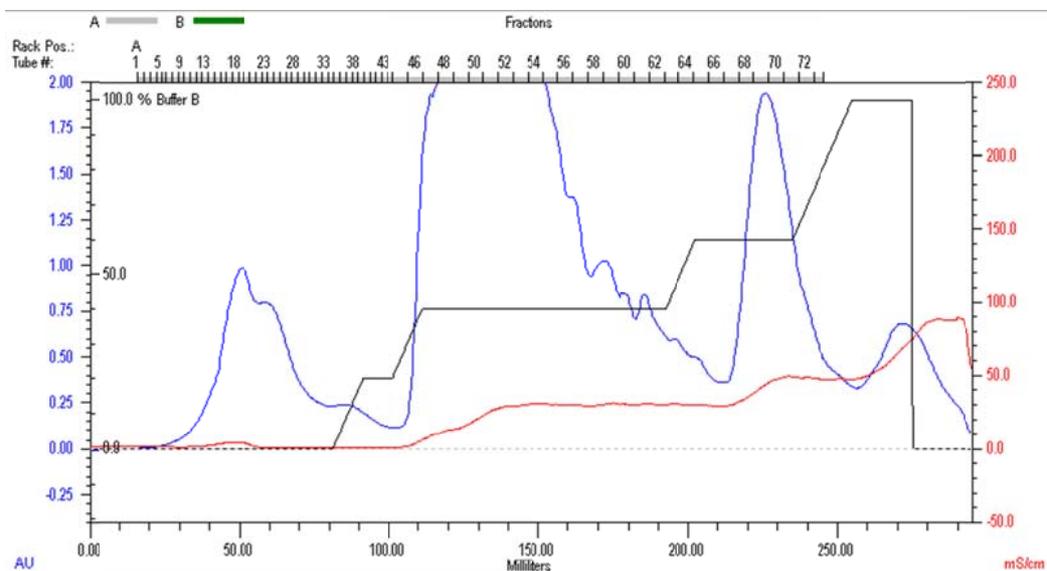


Abbildung 102: Chromatogramm zu FPLC 18.

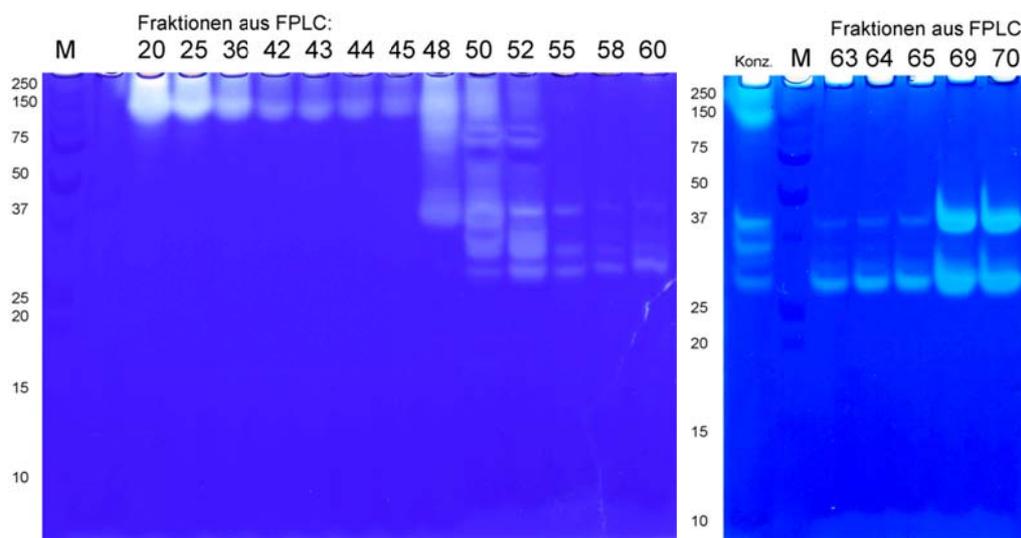


Abbildung 103: Zymografie zur Auswertung von FPLC 18.

Tabelle 61: IEX mit ANX Sepharose zur Aufreinigung einzelner Peptidasen mit linearem Gradient.

FPLC 19	
Säulenmatrix	ANX Sepharose, 1 mL
Trennprinzip	IEX
Probe	0,2 mL Peptidasekonzentrat, auf entsprechenden pH Wert eingestellt
Puffer	A: Tris, pH 8,0, 50 mM B: Tris, pH 8,0, 50 mM + 1 M NaCl
Programm	1. Mit 100 % A spülen (12,2 mL) 2. Linearer Gradient A auf B (20 mL) 3. Mit 100 % B spülen (10 mL)
Fluss	1 mL min ⁻¹

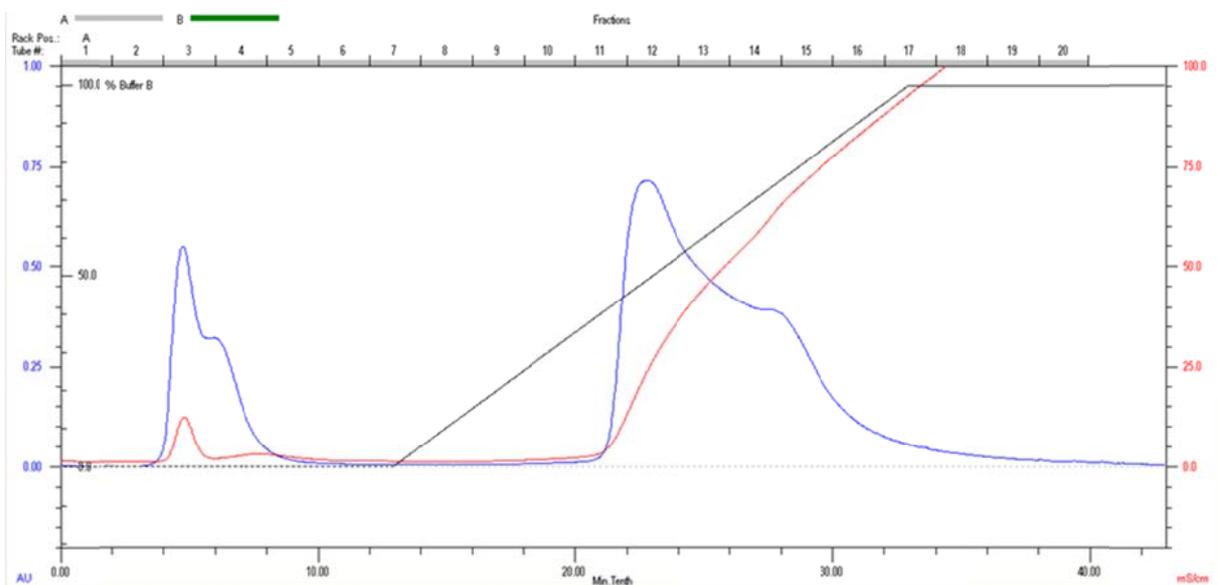


Abbildung 104: Chromatogramm zu FPLC 19.

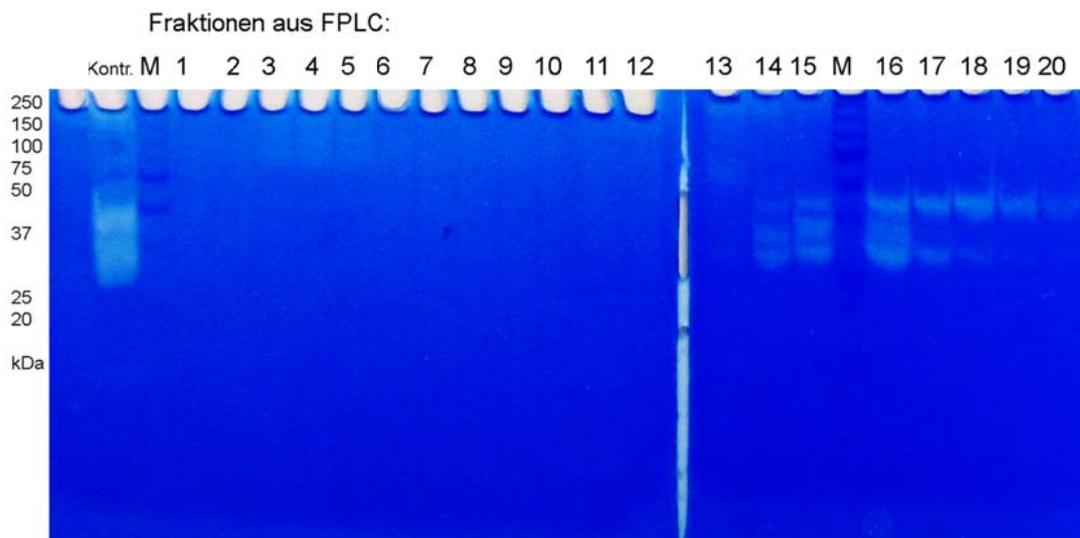


Abbildung 105: Zymografie zur Auswertung von FPLC 19.

Tabelle 62: IEX mit Mono Q1 Sepharose zur Aufreinigung einzelner Peptidasen.

FPLC 20	
Säulenmatrix	Mono Q1 Sepharose, 1 mL
Trennprinzip	IEX
Probe	0,3 mL Peptidasekonzentrat, auf entsprechenden pH Wert eingestellt
Puffer	A: Tris, pH 8,0, 50 mM B: Tris, pH 8,0, 50 mM + 1 M NaCl
Programm	1. Mit 100 % A spülen (12,2 mL) 2. Stufengradient A auf B (20 mL) 3. Mit 100 % B spülen (10 mL)
Fluss	1 mL min ⁻¹

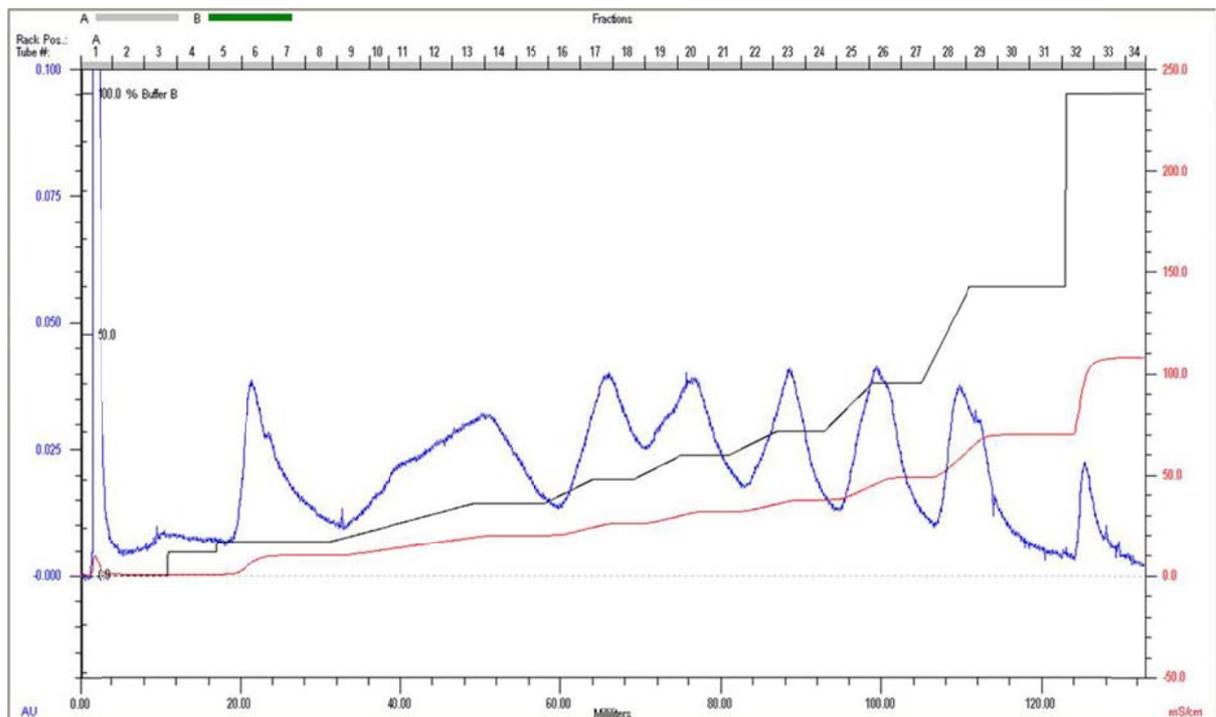


Abbildung 106: Chromatogramm zu FPLC 20.

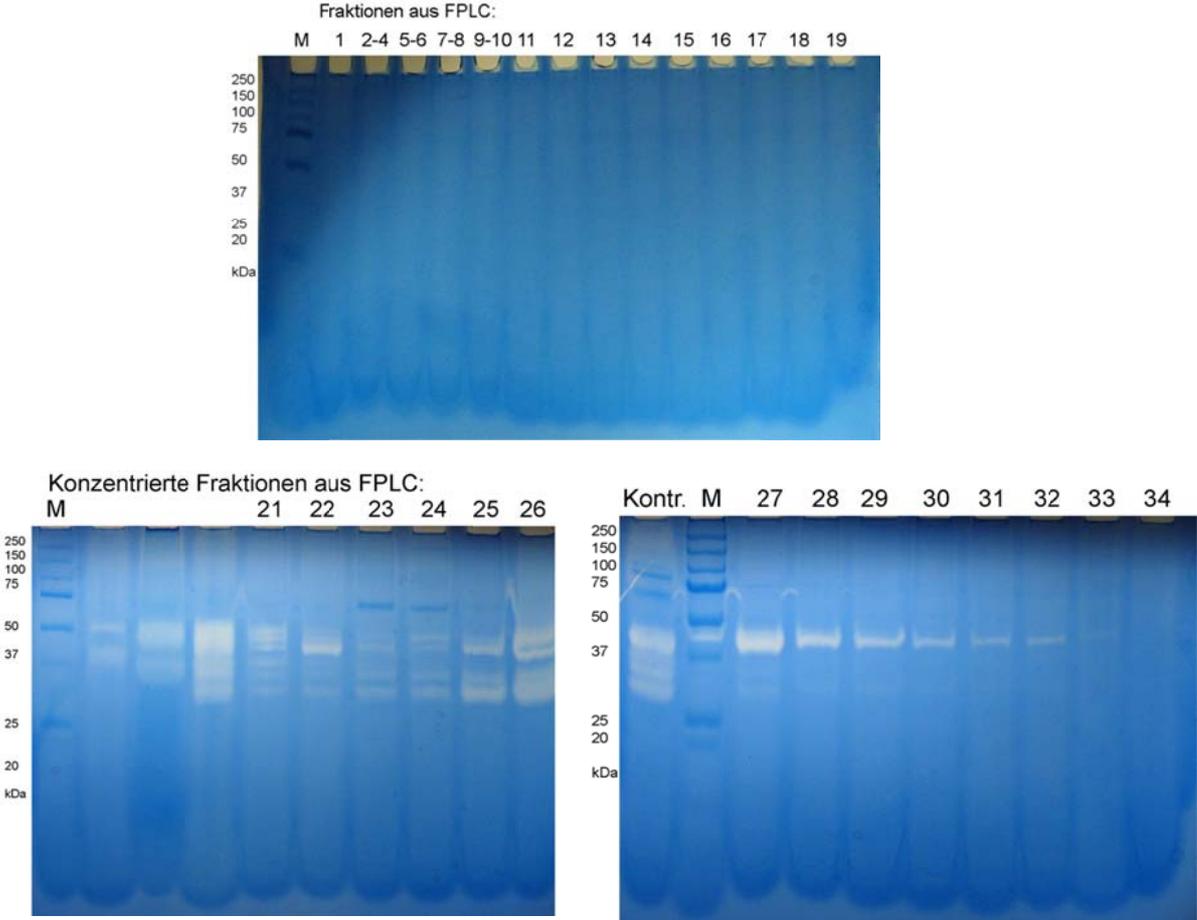
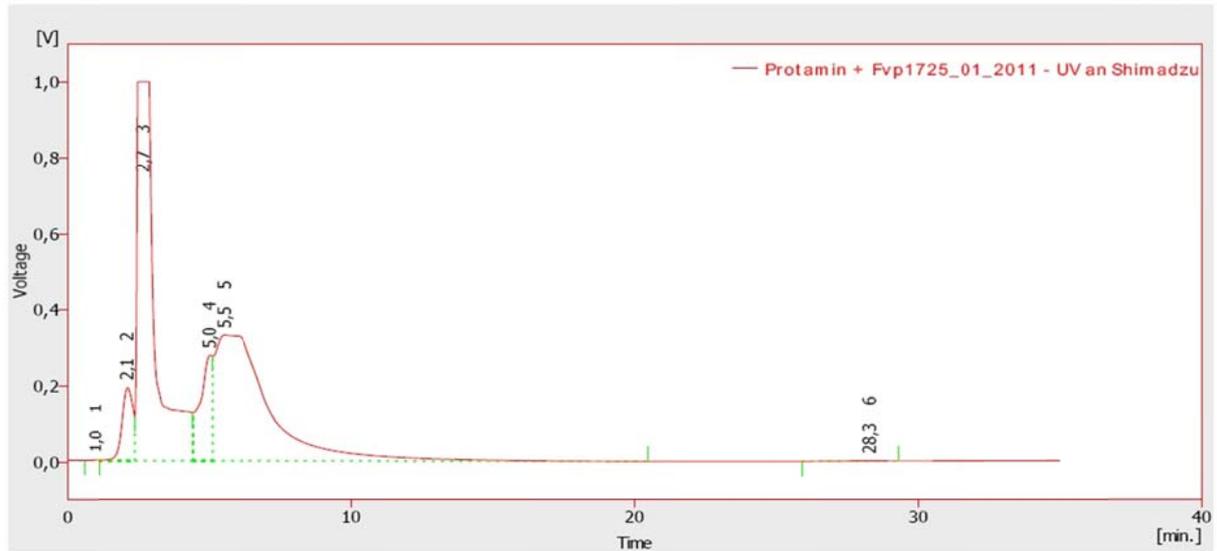


Abbildung 107: Zymografie zur Auswertung von FPLC 20.

5.4 RP-HPLC Chromatogramme

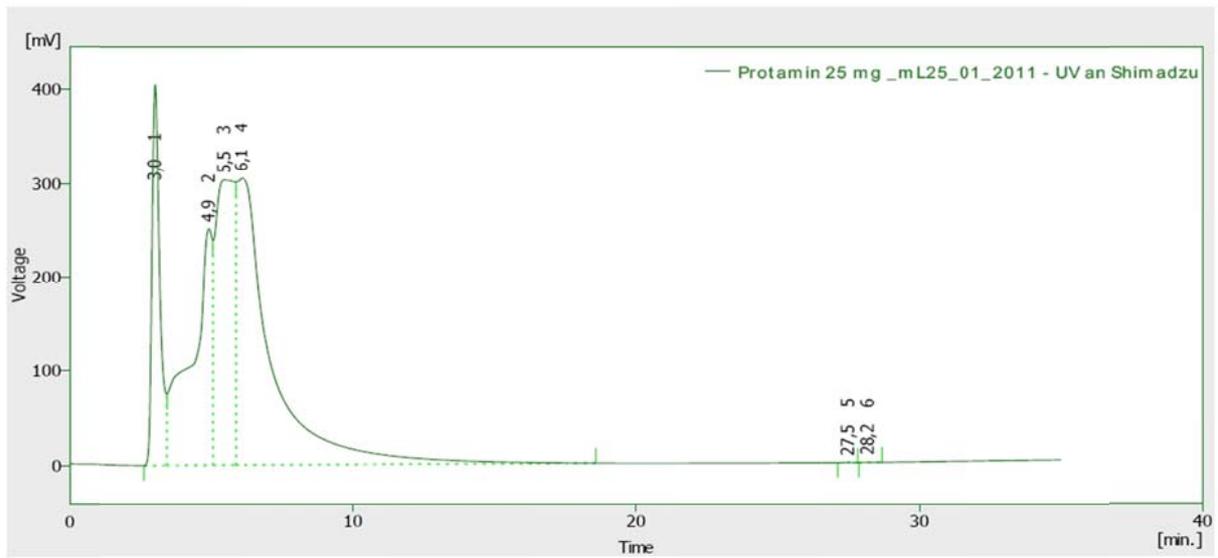
Hydrolyseversuch 1: Protamin + Fvp15



Result Table (Uncal - Protamin + Fvp1725_01_2011 - UV an Shimadzu)

	Reten. Time [min]	Area [mV.s]	Height [mV]	Area [%]	Height [%]	W05 [min]
1	1,017	27,741	1,701	0,0	0,1	0,27
2	2,147	4979,664	190,444	4,8	10,6	0,46
3	2,703	44670,676	995,891	43,5	55,5	0,55
4	5,027	8206,828	275,849	8,0	15,4	0,53
5	5,540	44719,747	329,206	43,6	18,4	1,81
6	28,320	79,363	0,754	0,1	0,0	1,41
	Total	102684,018	1793,844	100,0	100,0	

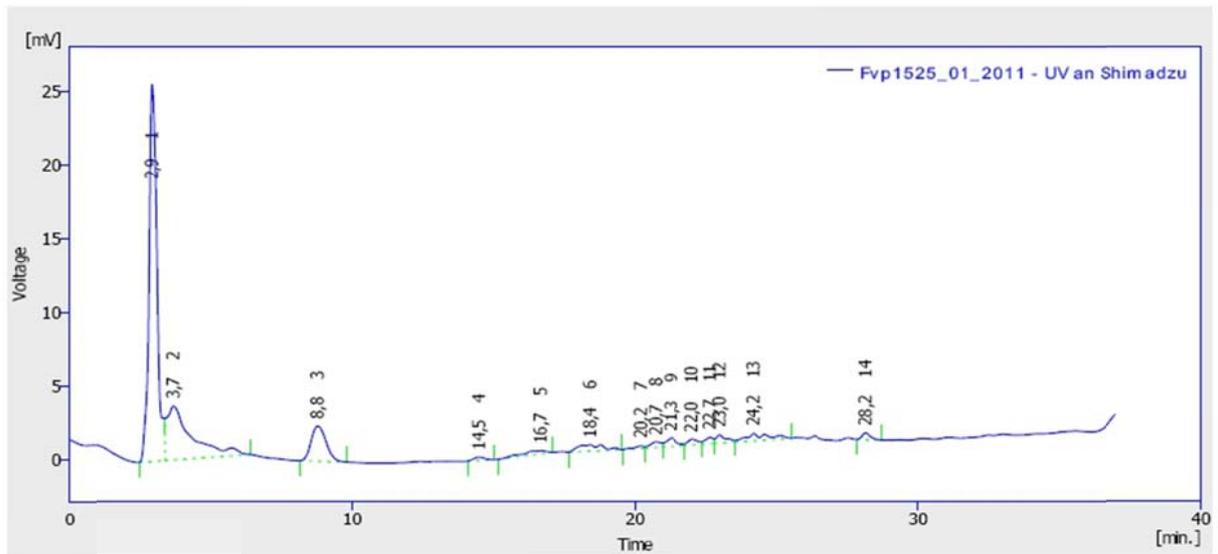
Abbildung 108: HPLC Chromatogramm zu Hydrolyseversuch 1: Protamin + Fvp15.



Result Table (Uncal - Protamin 25 mg_mL25_01_2011 - UV an Shimadzu)

	Reten. Time [min]	Area [mV.s]	Height [mV]	Area [%]	Height [%]	W05 [min]
1	3,037	7683,515	404,585	12,6	32,0	0,28
2	4,913	12853,368	251,049	21,0	19,9	0,49
3	5,453	13928,507	302,726	22,8	24,0	0,80
4	6,090	26654,320	304,475	43,6	24,1	0,96
5	27,513	6,177	0,314	0,0	0,0	0,34
6	28,203	4,958	0,210	0,0	0,0	0,63
Total		61130,847	1263,359	100,0	100,0	

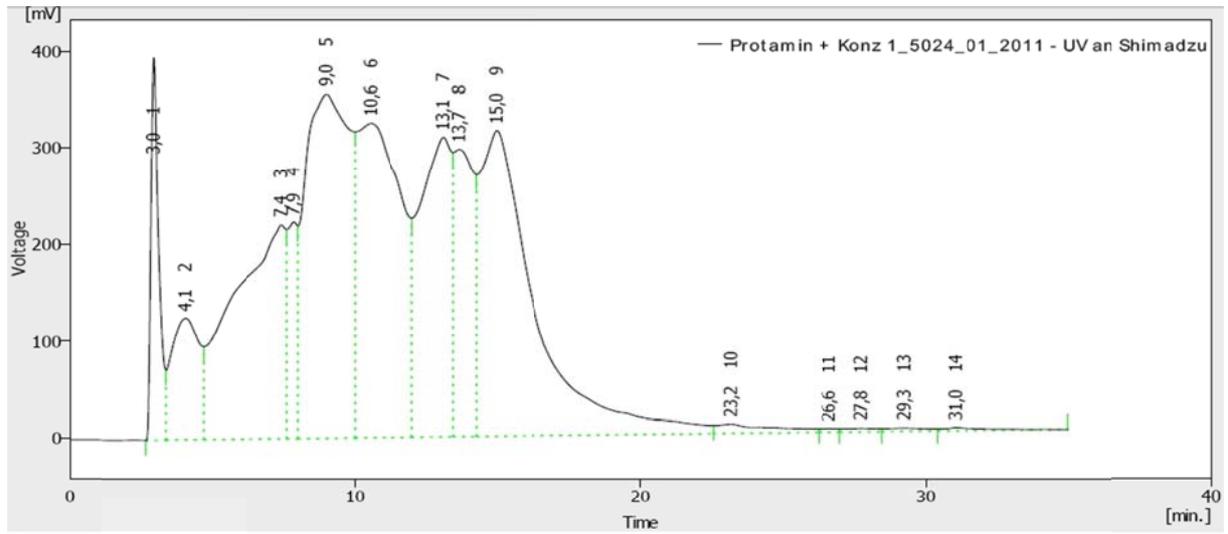
Abbildung 109: HPLC Chromatogramm zu Hydrolyseversuch 1- Blindwert Protamin.



Result Table (Uncal - Fvp1525_01_2011 - UV an Shimadzu)

	Reten. Time [min]	Area [mV.s]	Height [mV]	Area [%]	Height [%]	W05 [min]
1	2,937	495,888	25,673	52,1	71,3	0,29
2	3,687	223,874	3,652	23,5	10,1	0,78
3	8,777	86,912	2,366	9,1	6,6	0,58
4	14,500	6,405	0,241	0,7	0,7	0,43
5	16,703	15,709	0,208	1,6	0,6	0,79
6	18,427	26,429	0,437	2,8	1,2	1,02
7	20,207	4,299	0,176	0,5	0,5	0,34
8	20,743	9,640	0,374	1,0	1,0	0,42
9	21,283	15,197	0,578	1,6	1,6	0,41
10	22,017	9,801	0,396	1,0	1,1	0,50
11	22,670	8,651	0,423	0,9	1,2	0,35
12	23,000	13,814	0,552	1,4	1,5	0,56
13	24,207	26,936	0,499	2,8	1,4	0,30
14	28,173	9,153	0,450	1,0	1,3	0,30
	Total	952,707	36,025	100,0	100,0	

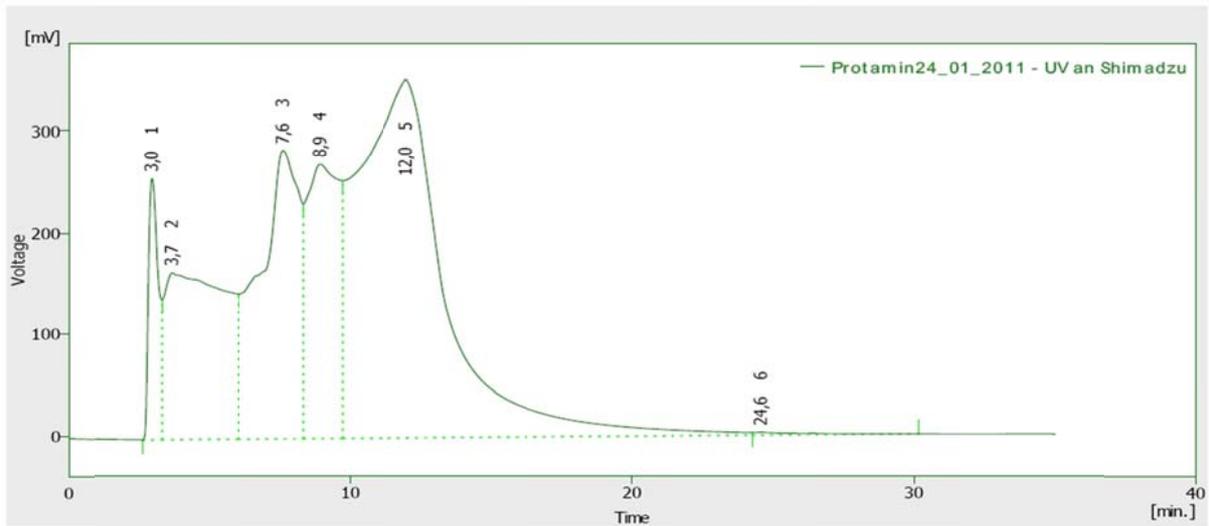
Abbildung 110: HPLC Chromatogramm zu Hydrolyseversuch 1 – Blindwert Fvp15.

Hydrolyseversuch 2: Protamin + *F. velutipes* Peptidasekonzentrat

Result Table (Uncal - Protamin + Konz 1_5024_01_2011 - UV an Shimadzu)

	Reten. Time [min]	Area [mV.s]	Height [mV]	Area [%]	Height [%]	W05 [min]
1	2,960	7499,646	395,551	3,6	15,2	0,29
2	4,063	8478,731	126,222	4,1	4,9	1,31
3	7,417	28311,843	220,744	13,7	8,5	2,51
4	7,857	5242,591	223,578	2,5	8,6	0,40
5	9,000	38531,738	356,192	18,6	13,7	2,00
6	10,567	34879,412	325,352	16,9	12,5	2,00
7	13,113	23916,249	309,855	11,6	11,9	1,45
8	13,673	14203,928	297,123	6,9	11,5	0,82
9	14,983	43083,255	316,262	20,8	12,2	1,83
10	23,193	1338,526	9,649	0,6	0,4	3,33
11	26,630	161,126	3,800	0,1	0,1	0,74
12	27,757	294,831	3,676	0,1	0,1	1,45
13	29,253	340,029	3,385	0,2	0,1	1,95
14	31,047	354,424	3,359	0,2	0,1	2,19
	Total	206636,327	2594,748	100,0	100,0	

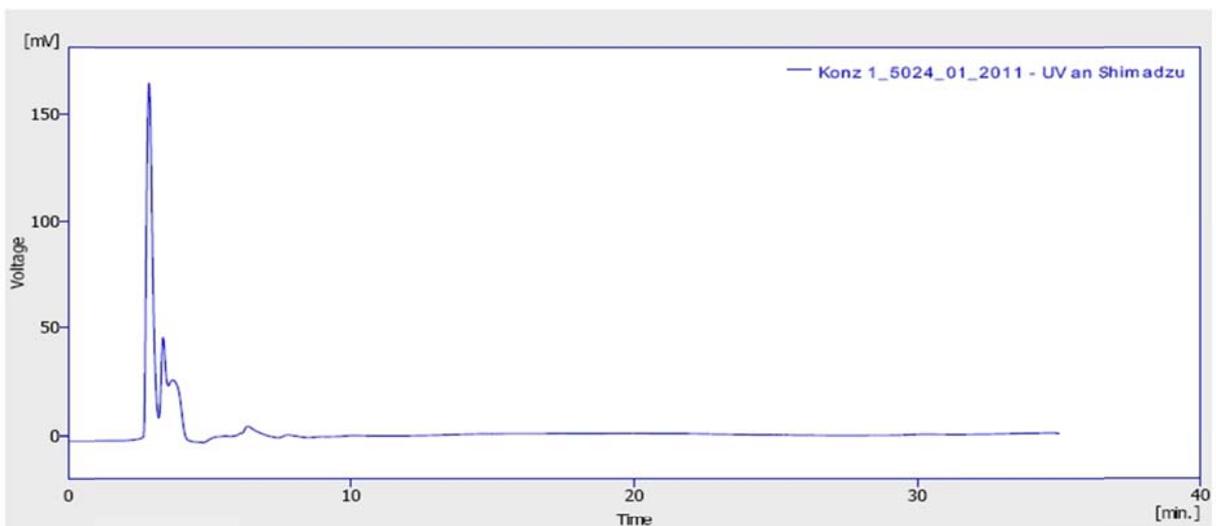
Abbildung 111: HPLC Chromatogramm zu Hydrolyseversuch 2 – Protamin + *F. velutipes* Peptidasekonzentrat.



Result Table (Uncal - Protamin24_01_2011 - UV an Shimadzu)

	Reten. Time [min]	Area [mV.s]	Height [mV]	Area [%]	Height [%]	W05 [min]
1	2,977	6164,392	257,332	3,9	19,3	0,49
2	3,683	24912,910	164,735	15,8	12,4	2,71
3	7,623	28498,243	284,152	18,0	21,3	2,31
4	8,940	21485,370	270,237	13,6	20,3	1,40
5	11,993	76606,998	352,627	48,5	26,5	3,39
6	24,587	364,728	2,878	0,2	0,2	2,64
	Total	158032,641	1331,960	100,0	100,0	

Abbildung 112: HPLC Chromatogramm zu Hydrolyseversuch 2 – Blindwert Protamin.

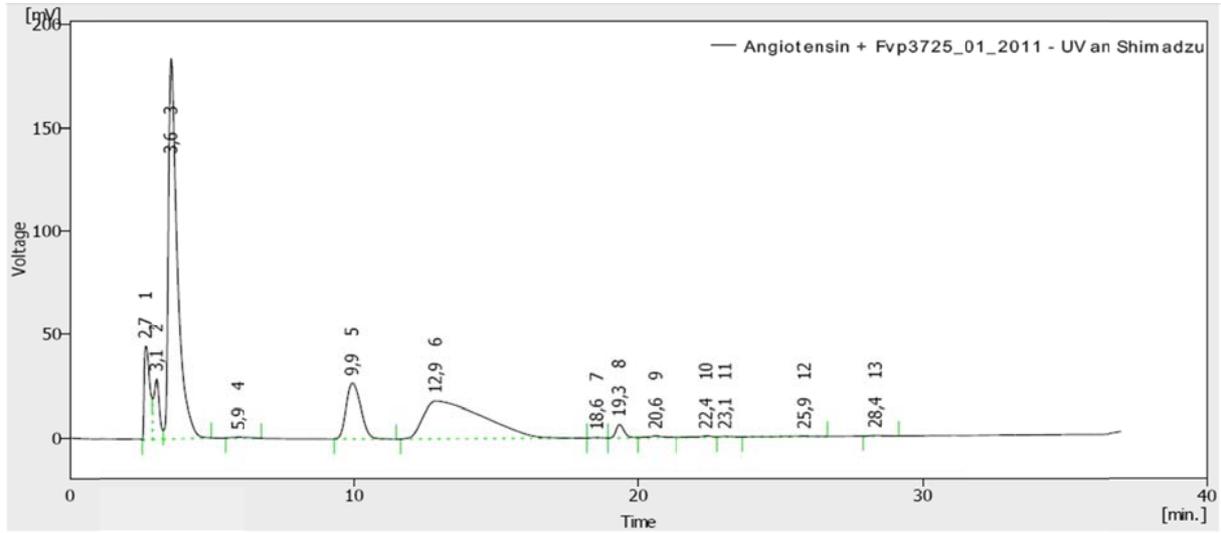


Result Table

	Reten. Time [min]	Area [mV.s]	Height [mV]	Area [%]	Height [%]	W05 [min]
1	2,880	2516,438	167,496	40,0	63,8	0,24
2	3,373	638,713	48,835	10,2	18,6	0,25
3	3,703	799,100	28,758	12,7	11,0	0,47
4	5,543	115,495	2,884	1,8	1,1	0,71
5	6,367	410,006	7,282	6,5	2,8	0,88
6	7,783	145,626	2,977	2,3	1,1	1,05
7	10,193	283,059	2,320	4,5	0,9	2,31
8	19,827	1361,568	1,654	21,6	0,6	11,96
9	30,383	21,222	0,321	0,3	0,1	1,42
	Total	6291,228	262,527	100,0	100,0	

Abbildung 113: HPLC Chromatogramm zu Hydrolyseversuch 2 – Blindwert Peptidasekonzentrat.

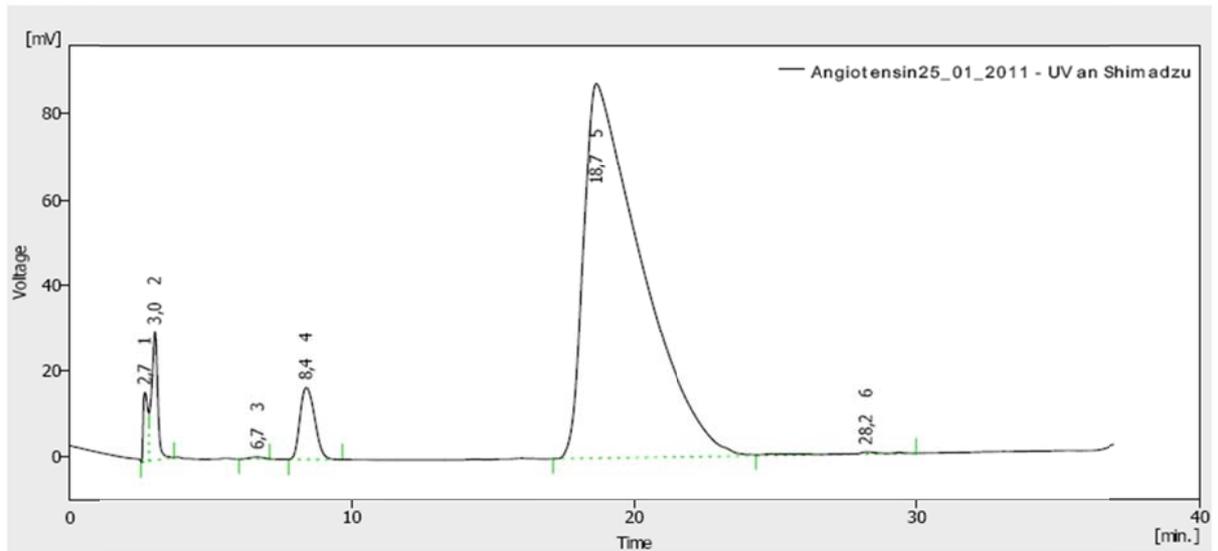
Hydrolyseversuch 3: Angiotensin + Fvp37



Result Table (Uncal - Angiotensin + Fvp3725_01_2011 - UV an Shimadzu)

	Reten. Time [min]	Area [mV.s]	Height [mV]	Area [%]	Height [%]	W05 [min]
1	2,700	614,749	44,954	7,0	14,4	0,24
2	3,070	394,805	28,886	4,5	9,3	0,24
3	3,577	3969,979	183,778	45,1	58,9	0,31
4	5,927	21,858	0,457	0,2	0,1	0,82
5	9,940	946,068	26,672	10,7	8,6	0,57
6	12,900	2642,814	17,967	29,9	5,8	2,44
7	18,567	6,591	0,288	0,1	0,1	0,38
8	19,347	126,932	6,445	1,4	2,1	0,30
9	20,623	31,790	0,932	0,4	0,3	0,39
10	22,417	25,047	0,714	0,3	0,2	0,39
11	23,080	11,055	0,376	0,1	0,1	0,46
12	25,860	19,185	0,209	0,2	0,1	0,85
13	28,363	8,061	0,267	0,1	0,1	0,48
	Total	8838,932	311,945	100,0	100,0	

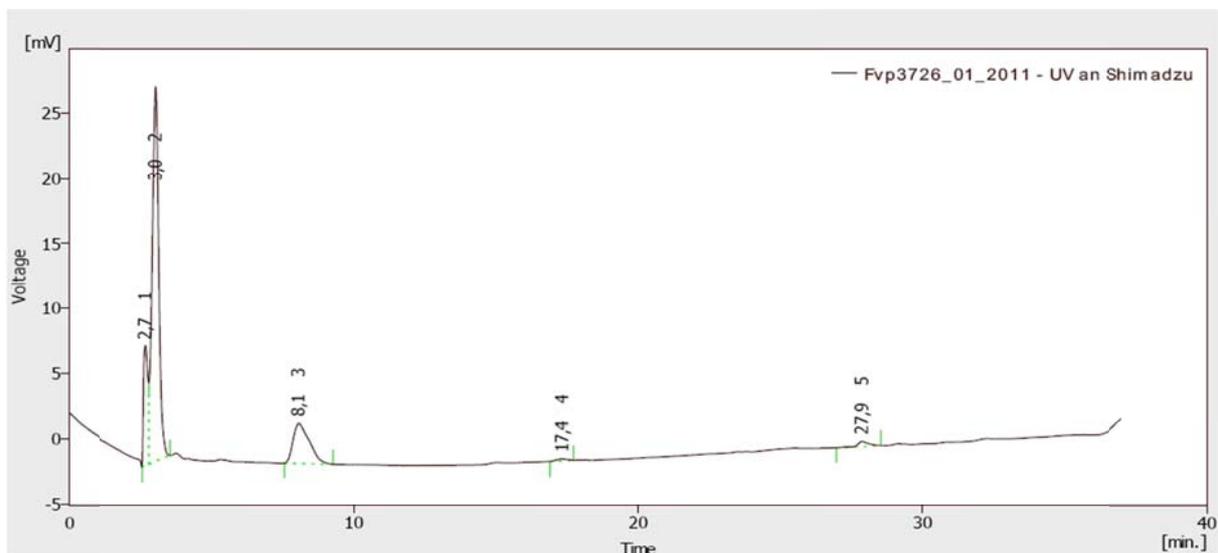
Abbildung 114: HPLC Chromatogramm zu Hydrolyseversuch 3 – Angiotensin + Fvp37.



Result Table (Uncal - Angiotensin25_01_2011 - UV an Shimadzu)

	Reten. Time [min]	Area [mV.s]	Height [mV]	Area [%]	Height [%]	W05 [min]
1	2,687	179,535	16,060	1,3	10,6	0,21
2	3,037	453,079	30,027	3,3	19,9	0,23
3	6,677	14,082	0,425	0,1	0,3	0,55
4	8,387	602,195	16,663	4,4	11,0	0,58
5	18,673	12340,654	87,364	90,4	57,9	2,17
6	28,230	63,210	0,476	0,5	0,3	0,64
Total		13652,754	151,014	100,0	100,0	

Abbildung 115: HPLC Chromatogramm zu Hydrolyseversuch 3 – Blindwert Angiotensin.

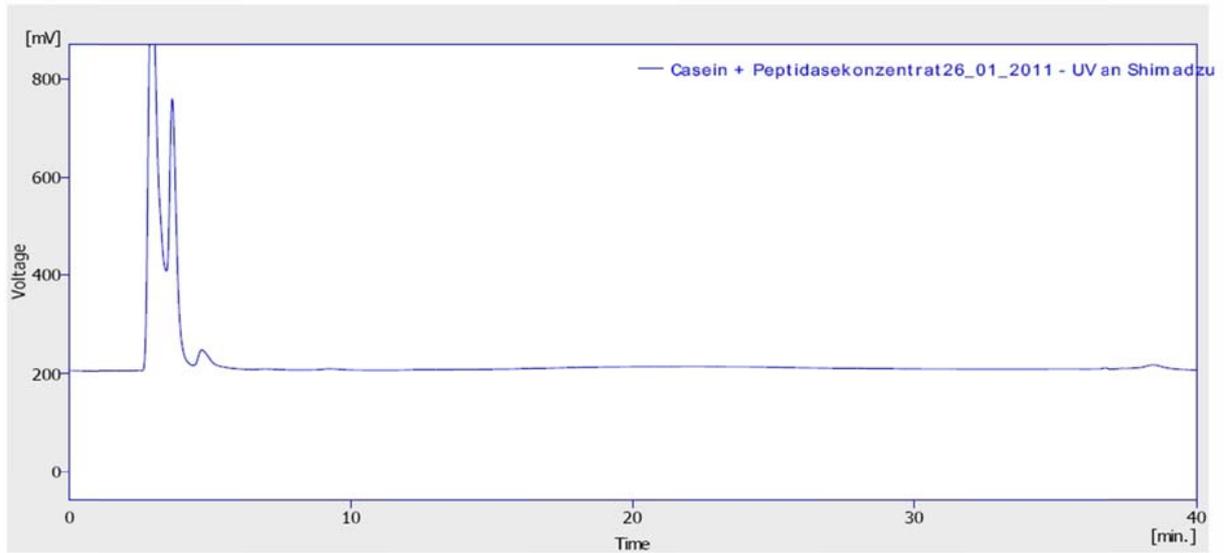


Result Table (Uncal - Fvp3726_01_2011 - UV an Shimadzu)

	Reten. Time [min]	Area [mV.s]	Height [mV]	Area [%]	Height [%]	W05 [min]
1	2,690	96,080	9,135	13,9	22,0	0,20
2	3,047	458,901	28,734	66,5	69,3	0,25
3	8,067	121,103	3,028	17,5	7,3	0,65
4	17,367	3,764	0,157	0,5	0,4	0,39
5	27,893	10,395	0,388	1,5	0,9	0,42
Total		690,243	41,441	100,0	100,0	

Abbildung 116: HPLC Chromatogramm zu Hydrolyseversuch 2 – Blindwert Fvp37.

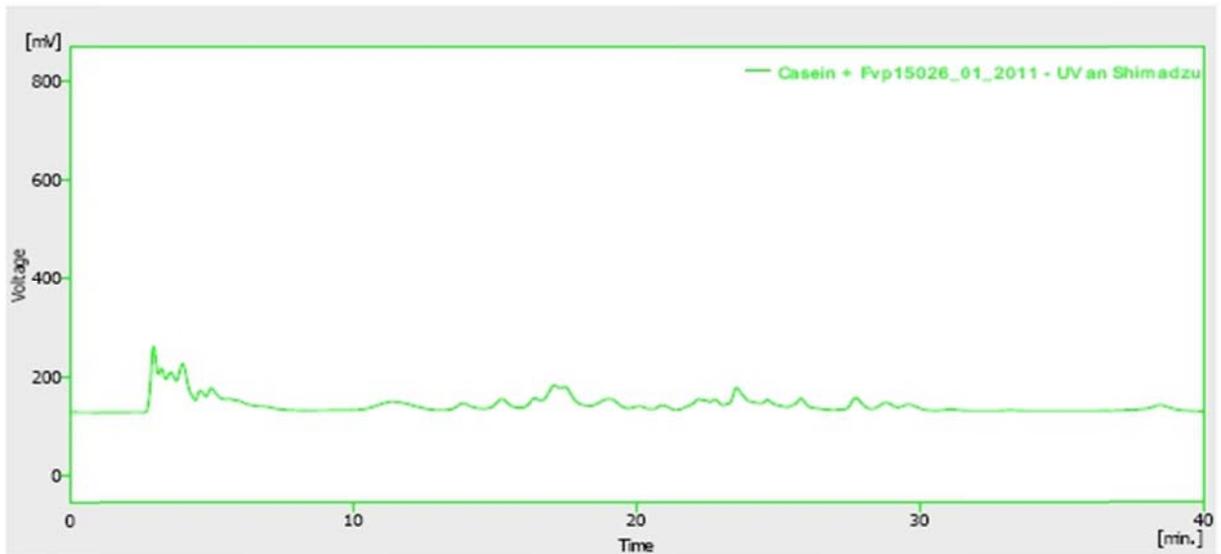
Hydrolyseversuch 4: Casein + Peptidasekonzentrat, Fvp150, Fvp37 und Fvp27.



Result Table

	Reten. Time [min]	Area [mV.s]	Height [mV]	Area [%]	Height [%]	W05 [min]
1	2,533	12,353	0,834	0,0	0,1	0,24
2	2,943	20030,090	793,234	51,5	55,8	0,37
3	3,663	10514,533	555,297	27,0	39,0	0,28
4	4,700	1643,616	42,220	4,2	3,0	0,48
5	6,983	211,028	3,166	0,5	0,2	1,21
6	9,223	272,992	3,440	0,7	0,2	0,91
7	12,807	136,544	1,574	0,4	0,1	1,34
8	22,137	5057,743	7,178	13,0	0,5	11,01
9	35,290	188,664	1,469	0,5	0,1	2,51
10	36,787	97,750	3,137	0,3	0,2	0,40
11	38,467	763,035	10,486	2,0	0,7	0,89
	Total	38928,348	1422,035	100,0	100,0	

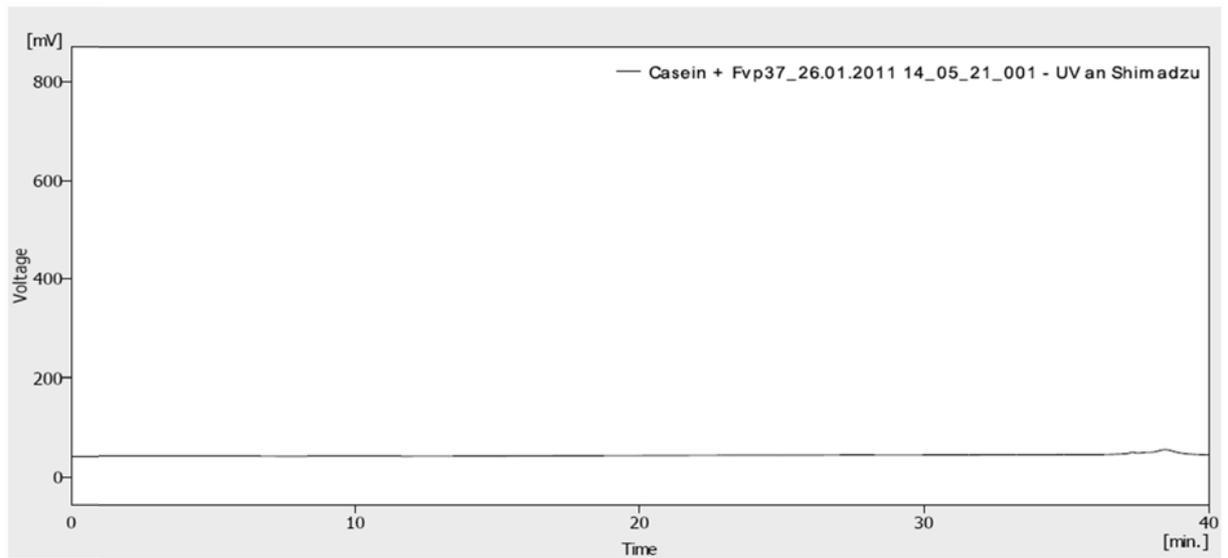
Abbildung 117: HPLC Chromatogramm zu Hydrolyseversuch 4 – Casein + Peptidasekonzentrat.



Result Table

	Reten. Time [min.]	Area [mV.s]	Height [mV]	Area [%]	Height [%]	W05 [min.]
1	2,443	9,903	0,480	0,0	0,0	0,42
2	2,900	1957,781	134,901	6,1	13,4	0,28
3	3,260	1231,668	88,793	3,8	8,8	0,26
4	3,590	1606,717	80,944	5,0	8,0	0,36
5	3,997	2528,760	98,442	7,9	9,8	0,43
6	4,610	830,138	44,115	2,6	4,4	0,38
7	4,997	1478,365	49,105	4,6	4,9	0,68
8	5,610	2134,577	27,133	6,7	2,7	1,03
9	9,647	333,000	4,378	1,0	0,4	1,42
10	11,437	2236,592	21,165	7,0	2,1	1,60
11	13,913	862,417	17,394	2,7	1,7	0,68
12	15,277	1085,466	26,077	3,4	2,6	0,59
13	16,463	873,426	27,608	2,7	2,7	0,51
14	17,163	1641,862	54,078	5,1	5,4	0,53
15	17,523	1757,551	51,006	5,5	5,1	0,48
16	19,040	1412,461	25,736	4,4	2,6	0,96
17	20,117	419,899	11,292	1,3	1,1	0,84
18	20,923	427,053	12,992	1,3	1,3	0,54
19	22,258	1117,156	25,491	3,5	2,5	0,72
20	22,807	548,103	24,913	1,7	2,5	0,46
21	23,567	2019,007	48,338	6,3	4,8	0,52
22	24,657	888,175	23,220	2,8	2,3	0,72
23	25,827	1062,423	26,564	3,3	2,6	0,49
24	27,783	907,332	27,782	2,8	2,8	0,44
25	28,947	652,633	17,680	2,0	1,8	0,65
26	29,637	610,539	14,151	1,9	1,4	0,74
27	31,103	231,988	4,234	0,7	0,4	0,67
28	33,241	144,724	2,249	0,5	0,2	0,86
29	37,393	232,604	3,635	0,7	0,4	0,53
30	38,503	770,884	12,789	2,4	1,3	0,80
Total		32015,202	1006,666	100,0	100,0	

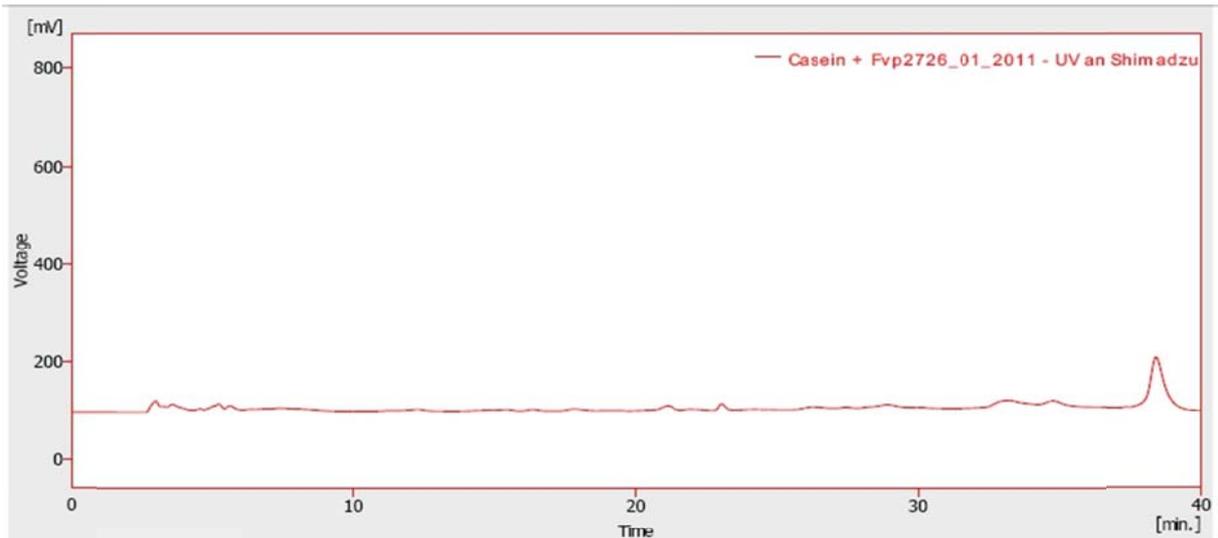
Abbildung 118: HPLC Chromatogramm zu Hydrolyseversuch 4 – Casein + Fvp150.



Result Table

	Reten. Time [min]	Area [mV.s]	Height [mV]	Area [%]	Height [%]	W05 [min]
1	37,357	240,725	5,440	26,4	34,0	0,35
2	38,480	671,174	10,540	73,6	66,0	0,90
	Total	911,899	15,980	100,0	100,0	

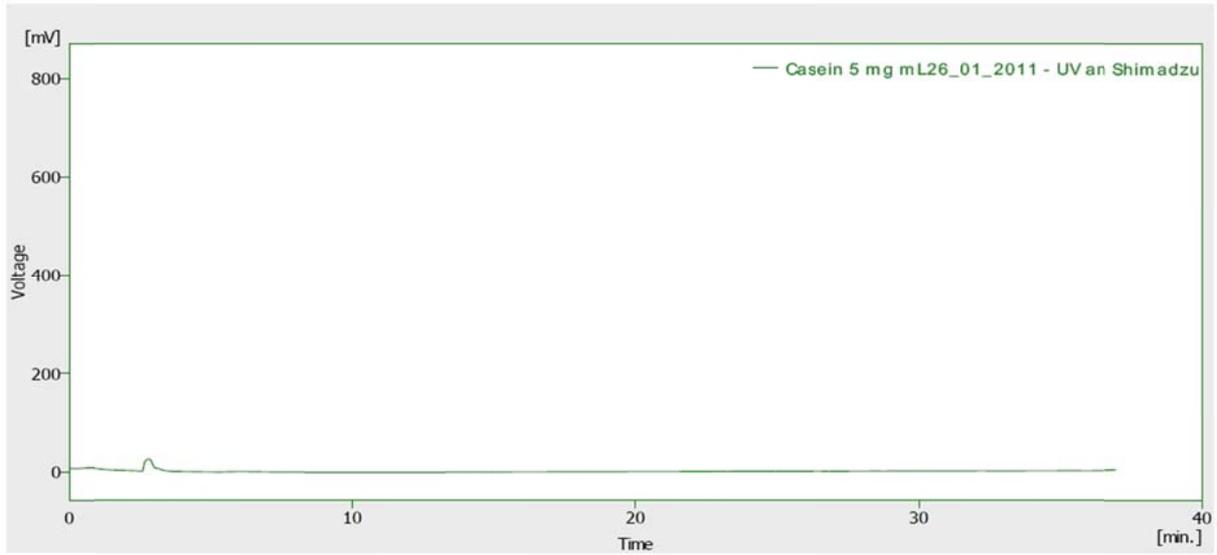
Abbildung 119: HPLC Chromatogramm zu Hydrolyseversuch 4 – Casein + Fvp37.



Result Table

	Reten. Time [min.]	Area [mV.s]	Height [mV]	Area [%]	Height [%]	W05 [min.]
1	3,007	413,485	22,860	2,6	6,8	0,34
2	3,277	143,029	11,432	0,9	3,4	0,22
3	3,590	490,114	15,721	3,1	4,7	0,55
4	4,577	119,902	6,121	0,8	1,8	0,44
5	5,217	433,102	16,237	2,7	4,9	0,45
6	5,607	290,181	12,489	1,8	3,7	0,39
7	6,393	122,807	4,940	0,8	1,5	0,47
8	6,893	160,936	5,749	1,0	1,7	0,50
9	7,433	581,723	6,969	3,7	2,1	1,51
10	12,280	241,152	4,046	1,5	1,2	0,68
11	14,907	116,403	2,574	0,7	0,8	0,72
12	15,410	124,436	3,202	0,8	1,0	0,68
13	16,387	113,746	3,467	0,7	1,0	0,51
14	17,870	275,685	4,478	1,7	1,3	0,66
15	21,133	423,557	10,822	2,7	3,2	0,51
16	21,967	178,751	3,736	1,1	1,1	0,88
17	23,063	290,662	14,856	1,8	4,4	0,27
18	24,257	321,364	3,521	2,0	1,1	1,87
19	26,277	591,994	8,119	3,7	2,4	1,32
20	27,473	277,848	7,553	1,8	2,3	0,71
21	28,920	1566,350	12,811	9,9	3,8	2,26
22	33,210	2160,356	21,379	13,7	6,4	1,67
23	34,793	1822,134	20,277	11,5	6,1	1,14
24	38,430	4532,322	110,528	28,7	33,1	0,51
Total		15792,038	333,886	100,0	100,0	

Abbildung 120: HPLC Chromatogramm zu Hydrolyseversuch 4 – Casein + Fvp27.



Result Table

	Reten. Time [min]	Area [mV.s]	Height [mV]	Area [%]	Height [%]	W05 [min]
1	0,740	178,413	3,072	21,6	10,5	0,97
2	2,823	576,350	25,221	69,7	86,4	0,32
3	6,113	37,903	0,588	4,6	2,0	1,07
4	26,443	29,775	0,135	3,6	0,5	0,31
5	28,477	4,442	0,164	0,5	0,6	0,29
	Total	826,883	29,180	100,0	100,0	

Abbildung 121: HPLC Chromatogramm zu Hydrolyseversuch 4 – Blindwert Casein.

6 Verzeichnisse

6.1 Literaturverzeichnis

- [1] M. Rao, A. Tanksale, M. Ghatge, and V. Deshpande, "Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases," *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, vol. 62, pp. 597 - 635, 1998.
- [2] R. Gupta, Q. Beg, S. Khan, and B. Chauhan, "An Overview on Fermentation, Downstream, Processing and Properties of Microbial Alkaline Proteases," *Appl Microbiol Biot*, vol. 60, pp. 381 - 395, 2002.
- [3] A. Markaryan, D.J. Lee, T.D. Sirakova, and P.E. Kolattukudy, "Specific Inhibition of Mature Fungal Serine Proteinases and Metalloproteinases by Their Propeptides," *J Bact*, vol. 178, pp. 2211 - 2215, 1996.
- [4] U. Lindequist, T. Niedermeyer, and W. Jülich, "The Pharmacological Potential of Mushrooms," *eCAM*, vol. 2, pp. 285 - 299, 2005.
- [5] D. Bebber, S. Watkinson, P. Darrah, M. Fricker, and M. Tlalka, *The Role of Wood Decay Fungi in the Carbon and Nitrogen Dynamics of the Forest Floor*. Cardiff University: Cambridge University Press, 2006.
- [6] N.D. Rawlings, A.J. Barrett, and A. Bateman, "MEROPS: the Peptidase Database," *Nucleic Acids Res*, vol. 38, pp. 227 - 233, 2010.
- [7] O. Kudryavtseva, Y. Dunaevsky, O. Kamzolkina, and M. Belozersky, "Fungal proteolytic enzymes: Features of the Extracellular Proteases of Xylotrophic Basidiomycetes," *Microbiology*, vol. 77, pp. 643 - 653, 2008.
- [8] L. Gzogyan, M. Proskuryakov, E. Levleva, and T. Valueva, "Trypsin-like Proteinases and Trypsin Inhibitors in Fruiting Bodies of Higher Fungi," *Appl Biochem Microbiol*, vol. 41, pp. 538 - 541, 2005.
- [9] J. Sabotic, T. Trcek, T. Popovi, and J. Brzin, "Basidiomycetes Harbour a Hidden Treasure of Proteolytic Diversity," *J Biotechnol*, vol. 128, pp. 297 - 307, 2003.
- [10] G. Palmieri et al., "Purification, Characterization, and Functional Role of a Novel Extracellular Protease from *Pleurotus ostreatus*," *Appl Envir Microbiol*, vol. 67, pp. 2754 - 2759, 2001.
- [11] C.G. Dosoretz, S.B. Dass, C. Reddy, and H.E. Grethlein, "Protease-Mediated Degradation of Lignin Peroxidase in Liquid Cultures of *Phanerochaete chrysosporium*," *Appl Environ Microbiol*, vol. 56, pp. 3429-3434, 1990.
- [12] J.-H. Joh, B.-G. Kim, and W.-S. Kong, "Cloning and Developmental Expression of a Metzincin Family Metalloprotease cDNA from Oyster Mushroom *Pleurotus ostreatus*," *FEMS Microbiology Letters*, vol. 239, pp. 57 - 62, 2004.
- [13] M. Abe and M. Seguchi, "Proteases of *Grifola frondosa* Responsible for Breakdown of Wheat Flour Dough and Their Reaction with Gluten Proteins," *Biosci Biotech Bioch*, vol. 67, pp. 2018 - 2021, 2003.
- [14] T. Okamura-Matsui et al., "Fermented Soybean with Thrombosis Preventing Activity Using Mushroom Mycelia as Microbial Source," *Food Sci Technol Res*, vol. 3, pp. 227 - 230, 2003.

- [15] Y. Murooka and M. Yamshita, "Traditional Healthful Fermented Products of Japan," *J Ind Microbiol Biotechnol*, vol. 35, pp. 791 - 798, 2008.
- [16] R. Wittmann, "Bestimmung von Dichlorpropanolen und Monochlorpropandiolen in Würzen und würzehaltigen Lebensmitteln," *Z Lebensm Unters-Forsch*, vol. 193, pp. 224-229, 1978.
- [17] J. Schlatter, A. J. Baars, M. DiNovi, S. Lawrie, and R Lorentzen, "3-Chlorpropan-1,2-diol," in *Safety Evaluation of Certain Food Additives and Contaminants; WHO Food Additives Series*, WHO, Ed., 2002, ch. 48, pp. 401 – 432.
- [18] J. Schlatter, A. J. Baars, M. DiNovi, S. Lawrie, and R., Lorentzen, "1,3-Dichlorpropan-2-ol," in *Safety Evaluation of Certain Food Additives and Contaminants; WHO Food Additives Series*, WHO, Ed. Genf, 2002, ch. 48, pp. 433 – 450.
- [19] X. Kong, H. Zhou, and H. Qian, "Enzymatic Hydrolysis of Wheat Gluten by Proteases and Properties of the Resulting Hydrolysates," *Food Chem*, vol. 102, pp. 759 - 765, 2007.
- [20] J. Shuiwang, J. Zhao, Q. Zhao, Y. Bao, and Y. Jiang, "Characterization of Hydrolysates Derived from Enzymatic Hydrolysis of Wheat Gluten," *Food Chem Toxicol*, vol. 72, pp. 103 - 107, 2007.
- [21] H. Wieser, "Chemistry of Gluten Proteins," *Food Microbiol*, vol. 24, pp. 115 - 119, 2007.
- [22] Y. Liang, Pan L., and Lin Y., "Analysis of Extracellular Proteins of *Aspergillus oryzae* grown on soy sauce Koji," *Biosci Biotech Bioch*, vol. 73, pp. 192 - 195, 2009.
- [23] J. Maga, "Mushroom flavour," *J Agric Food Chem*, vol. 29, 1981.
- [24] S. Krügener, U. Krings, H. Zorn, and R.G. Berger, "A dioxygenase of *Pleurotus sapidus* transforms (+)-valencene regio-specifically to (+)-nootkatone via a stereo-specific allylic hydroperoxidation," *Bioresour Technol*, vol. 101, pp. 457 – 462, 2010.
- [25] K. Zelena, B. Hardebusch, B. HülSDau, R.G. Berger, and H. Zorn, "Generation of Norisoprenoid Flavours from Carotenoids by Fungal Peroxidases," *J Agric Food Chem*, vol. 57, pp. 9951 – 9955., 2009.
- [26] S. Wu, H. Zorn, U. Krings, and R.G. Berger, "Characteristic Volatiles from Young and Aged Fruiting Bodies of *Polyporus sulphureus*," *J Agric Food Chem*, vol. 53, pp. 4524 - 4528, 2005.
- [27] S. Rapior, G. Kanska, J. Guillot, C. Andary, and J.-M. Bessiere, "Volatile Comosition of *Laetiporus sulphureus*," *Cryptogamie Mycol*, vol. 21, pp. 67 - 72, 2000.
- [28] R. Takeda and S. Nakayama, "Peptidase of Aspergilli. III. Enrichment of Koji with Peptidase and a Proposal of Rapid Fermentation of Shoyu," vol. 15, pp. 19 - 25, 1968.
- [29] N. Ivanova, A. Vaganove, A. Strongin, and V. Stepanov, "Isolation and Properties of Leucine Aminopeptidase from *Aspergillus oryzae*," *Biokhimiia*, vol. 42, 1977.
- [30] K. Murakami et al., "Isolation and Characterization of the Alkaline Protease Gene of *Aspergillus oryzae*," *Agric Biol Chem*, vol. 55, pp. 2807 - 2811, 1991.
- [31] R. Berka, C. Carmona, K. Hayenga, S. Thompson, and M. Ward, "Isolation and Characterization of the *Aspergillus oryzae* Gene Encoding Aspergillopepsin," *O Gene*, vol. 125, pp. 195 - 198, 1993.
- [32] R. Doumas, P. Van Den Broek, M. Affolter, and M. Monod, "Characterization of the Prolyl Dipeptidyl Peptidase Gene (DPPIV) from the Koji Mold *Aspergillus oryzae*," *Appl Environ Microbiol*, vol. 64, pp. 4809 - 4815, 1998.

- [33] P. Ander and K. Eriksson, "Selective Degradation of Wood Components by White-Rot Fungi," *Physiologia Plantarum*, vol. 41, pp. 239 – 248, 1977.
- [34] R. Zabel and J. Merrell, *Wood Microbiology – Decay and its Prevention.*: Academic press, Inc, 1992.
- [35] J. Kim and Y. Kim, "Characterization of a Metalloenzyme from a Wild Mushroom, *Tricholoma saponaceum*," *Biosci Biotechnol Bioch*, vol. 65, pp. 356 – 362, 2001.
- [36] Y. Peng, X. Yang, and Y. Zhang, "Microbial Fibrinolytic Enzymes: an Overview of Source, Production, Properties, and Thrombolytic Activity in Vivo," *Appl Microbiol Biot*, vol. 69, pp. 126 – 132, 2005.
- [37] M. Kawai, "Studies on Milk Clotting Enzymes Produced by Basidiomycetes. Part II. Some Properties of Basidiomycete Milk Clotting Enzymes," *Agric Biol Chem*, vol. 34, 1970.
- [38] M. Kawai, "Productivity of Proteolytic Enzymes and Distribution of its Milk Clotting Activity Among the Basidiomycetes," *J Agric Chem Soc Japan*, vol. 47, pp. 467 – 472, 1973.
- [39] H. Kobayashi and H. Kim, "Characterization of Aspartic Proteinase from Basidiomycete, *Laetiporus sulfureus*," *Food Sci Technol Res*, vol. 9, pp. 70 - 73, 2003.
- [40] V. Healy, J. O'Connell, T. McCarthy, and S. Doonan, "The Lysine-Specific Proteinase from *Armillaria mellea* is a Member of a Novel Class of Metalloendopeptidases Located in Basidiomycetes," *Biochem Biophys Res Comm*, vol. 262, pp. 60 - 63, 1999.
- [41] T. Nonaka et al., "Characterization of a Thermostable Lysine-Specific Metalloendopeptidase from the Fruiting Bodies of a Basidiomycete, *Grifola frondosa*," *J Biochem*, vol. 118, pp. 1014 - 1020, 1995.
- [42] H. Shin and H. Choi, "Purification and Partial Characterization of a Metalloprotease in *Flammulina velutipes*," *J Microbiol*, vol. 36, pp. 20 - 26, 1998.
- [43] S. Park et al., "Purification and Characterization of a Fibrinolytic Protease from a Culture Supernatant of *Flammulina velutipes*," *Biosci Biotech Bioch*, vol. 71, pp. 2214 - 2222, 2007.
- [44] C. Caporale, A. Garzillo, C. Caruso, and V. Buonocore, "Characterization of Extracellular Proteases from *Trametes versicolor*," *Phytochemistry*, vol. 41, pp. 385 - 393, 1996.
- [45] X. Kong, H. Zhou, and H. Qian, "Enzymatic Preparation and Functional Properties of Wheat Gluten Hydrolysates," *Food Chem*, vol. 101, pp. 615 – 620, 2007.
- [46] S. L. Iversen and M. H. Jorgensen, "Azocasein Assay for Alkaline Protease in a Complex Fermentation Broth," *Biotech Tech*, vol. 9, pp. 573 - 576, 1995.
- [47] I.M. Rosenberg, *Protein Analysis and Purification: Benchtop Techniques*. Berlin: Springer, 2001.
- [48] T. Ahn, S. Yim, J. Kim, and C. Yun, "Polyacrylamide Gel Electrophoresis without a Stacking Gel: Application for Separation of Peptides," *Anal Biochem*, vol. 305, pp. 277 - 279, 2002.
- [49] R. Matissek and G. Steiner, *Lebensmittelanalytik*. Berlin, Heidelberg: Springer, 2006.
- [50] W. Jeffries, S. Choi, and T. Kirk, "Nutritional Regulation of Lignin Degradation by *Phanerochaete chrysosporium*," *Appl Environ Microbiol*, vol. 42, pp. 290 - 296, 1981.
- [51] M. Staszczak, G. Novak, and K. Grzywnowicz, "Proteolytic Activities in Cultures of Selected White-Rot Fungi," *J Basic Microb*, vol. 36, pp. 193 - 203, 1996.

- [52] D. Cabaleiro, S. Rodriguez-Couto, A. Sanroman, and M. Longo, "Comparison between the Protease Production Ability of Lignolytic Fungi Cultivated in Solid State Media," *Process Biochem*, vol. 37, pp. 1017 - 1023, 2002.
- [53] W. Tanner and L. Lehle, "Protein Glycosylation in Yeast," *Biochim Biophys Acta*, vol. 906, pp. 81 - 99, 1987.
- [54] S.F. Altschul, W. Gish, W. Miller, E. Myers, and D.J. Lipman, "Basic Local Alignment Search Tool," *J Mol Biol*, vol. 215, pp. 403 - 410, 1990.
- [55] N.D., Barrett, A.J. & Bateman, A. Rawlings, "MEROPS: the peptidase database," *Nucleic Acids Res*, vol. 38, pp. 227 - 233, 2010.
- [56] R. Chenna et al., "Multiple Sequence Alignment with the Clustal Series of Programs," *Nucleic Acids Res*, vol. 31, pp. 3497 - 3500, 2003.
- [57] K. Takio, "Peptidyl-Lys Metalloendopeptidase," in *Handbook of Proteolytic Enzymes, 2 edn.* London: Elsevier, 2004.
- [58] T. Nonaka, Y. Hashimoto, and K. Takio, "Kinetic Characterization of Lysine-specific Metalloendopeptidases from *Grifola frondosa* and *Pleurotus ostreatus* fruiting bodies," *J Biochem*, vol. 124, pp. 157 - 162, 1998.
- [59] D. Rudenskaya and V Besedin, "Proline-Specific Endopeptidases," *Russ J Bioorg Chem*, vol. 29, pp. 3 - 20, 2003.
- [60] I. Blank, J., Fumeaux, R. Lin, D.H. Welt, and L.B. Fay, "Formation of 3-Hydroxy-4,5-dimethyl-2(5H)-Furanone (Sotolone) from 4-Hydroxy-L-Isoleucine and 3-Amino-4,5-dimethyl-3,4-dihydro-2(5H)-Furanone," *J Agric Food Chem*, vol. 44, pp. 1851-1856, 1996.
- [61] P. Steinhaus and P. Schieberle, "Characterization of the Key Aroma Compounds in Soy Sauce Using Approaches of Molecular Sensory Science," *J Agric Food Chem*, vol. 55, pp. 6262 - 6269, 2007.
- [62] K. Söllner and P. Schieberle, "Decoding the Key Aroma Compounds of a Hungarian-type Salami by Molecular Sensory Science Approaches," *J Agric Food Chem*, vol. 57, pp. 4319 - 4327, 2009.
- [63] R. Lizarraga-Guerra, H. Guth, and M.G. Lopez, "Identification of the Most Potent Odorants in Huitlacoche (*Ustilago maydis*) and Austernpilzen (*Pleurotus sp.*) by Aroma Extract Dilution Analysis and Static Headspace Samples," *J Agric Food Chem*, vol. 45, pp. 1329 - 1332, 1997.
- [64] S. Rapior, F. Fons, and J.M. Bessiere, "The Fenugreek Odor of *Lactarius helvus*," *Mycologia*, vol. 92, pp. 305 - 308, 2000.
- [65] F. Peraza-Luna, M. Rodríguez-Mendiola, C. Arias-Castro, J.M. Bessiere, and G. Calva-Calva, "Sotolone Production by Hairy Root Cultures of *Trigonella foenum-graecum* in Airlift with Mesh Bioreactors," *J Agric Food Chem*, vol. 49, pp. 6012 - 6019., 2001.
- [66] I-H. Jang, M-S. Kang, and H-J. Chae, no english title available, *J Korean Soc Appl Biol Chem*, vol. 47, pp. 49 - 54, 2004, abstract only.
- [67] J. Ogawa et al., "Synthesis of 4-Hydroxyisoleucine by the Aldolase-Transaminase Coupling Reaction and Basic Characterization of the Aldolase from *Arthrobacter simplex* AKU 626.," *Biosci Biotech Biochem*, vol. 71, pp. 1607 - 1615, 2007.
- [68] I. Suay, F. Arenal, F. Asensio, and A. Basilio, "Screening of Basidiomycetes for Antimicrobial Activities," *A van Leeuw J Microb*, vol. 78, pp. 129 - 139, 2000.

- [69] M. Karaman, M. Jovin, R. Malbaša, M. Matavuly, and M. Popovic, "Medicinal and Edible Lignicolous Fungi as Natural Sources of Antioxidative and Antibacterial Agents," *Phytother Res*, vol. 24, pp. 1473 – 1481, 2010.
- [70] A. Sumantha, C. Larroche, and A. Pandey, "Microbiology and Industrial Biotechnology of Food-Grade Proteases: A Perspective," *Food Technol Biotechnol*, vol. 44, pp. 211 - 220, 2006.
- [71] G. Srinubabu, N. Lokeswari, and K. Jayaraju, "Screening of Nutritional Parameters for the Production of Protease from *Aspergillus oryzae*," *E-Journal of Chemistry*, vol. 4, pp. 208 - 215, 2007.
- [72] K. Hummel, A. Inselman, E. Ramos, A. Gathman, and W. Lilly, "Extracellular Protease Production by Submerged Cultures of *Schizophyllum commune*," *Mycologia*, vol. 90, pp. 883 - 889, 1998.
- [73] N. Kudryavtseva, E. Gyozeva, A. Sofin, and T. Valueva, "The Influence of Cultural Medium Composition on the Proteolytic Enzyme Secretion of Fungus *Rhizoctonia solani*," *Prikladnaya Biokhimiya i Mikrobiologiya*, vol. 46, pp. 355 - 362, 2010.
- [74] C. Krishna, "Solid-State Fermentation Systems—An Overview," *Crit Rev Biotechnol*, vol. 25, pp. 1 – 30, 2005.
- [75] R.A. Battaglino, M. Huergo, A.M.R. Pilosof, and G.B. Bartholomai, "Culture Requirements for the Production of Protease by *Aspergillus oryzae* in Solid-State Fermentation," *Appl Microbiol Biotechnol*, vol. 35, pp. 292 – 296, 1991.
- [76] C. Sandhya, A. Sumantha, G. Szakacs, and A. Pandey, "Comparative Evaluation of Neutral Protease Production by *Aspergillus oryzae* in Submerged and Solid-State Fermentation," *Process Biochem*, vol. 40, pp. 2689 – 2694, 2005.
- [77] A. Pandey, "Recent developments in solid-state fermentation," *Process Biochem*, vol. 27, pp. 109 – 116, 1992.
- [78] M. Machida, O. Yamada, and K. Gomi, "Genomics of *Aspergillus oryzae*: Learning from the History of Koji Mold and Exploration of Its Future," *DNA Res*, vol. 15, pp. 173 – 183, 2008.
- [79] M.,U. Ling and C.,C. Chou, "Biochemical Changes During the Preparation of Soy Sauce Koji with Extruded and Traditional Raw Materials," *Int J Food Sci*, vol. 31, pp. 511 - 517, 1996.
- [80] G. Jarai and F. Buxton, "Nitrogen, Carbon and pH Regulation of Extracellular Acidic Proteases of *Aspergillus niger*," *Curr Genet*, vol. 26, pp. 238 - 244, 1994.
- [81] S.L.M. Neto, D.R. Matheus, and K.M.G. Machado, "Influence of pH on the Growth, Laccase Activity and RBBR Decolorization by Tropical Basidiomycetes," *Brazilian Archives of Biology and Technology*, vol. 52, pp. 1075 - 1082, 2009.
- [82] G. Beale and A. Faberge, "Determination of pH in Wood," *Nature*, vol. 3725, pp. 357 - 358, 1941.
- [83] E. Dunaevskii et al., "Extracellular Proteases of Mycelial Fungi as Participants of Pathogenic Process," *Russ J Bioorg Chem*, vol. 34, pp. 317–321, 2008.
- [84] J. Mucha, H. Dahm, A. Werner, and A. van Leeuwenhoek, "Influence of Autoclaved Saprotrophic Fungal Mycelia on Proteolytic Activity in Ectomycorrhizal Fungi," *Biomed Life Sci*, vol. 92, pp. 137 - 149, 2007.
- [85] R.V. Wadekar, M.J. North, and S.C. Watkinson, "Proteolytic Activities in Two Wood-Decaying Basidiomycete Fungi, *Serpula lacrymans* and *Coriolus versicolor*," *Microbiology*, vol. 141, pp.

1575 - 1583, 1995.

- [86] L. Polgár and M.L. Bender, "A New Enzyme Containing a Synthetically Formed Active Site. Thiol-Subtilisin," *J Am Chem Soc*, vol. 88, pp. 3153 – 3154, 1966.
- [87] D.,A. Estell et al., "Probing Steric and Hydrophobic Effects on Enzyme–Substrate Interactions by Protein Engineering," *Science*, vol. 233, pp. 659 – 663, 1986.
- [88] H. Grøn and K. Breddam, "Interdependency of Binding Subsites in Subtilisin," *Biochemistry*, vol. 31, pp. 8967 – 8971, 1992.
- [89] M. Rheinhecker, G. Baker, J. Eder, and A.R. Fersht, "Engineering a novel specificity in subtilisin BPN'," *Biochemistry-US*, vol. 32, pp. 1199 – 1203, 1993.
- [90] C. Betzel, S. Klupsch, S. Branner, and K.S. Wilson, "Crystal Structure from the Alkaline Proteases Savinase and Esperase from *Bacillus lentus*," in *Subtilisin Enzymes: Practical Protein Engineering*. New York: Plenum, 1996.
- [91] V. Faraco et al., "A New Subfamily of Fungal Subtilases: Structural and Functional Analysis of a *Pleurotus ostreatus* member," *Microbiology*, vol. 151, pp. 457 – 466, 2005.
- [92] C.P. Ponting and M.J. Pallen, "beta-Propeller Repeats and a PDZ Domain in the Tricorn Protease: Predicted Self-Compartmentalisation and C-terminal Polypeptide-Binding Strategies of Substrate Selection," *FEMS Microbiol Lett*, vol. 179, pp. 447 – 451, 1999.
- [93] K. Breddam, "Serine Carboxypeptidases. A Review," *Carlsberg Res Commun*, vol. 51, pp. 83 - 128, 1986.
- [94] H.Y.T. Yang and E.G. Erdős, "Prolylcarboxypeptidase: a Recently Described Lysosomal Enzyme.," *Excerpta Medical International Congress: Immunopathology of Inflammation*, vol. 229, pp. 146 – 148, 1970.
- [95] B. Leiting et al., "Catalytic Properties and Inhibition of Proline-Specific Dipeptidyl Peptidases II, IV and VII," *Biochem J*, vol. 371, pp. 525 - 532, 2003.
- [96] H. Tatsumi, "Deuterolysin," in *Handbook of Proteolytic Enzymes, 2 edn*. London: Elsevier, 2004, pp. 786 - 788.
- [97] Y. Doi et al., "Substrate Specificities of Deuterolysin from *Aspergillus oryzae* and Electron Paramagnetic Resonance Measurement of Cobalt-substituted Deuterolysin," *Biosci Biotechnol Biochem*, vol. 67, pp. 264 - 270, 2003.
- [98] The UniProt Consortium, "The Universal Protein Resource (UniProt)," *Nucleic Acids Res*, vol. 38, pp. D142 - D148, 2010.
- [99] W.H. Seo, H.G. Lee, and H.H. Baek, "Evaluation of Bitterness in Enzymatic Hydrolysates of Soy Protein Isolate by Taste Dilution Analysis," *J Food Science*, vol. 73, pp. 41 - 46, 2008.
- [100] D.V. Besedin and G.N. Rudenskaya, "Proline-Specific Endopeptidases," *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, vol. 29, pp. 1 - 17, 2003.
- [101] K.N. Henderson et al., "A Structural and Immunological Basis for the Role of Human Leukocyte Antigen DQ8 in Celiac Disease," *Immunity*, vol. 27, pp. 23 - 34, 2007.
- [102] L. Shan et al., "Structural Basis for Gluten Intolerance in Celiac Sprue," *Science*, vol. 297, pp. 2275 - 2279, 2002.
- [103] I. Edens et al., "Extracellular Prolyl Endoprotease from *Aspergillus niger* and Its Use in the Debittering of Protein Hydrolysates," *J Agric Food Chem*, vol. 53, pp. 7950 - 7957, 2005.

- [104] T. Marti et al., "Prolyl Endopeptidase-Mediated Destruction of T Cell Epitopes in Whole Gluten: Chemical and Immunological Characterization," *J Pharmacol Experiment*, vol. 312, pp. 19 - 26, 2005.
- [105] D. Sriranganadane et al., "Aspergillus Protein Degradation Pathways with Different Secreted Protease Sets at Neutral and Acidic pH," *Journal of Proteome Research*, vol. 9, pp. 3511 – 3519, 2010.
- [106] T. Byun, L. Kofod, and A. Blinkovsky, "Synergistic Action of an X-Prolyl Dipeptidyl Aminopeptidase and a Non-Specific Aminopeptidase in Protein Hydrolysis," *J Agric Food Chem*, vol. 49, pp. 2061 - 2063, 2001.
- [107] J.-S. Park, M.-Y. Lee, K.-S. Kim, and T.-S. Lee, "Volatile Flavor Components of Soybeanpaste (Doenjang) Prepared from Different Types of Strains," *Korean J Food Sci Technol*, vol. 26, pp. 255 - 260, 1994.
- [108] N. Nunomura, M. Sasaki, Y. Asao, and T. Yokotsuka, "Isolation and Identification of 4-Hydroxy-2(or 5)-ethyl-5(or 2)-methyl-3(2H)-Furanone as a Flavor Component in Shoyu (Soy Sauce)," *Agric Biol Chem*, vol. 40, pp. 491 - 495, 1976.
- [109] N. Nunomura and M. Sasaki, "Japanese Soy Sauce Flavor with Emphasis on Off-Flavors," *DeV Food Sc*, vol. 28, pp. 287 - 312, 1992.
- [110] N. Nunomura, M. Sasaki, Y. Asao, and T. Yokotsuka, "Shoyu (Soy Sauce) Volatile Flavor Components: Basic Fraction," *Agric Biol Chem*, vol. 42, pp. 2123 - 2128, 1978.
- [111] M. Ogasawara, Y. Yamada, and M. Egi, "Taste Enhancer from the Long-Term Ripening of Miso (Soybean Paste)," *Food Chem*, vol. 99, pp. 736 – 741, 2006.
- [112] L.-M. Chung and S.-J. Chung, "Cross-Cultural Comparisons among the Sensory Characteristics of Fermented Soybean Using Korean and Japanese Descriptive Analysis Panels," *J Food Sci*, vol. 72, 2007.
- [113] N. Eisele et al., "The First Characterized Asparaginase from a Basidiomycete, *Flammulina velutipes*," *Biores Tech*, vol. 102, pp. 3316 - 3321, 2011.
- [114] I. Blank, P. Schieberle, and W. Grosch, *Quantification of the Flavor Compounds 3-Hydroxy-4,5-Dimethyl-2(5H)-Furanone (Sotolone) and 5-Ethyl-3-Hydroxy-4-Methyl-2(5H)-Furanone (Abhexone) by a Stable Isotope Dilution Assay*. Carol Stream, IL: Allured Publishing, 1993.
- [115] M. Sasaki, N. Nunomura, and T. Matsudo, "Biosynthesis of 4-Hydroxy-2(or 5)-ethyl-5(or 2)-methyl-3(2H)-Furanone by Yeasts," *J Agric Food Chem*, vol. 39, pp. 934 - 938, 1991.
- [116] M. Sasaki, "Isolation and Identification of Precursor of 4-Hydroxy-2(or 5)-ethyl-5(or 2)-methyl-3(2H)-Furanone from Isolated Soybean Protein and Shoyu," *J Agric Food Chem*, vol. 44, pp. 230 - 235, 1996.
- [117] C.H. Lin, Y.T. Wei, Chou, and C.C., "Enhanced Antioxidative Activity of Soybean Koji Prepared with Various Filamentous Fungi," *Food Microbiol*, vol. 23, pp. 628 – 633, 2006.
- [118] N. Bhaskar, V., K. Lalitha, K. Modi, C. Govindaraju, and R.G. Radha, "Utilization of Meat Industry by Products: Protein Hydrolysate from Sheep Visceral Mass," *Bioresource Technol*, pp. 388 – 394, 2007.
- [119] B.L. Jones, D. Fontanini, M. Jarvinen, and A. Pekkarinen, "Simplified Endoproteinase Assays Using Gelatin or Azogelatin," *Anal Biochem*, vol. 263, pp. 214 - 220, 1997.

- [120] U.K. Laemmli, "Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4," *Nature*, vol. 227, pp. 680 – 685, 1970.
- [121] R.C. Judd, "SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Peptides," in *The Protein Protocols Handbook (Methods in Molecular Biology)*: Humana Press Inc, 1996, pp. 101 - 107.
- [122] I. Schechter and A. Berger, "On the Size of the Active Site in Proteases. I. Papain.," *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 27, pp. 157 - 162, 1967.
- [123] H. Capiralla, T. Hiroi, T. Hirokawa, and S. Meada, "Purification and Characterization of a Hydrophobic Amino Acid-specific Endopeptidase from Halobacterium S9 with potential Application in Debitting of Protein Hydrolysates," *Proc Biochem*, vol. 38, pp. 571 - 579, 2002.
- [124] P. Schieberle and, P. Steinhaus, "Characterization of the Key Aroma Compounds in Soy Sauce Using Approaches of Molecular Sensory Science," *J Agric Food Chem*, vol. 55, pp. 6262 - 6269, 2007.
- [125] I. Blank, P. Schieberle, and W. Grosch, "Quantification of the Flavor Compounds 3-Hydroxy-4,5-Dimethyl-2(5H)-Furanone (Sotolone) and 5-Ethyl-3-Hydroxy-4-Methyl-2(5H)-Furanone (Abhexone) by a Stable Isotope Dilution Assay," *In Progress Flavour Precursor Stu.*

6.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Geschätzte Anzahl von Peptidasen aus Basidiomyceten mit bekanntem Genom.	6
Table 2:	Peptidase activity of basidiomycetes grown in submerged gluten cultures.....	18
Table 3:	Peptidase activity and growth rate of <i>F. velutipes</i> in surface cultures with different substrates.	21
Tabelle 4:	Aktivität verschiedener Enzyme in SNL- (Standardnährmedium) und Glutenculturen von <i>F. velutipes</i> detektiert mit einem API-ZYM® Assay. Die Werte zwischen 0 – 5 zeigen die detektierte Aktivität (0 = nicht aktiv, 5 = sehr aktiv).	29
Tabelle 5:	Benennung der extrazellulären Peptidasen entsprechend ihres nativen Molekulargewichts	31
Tabelle 6:	Isoelektrische Punkte der extrazellulären Peptidasen von <i>F. velutipes</i>	34
Tabelle 7:	Inhibition von <i>F. velutipes</i> Peptidasen mit verschiedenen Peptidasehemmern in unterschiedlichen Konzentrationen bei Verwendung eines photometrischen Assays mit Azocasein.....	35
Tabelle 8:	Maximal erreichte Proteinkonzentration in Proben einzelner Peptidasen nach Aufreinigung.....	45
Tabelle 9:	Klassifizierung von <i>F. velutipes</i> Peptidasen mittels Peptidsequenzvergleich	47
Tabelle 10:	Zuordnung der <i>F. velutipes</i> Peptidasen gemäß der MEROPS Peptidase Database.....	49
Tabelle 11:	Molmasse der <i>F. velutipes</i> Peptidasen nach Denaturierung.....	58
Tabelle 12:	Via RP-HPLC analysierte Enzym / Substratkombinationen	63
Tabelle 13:	Zusammenfassung der Charakterisierung von Fvp150.....	75
Tabelle 14:	Zusammenfassung der Charakterisierung von Fvp37.....	76
Tabelle 15:	Zusammenfassung der Charakterisierung von Fvp32.....	76
Tabelle 16:	Zusammenfassung der Charakterisierung für Fvp27	76
Tabelle 17:	Zusammenfassung der Charakterisierung von Fvp15.....	76
Tabelle 18:	Medien für die Kultivierung: SNL Medium	102
Tabelle 19:	Medien für die Kultivierung: Minimalmedium.....	102
Tabelle 20:	Medien für die Kultivierung: Spurenelementlösung	102
Tabelle 21:	Zusammensetzung Single Gel.....	108
Tabelle 22:	Lösungen für die Single Gel PAGE: 2 x Puffer	108
Tabelle 23:	Lösungen für die Single Gel PAGE: APS-Lsg.	108
Tabelle 24:	Lösungen für die Single Gel PAGE: Probenauftragspuffer	108
Tabelle 25:	Lösungen für die Single Gel PAGE: 10 x Elektrophorese-Laufpuffer.....	108
Tabelle 26:	Gelzusammensetzung präparative PAGE nach [120].....	109
Tabelle 27:	Gelzusammensetzung High Resolution PAGE	110
Tabelle 28:	Verwendete Lösungen für die High Resolution PAGE	110
Tabelle 29:	Lösung für Coomassie Brilliant Blue Färbung	111
Tabelle 30:	Verwendete Lösungen für die Silberfärbung	112
Tabelle 31:	Verwendete chromatografische Matrices für die Aufreinigung von Peptidasen.....	113
Tabelle 32:	Übersicht Methoden für verschiedene Säulenmatrices	113
Tabelle 33:	Verwendete Peptidaseinhibitoren	114
Tabelle 34:	Konzentration Peptidasekonzentrate in HPLC.	116
Tabelle 35:	Gradientenprogramm RP-HPLC 1 (für Nachweis von Protaminhydrolyse mit Peptidasekonzentrat).....	117
Tabelle 36:	Gradientenprogramm für RP-HPLC 2 (für übrige Nachweise).....	117
Tabelle 37:	Gradientenprogramm (linear) für die HPLC Analyse von PITC-Aminosäuren.	118
Tabelle 38:	Allgemeine Geräte	119
Tabelle 39:	Chemikalien für die Proteinaufreinigung und Charakterisierung	119
Tabelle 40:	Lösungsmittel.....	122

Tabelle 41:	Chemikalien für Nährmedien	122
Tabelle 42:	pH Werte der Fraktionen aus präp. IEF.....	126
Tabelle 43:	HIC mit Phenyl Sepharose FF (high sub), Vorversuch zur Feststellung der Eignung von HIC zur Peptidaseaufreinigung.....	127
Tabelle 44:	HIC mit Butyl Sepharose, Versuch zur Aufreinigung einzelner Peptidasen mit Stufengradient.....	129
Tabelle 45:	HIC mit Butyl Sepharose, Versuch zur Aufreinigung einzelner Peptidasen mit Stufengradient.....	130
Tabelle 46:	HIC mit Butyl Sepharose, Versuch zur Abtrennung der Peptidasen vom Kulturunterstand.....	131
Tabelle 47:	HIC mit Phenyl Sepharose (low sub) FF zur Aufreinigung einzelner Peptidasen durch Elution mit Stufengradient.....	132
Tabelle 48:	HIC mit Phenyl Sepharose (low sub) FF zur Aufreinigung einzelner Peptidasen durch Elution mit Stufengradient.....	133
Tabelle 49:	HIC mit Octyl Sepharose FF, 2 Versuche zur Aufreinigung einzelner Peptidasen mit Stufengradient.....	134
Tabelle 50:	HIC mit Octyl Sepharose FF, 2 Versuche zur Aufreinigung einzelner Peptidasen mit Stufengradient.....	135
Tabelle 51:	HIC mit Phenyl Sepharose FF (high sub), Versuch zur Aufreinigung der Peptidasen vom Kulturunterstand.....	136
Tabelle 52:	HIC mit Phenyl Sepharose FF (high sub), Aufreinigung der Peptidasen vom Kulturunterstand im präparativen Maßstab.	137
Tabelle 53:	SEC mit Superdex 75, Versuch zur Aufreinigung einzelner Peptidasen.....	138
Tabelle 54:	SEC mit Superdex 75, Versuch zur Aufreinigung einzelner Peptidasen.....	139
Tabelle 55:	SEC mit Superose 6 zur Aufreinigung einzelner Peptidasen.	140
Tabelle 56:	IEX mit SP Sepharose zur Aufreinigung einzelner Peptidasen mit linearem Gradient.	141
Tabelle 57:	IEX mit SP Sepharose zur Aufreinigung einzelner Peptidasen.....	142
Tabelle 58:	IEX mit Q Sepharose zur Aufreinigung einzelner Peptidasen.....	143
Tabelle 59:	IEX mit DEAE Sepharose zur Aufreinigung einzelner Peptidasen mit speziellem Stufengradient.....	144
Tabelle 60:	IEX mit DEAE Sepharose zur Aufreinigung einzelner Peptidasen mit Stufengradient.....	145
Tabelle 61:	IEX mit ANX Sepharose zur Aufreinigung einzelner Peptidasen mit linearem Gradient.	146
Tabelle 62:	IEX mit Mono Q1 Sepharose zur Aufreinigung einzelner Peptidasen.....	147

6.3 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Bei der Hydrolyse von pflanzlichen Proteinen mit Salzsäure gebildete toxische Chlorpropanole.	7
Abbildung 2:	<i>F. velutipes</i> in Versuchskultur auf Hanffaser (links, Institut für Lebensmittelchemie, Hannover), kultivierte Form als Speisepilz (Enokitake, Mitte, www.mushroomexpert.com) und als Wildform (rechts, www.rxwildlife.org.uk).	10
Abbildung 3:	<i>L. sulphureus</i> als Wildform (Institut für Lebensmittelchemie, Hannover).	10
Figure 4:	Gelatin zymography of culture supernatants of <i>F. velutipes</i> (Fve), <i>Trametes ssp.</i> (Trs), <i>Armillaria mellea</i> (Ame), <i>Gloeopyllum odoratum</i> (God), <i>Auricularia auricula-judae</i> (Aaj), <i>Heridium erinaceus</i> (Her), <i>Kuehneromyces mutabilis</i> (Kmu), <i>Pleurotus ostreatus</i> (Pos), <i>Meripilus giganteus</i> (Mgi), <i>Macrolepiota procera</i> (Mpr), <i>Marasmius scorodonius</i> (Msc), <i>Phallus impudicus</i> (Phi), <i>Phellinus ssp.</i> (Phs), <i>Serpula lacrymans</i> (Sla), <i>Xerula radicata</i> (Xra) and <i>Wolfiporia cocos</i> (Wco). M = Marker. All fungi were cultured submerged in gluten medium. Nearly all fungi showed a variety of extracellular peptidases, visible as white bands.	20
Figure 5:	Development of peptidase activity, protein concentration and pH value in supernatant of submerged gluten induced culture and peptidase activity in supernatant of culture without gluten induction (standard medium) of <i>F. velutipes</i>	20
Figure 6:	Peptidase activity of surface cultures of <i>F. velutipes</i> on different substrates.	23
Figure 7:	Peptidase activity in the supernatant of submerged cultures of <i>Trametes ssp.</i> and <i>F. velutipes</i> with 4 % of gluten (w/v) vs. a koji culture of <i>F. velutipes</i>	24
Figure 8:	Development of peptidase activity, soluble protein content and degree of gluten hydrolysis in koji cultures of <i>F. velutipes</i>	25
Figure 9:	Gelatin zymography of peptidase activity of <i>F. velutipes</i> koji cultures from day 1 to day 14 (lanes 1 – 14 from left to right, lane 1 – 5 undiluted supernatant, 6 – 10 supernatant was diluted 1:20 and lanes 11 – 14 1:50).	26
Abbildung 10:	Kontrollstreifen vom API-ZYM® Assay einer sieben Tage alten, gluteninduzierten Kultur von <i>F. velutipes</i>	28
Abbildung 11:	Verschiedene Zymografien mit Peptidasekonzentrat und teilgereinigten Peptidasen aus <i>F. velutipes</i> Kulturüberstand. Wegen Konzentrationsunterschieden und unterschiedlicher pH Optima können nicht alle Peptidasen gleichzeitig auf einem Gel visualisiert werden. 1: Fvp250 und Fvp150, 2: Fvp75, Fvp37, Fvp35, Fvp32 und Fvp27, 3: Fvp250, Fvp150, Fvp75, Fvp37, Fvp35, Fvp27, 4: Fvp27 und Fvp15.	30
Abbildung 12:	Zusammensetzung des extrazellulären Peptidasegemisches von <i>F. velutipes</i> bei Supplementation mit unterschiedlichen Substraten nach 11 Tagen Wachstum.	32
Abbildung 13:	Analytische IEF mit <i>F. velutipes</i> konzentriertem Kulturüberstand. Oben: M = Marker, Mitte: Gelatine Overlay zur Detektion peptidolytischer Aktivität, unten: IEF mit Kulturüberstand, gefärbt mit Coomassie.	33
Abbildung 14:	Präparative IEF mit konzentriertem Kulturüberstand von <i>F. velutipes</i> , Auftrennung der Proteine erfolgte über einen pH Bereich von pH 3 – 10.	33
Abbildung 15:	Zymografie von Peptidasehemmung mit verschiedenen Inhibitoren, der Inhibitor wurde dem Inkubationspuffer beigelegt. 1 = <i>F. velutipes</i> Peptidasekonzentrat (Konz.) ohne Inhibitor, 2 = Konz. + 100 µM Antipain, 3 = Konz. + 10 µM EDTA, 4 = Konz. + 1 µM Pepstatin.	35
Abbildung 16:	Zymografie mit inhibierten Proben aus Peptidasekonzentrat mit verschiedenen Inhibitoren (Inhibitorkonzentrationen wie in Abbildung 15). Die Inhibition der Proben fand vor dem Auftrag auf das Gel statt.	36

Abbildung 17:	Temperaturoptimum des Peptidasekonzentrates von <i>F. velutipes</i> .	37
Abbildung 18:	pH Optimum des Peptidasekonzentrates von <i>F. velutipes</i> .	37
Abbildung 19:	Zymografie mit Proben von <i>F. velutipes</i> (Fve) Peptidasekonzentrat und zum Vergleich <i>Laetiporus sulphureus</i> (Lsu) Kulturüberstand. Links: Gelinkubation bei pH 7,5 (Kaliumphosphat, 50 mM), rechts: Gelinkubation bei pH 3,8 (Natriumcitrat, 50 mM).	38
Abbildung 20:	Chromatogramm von einer FPLC / HIC Aufreinigung von <i>F. velutipes</i> Kulturüberstand. Anfangskonditionen: 1 M Ammoniumsulfat, Elution ohne Gradient bei 0 M Ammoniumsulfat.	40
Abbildung 21:	Zymografie mit Fraktionen von <i>F. velutipes</i> Kulturüberstand, aufgereinigt über FPLC / HIC mit einer 20 mL Phenyl Sepharose (high sub) FF Säule.	40
Abbildung 22:	Apparatur der präparativen SDS-PAGE mit 2 mL Peptidasekonzentrat im Sammelgel (sichtbar als dunkelbrauner Ring).	41
Abbildung 23:	Zymografie (12 %) mit konzentrierten Fraktionen aus der präparativen PAGE (Auswahl). Konz. = Peptidasekonzentrat (Kontrolle).	42
Abbildung 24:	Chromatogramm von FPLC mit schwachem Anionentauscher (DEAE Sepharose FF, 20 mL) mit 2 mL Peptidasekonzentrat (vorgereinigt via präparativer HIC Chromatografie).	43
Abbildung 25:	Zymografie von ausgewählten Fraktionen aus Anionentauscher (DEAE FF) FPLC (Abbildung 24).	44
Abbildung 26:	Im zweistufigen Verfahren erfolgreich aufgereinigte Peptidasen aus <i>F. velutipes</i> Kulturunterstand.	45
Abbildung 27:	Sequenzvergleich zwischen den bekannten Partialsequenzen von Fvp37 und der Subtilase S08.139 (PoSI (<i>Pleurotus ostreatus</i>)-type Peptidase) aus <i>P. ostratus</i> .	51
Abbildung 28:	Sequenzvergleich zwischen bekannten Partialsequenzen von Fvp27 und "Acid prolyl endopeptidase" (S238N-H82) aus der Familie S28.004.	52
Abbildung 29:	Alignment von Partialsequenz von Fvp32 mit Partialsequenz eines hypothetischen Proteins (Peptidasefamilie S41) aus <i>Schizophyllum commune</i> (H4-8) in [54].	52
Abbildung 30:	Alignment von Sequenz aus Fvp15 mit Peptidyl-Lys Metallopeptidase 35.004 aus <i>Pleurotus ostreatus</i> , Molekulargewicht: 17,926 g mol ⁻¹ .	53
Abbildung 31:	Alignment von Partialsequenz von Fvp15 mit der hypothetischen Fungalysin [M36.001] Peptidase aus <i>L. bicolor</i> (MER120410).	54
Abbildung 32:	Alignment von Partialsequenz aus Fvp15 mit einem Fungalysin aus <i>Coprinopsis cinerea</i> .	55
Abbildung 33:	Größenausschlusschromatografie (SEC) mit 200 µL <i>F. velutipes</i> Peptidasekonzentrat (Vorreinigung via HIC). Matrix: Superdex 200, 20 mL, Natriumacetat, 50 mM, pH 7,0. Fluss: 0,5 mL min ⁻¹ .	56
Abbildung 34:	Zymografie (links) und native PAGE (rechts) mit Fraktionen aus SEC mit Superdex 200.	57
Abbildung 35:	PAGE / native PAGE mit nativen und denaturierten Proben von Fvp150, Fvp37, Fvp27 und Fvp15 (je 5 µL / Tasche).	57
Abbildung 36:	PAGE mit zuvor aus nativer PAGE ausgeschnittenen, denaturierten Banden von Fvp150, Fvp37, Fvp27 und Fvp15.	58
Abbildung 37:	Relative Peptidaseaktivität einzelner Peptidasen mit den Substraten Azocasein und Azogelatine.	59
Abbildung 38:	Native SDS-PAGE (links) und Zymografie (rechts) mit Proben aus Hydrolyseversuchen von <i>F. velutipes</i> Peptidasen und bovine serum albumine (BSA) als Substrat nach 0 Stunden Inkubation (Negativkontrolle). Sichtbar sind jeweils die BSA Bande bei 69 kDa sowie die der Peptidasen in entsprechender Größe.	60

Abbildung 39:	Native SDS-PAGE mit Proben aus Hydrolyseversuchen nach 24 und 90 Stunden Inkubation bei 37 °C von <i>F. velutipes</i> Peptidasen mit Albumin aus Rinderserum (BSA) als Substrat.....	61
Abbildung 40:	Schematische Darstellung der Hydrolyse des Gly-Pro-pNA Peptids durch prolylspezifische Dipeptidyl- und Carboxypeptidasen der Familie S28.....	62
Abbildung 41:	Substratspezifität der extrazellulären <i>F. velutipes</i> Peptidasen.....	62
Abbildung 42:	Chromatogramm Overlay zur Bestimmung des Abbaus von Protamin durch <i>F. velutipes</i> Peptidasekonzentrat. X = Peptidasekonzentrat + Protamin, Y = Peptidasekonzentrat Blindwert, Z = Protamin Blindwert.....	64
Abbildung 43:	Chromatogramm Overlay (Ausschnitt) zur Bestimmung des Abbaus von Protamin durch Fvp15. X = Peptidasekonzentrat + Protamin, Y = Protamin Blindwert, Z = Peptidasekonzentrat Blindwert.....	65
Abbildung 44:	Chromatogramm Overlay zur Bestimmung des Abbaus von Angiotensin durch Fvp37. X = Fvp37 + Angiotensin, Y = Angiotensin Blindwert, Z = Fvp37 Blindwert.....	65
Abbildung 45:	Chromatogramm-Overlay zur Bestimmung des Abbaus von Casein durch Peptidasekonzentrat, Fvp37, Fvp27 und Fvp150. 1 = Casein Blindwert, 2 = Fvp37 + Casein, 3 = Fvp27 + Casein, 4 = Fvp150 + Casein und 5 = Peptidasekonzentrat + Casein.....	66
Abbildung 46:	HPLC-Chromatografie zur Bestimmung der Spaltstellenspezifität von Fvp27 mit dem Substrat "Insulin b-chain ox.". Proben: X = Fvp27 + Substrat, Y = Substrat Blindwert, Z = Fvp27 Blindwert. Peak bei 18,7 min = Alanin und 19,3 min = Prolin.....	67
Abbildung 47:	Aminosäuresequenz des Substrates „Insulin b-chain ox.“. Eingezeichnete Aminosäuren wurden als Phenylthiohydantoin-Aminosäurederivate nach der Hydrolyse mit Fvp27 gefunden.....	67
Abbildung 48:	Temperaturoptimum von Fvp37.....	69
Abbildung 49:	pH Optimum von Fvp37.....	69
Abbildung 50:	Aktivität von Fvp37 bei Zugabe von Natriumchlorid in verschiedenen Konzentrationen.....	70
Abbildung 51:	Aktivität von Fvp37 bei Zugabe von Calciumchlorid in verschiedenen Konzentrationen.....	70
Abbildung 52:	Inhibition von Fvp37 durch verschiedene Serinpeptidasehemmer.....	71
Abbildung 53:	Temperaturoptimum von Fvp27.....	72
Abbildung 54:	pH Optimum von Fvp27.....	72
Abbildung 55:	Inhibition von Fvp27 durch verschiedene Serinpeptidasehemmer.....	73
Abbildung 56:	Temperaturoptimum von Fvp150.....	73
Abbildung 57:	pH Optimum von Fvp150.....	74
Abbildung 58:	Gelatinezymografie mit Proben von verdünnten Peptidasekonzentrat, inkubiert für 120 Minuten bei verschiedenen Temperaturen zur Ermittlung der Temperaturstabilität.....	74
Abbildung 59:	Zymografien zur Bestimmung der peptidolytischen Restaktivität einzelner Peptidasen. Links: Vor Versuchsbeginn, rechts: nach 90 h Inkubation bei 37°C.....	75
Figure 60:	Amino acid pattern generated from gluten by extracellular peptidasen of the edible mushroom <i>Laetiporus sulphureus</i> ("Chicken Polypore"); isoleucine marked.....	80
Figure 61:	Heterocycles in the supernatant of <i>L. sulphureus</i> on gluten.....	81
Figure 62:	Formation of hydroxyisoleucine (HIL) concomitant to gluten hydrolysis.....	82
Abbildung 63:	Glutenin, low molecular weight subunit PTDUCD1, Sequenz von UniProt [98].....	92
Abbildung 64:	α - β -Gliadin MM1, 307 Aminosäuren, Sequenz von UniProt [98].....	93
Abbildung 65:	Kultivierung von <i>F. velutipes</i> auf Glutenpellets („Koji-Gluten“). Von links nach rechts: Frisch mit Mycel angeimpfte Glutenpellets, Kultur nach sieben Tagen (Trophophase), Kultur nach 16 Tagen (Idiophase) und 50 Tagen (Pilz ist abgestorben).....	124

Abbildung 66:	<i>F. velutipes</i> auf Glutenpellets in Scheidetrichterkultur.....	125
Abbildung 67:	Zymografie zur Auswertung der präparativer IEF.....	126
Abbildung 68:	Chromatogramm zu FPLC 1.....	127
Abbildung 69:	Zymografie zur Auswertung von FPLC 1.....	128
Abbildung 70:	Chromatogramm zu FPLC 2.....	129
Abbildung 71:	Zymografie zur Auswertung von FPLC 2.....	129
Abbildung 72:	Chromatogramm zu FPLC 3.....	130
Abbildung 73:	Zymografie zur Auswertung von FPLC 3.....	130
Abbildung 74:	Chromatogramm zu FPLC 4.....	131
Abbildung 75:	Zymografie zur Auswertung von FPLC 4.....	131
Abbildung 76:	Chromatogramm zu FPLC 5.....	132
Abbildung 77:	Zymografie zur Auswertung von FPLC 5.....	132
Abbildung 78:	Chromatogramm zu FPLC 6.....	133
Abbildung 79:	Zymografie zur Auswertung von FPLC 6.....	133
Abbildung 80:	Chromatogramm zu FPLC 7.....	134
Abbildung 81:	Zymografie zur Auswertung von FPLC 7.....	134
Abbildung 82:	Chromatogramm zu FPLC 8.....	135
Abbildung 83:	Zymografie zur Auswertung von FPLC 8.....	135
Abbildung 84:	Chromatogramm zu FPLC 9.....	136
Abbildung 85:	Zymografie zur Auswertung von FPLC 9.....	136
Abbildung 86:	Chromatogramm zu FPLC 10.....	137
Abbildung 87:	Zymografie zur Auswertung von FPLC 10.....	137
Abbildung 88:	Chromatogramm zu FPLC 11.....	138
Abbildung 89:	Zymografie zur Auswertung von FPLC 11.....	138
Abbildung 90:	Chromatogramm zu FPLC 12.....	139
Abbildung 91:	Zymografie zur Auswertung von FPLC 12.....	139
Abbildung 92:	Chromatogramm zu FPLC 13.....	140
Abbildung 93:	Zymografie zur Auswertung von FPLC 13.....	140
Abbildung 94:	Chromatogramm zu FPLC 14.....	141
Abbildung 95:	Zymografie zur Auswertung von FPLC 14.....	141
Abbildung 96:	Chromatogramm zu FPLC 15.....	142
Abbildung 97:	Zymografie zur Auswertung von FPLC 15.....	142
Abbildung 98:	Chromatogramm zu FPLC 16.....	143
Abbildung 99:	Zymografie zur Auswertung von FPLC 16.....	143
Abbildung 100:	Chromatogramm zu FPLC 17.....	144
Abbildung 101:	Zymografie zur Auswertung von FPLC 17.....	144
Abbildung 102:	Chromatogramm zu FPLC 18.....	145
Abbildung 103:	Zymografie zur Auswertung von FPLC 18.....	145
Abbildung 104:	Chromatogramm zu FPLC 19.....	146
Abbildung 105:	Zymografie zur Auswertung von FPLC 19.....	146
Abbildung 106:	Chromatogramm zu FPLC 20.....	147
Abbildung 107:	Zymografie zur Auswertung von FPLC 20.....	148
Abbildung 108:	HPLC Chromatogramm zu Hydrolyseversuch 1: Protamin + Fvp15.....	149
Abbildung 109:	HPLC Chromatogramm zu Hydrolyseversuch 1- Blindwert Protamin.....	150
Abbildung 110:	HPLC Chromatogramm zu Hydrolyseversuch 1 – Blindwert Fvp15.....	151
Abbildung 111:	HPLC Chromatogramm zu Hydrolyseversuch 2 – Protamin + <i>F. velutipes</i> Peptidasekonzentrat.....	152
Abbildung 112:	HPLC Chromatogramm zu Hydrolyseversuch 2 – Blindwert Protamin.....	153
Abbildung 113:	HPLC Chromatogramm zu Hydrolyseversuch 2 – Blindwert Peptidasekonzentrat.....	153
Abbildung 114:	HPLC Chromatogramm zu Hydrolyseversuch 3 – Angiotensin + Fvp37.....	154
Abbildung 115:	HPLC Chromatogramm zu Hydrolyseversuch 3 – Blindwert Angiotensin.....	155
Abbildung 116:	HPLC Chromatogramm zu Hydrolyseversuch 2 – Blindwert Fvp37.....	155

Abbildung 117: HPLC Chromatogramm zu Hydrolyseversuch 4 – Casein + Peptidasekonzentrat.	156
Abbildung 118: HPLC Chromatogramm zu Hydrolyseversuch 4 – Casein + Fvp150.	157
Abbildung 119: HPLC Chromatogramm zu Hydrolyseversuch 4 – Casein + Fvp37.	158
Abbildung 120: HPLC Chromatogramm zu Hydrolyseversuch 4 – Casein + Fvp27.	159
Abbildung 121: HPLC Chromatogramm zu Hydrolyseversuch 4 – Blindwert Casein.	160

Lebenslauf

- 04/ 2007 – 03/2011 Wissenschaftliche Angestellte und Promotionsstudentin am Institut für Lebensmittelchemie, Leibniz Universität Hannover
- 02/ 2007 – 03/2007 Berufspraktikum im Institut für Mikrobiologie, Universität Erlangen
- 03/2004 – 01/ 2007 Studium der „Holzbiologie / Holztechnologie“ an der Fakultät für Forstwissenschaften, Universität Göttingen,
Abschluss: Master of Science (M.Sc.) der Forstwissenschaften
- 09/2006 – 10/2006 Berufspraktikum bei SP, Technical Research Institute of Sweden, Bereich Wood Technology and Wood Construction, Borås und Stockholm, Schweden
- 09/1999 – 01/2004 Studium der Forstwirtschaft an der Fachhochschule Hildesheim / Holzminden / Göttingen am Standort Göttingen,
Abschluss: Diplom-Ingenieur (FH)
- 09/1999 – 02/2000 Berufspraktikum im Forstamt Nienburg / Niedersachsen
- 03/2003 – 07/2003 Berufspraktikum im Forstamt Fuhrberg / Niedersachsen
- 06/1999 Abitur, Gymnasium Gaußstraße, Neustadt am Rübenberge

Veröffentlichungen

Articles in international scientific journals with peer review

- 1) J. Amon, T. Bräu, **A. Grimrath**, E. Hänßler, K. Hasselt, M. Höller, N. Jeßberger, L. Ott, J. Szököl, F. Titgemeyer and A. Burkovski, "Nitrogen control in *Mycobacterium smegmatis*: Nitrogen-Dependent Expression of Ammonium Transport and Assimilation Proteins depends on OmpR-Type Regulator GlnR", *Bacteriol.*, 2008, 190:7108-7116
- 2) **A. Grimrath**, P. Berends, S. Rabe, R. G. Berger, D. Linke "Koji fermentation based on extracellular peptidases of *Flammulina velutipes*", *Eur. Food Res. Technol.*, 2010, Article in press, DOI: 10.1007/s00217-010-1401-9
- 3) U. Krings, **A. Grimrath**, D. Linke, S. Schindler and R. G. Berger, "Volatiles responsible for the Seasoning-like Flavour of Cell Cultures of *Laetiporus sulphureus*", *Flavour Fragr. J.*, 2011, Article in press, DOI 10.1002/ffj.2040

Articles in German scientific journals

- 1) U. Krings **A. Grimrath**, D. Linke, S. Schindler, R. G. Berger, "Formation of Sotolon – Enzyme Catalyzis or Chemical Reaction?" 9th Wartburg Symposium on Flavor Chemistr & Biology, April 13th – April 16th, 2010, Eisenach, Germany
- 2) **A. Grimrath**, N. Eisele, D. Linke, P. Berends, S. Rabe and R. G. Berger, "Potent Peptidases from Basidiomycete Fungi and Their Characterization Upon Heterologous Expression in *E. coli*", 5th International Congress on Biocatalysis (BioCat2010) Hamburg (Germany), 2010, Book of Abstracts, 58.
- 3) **Grimrath A**, Linke D, Berger R.G., "Neue Enzyme aus Basidiomyceten zur enzymatischen Glutenhydrolyse, Lebensmittelchemie", 2010, Article in press.

Hiermit erkläre ich, Aletta Grimrath, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und keine anderen Hilfsmittel als die angegebenen verwendet habe. Jene Stellen, die ich anderen Unterlagen und Arbeiten dem Wortlaut oder Sinn entsprechend entnommen habe, sind durch Quellenangaben gekennzeichnet.

Weiterhin versichere ich, dass die vorliegende Arbeit nicht als Diplomarbeit oder ähnliche Prüfungsarbeit verwendet wurde.

Aletta Grimrath