

Limitierende Faktoren der enzymatischen Weizenglutenhydrolyse

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

Doktorin der Naturwissenschaften

Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

von

Dipl.-Lebensmittelchem.

Lucienne Giesler

geboren am 18.03.1988 in Werdau

2014

Referent: Prof. Dr. Dr. R. G. Berger

Korreferent: Prof. Dr. A. Hahn

Tag der Promotion: 14.10.2014

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Dr. Ralf G. Berger für die wissenschaftliche Betreuung dieser Arbeit, die stete Diskussionsbereitschaft, das entgegengebrachte Vertrauen und den eingeräumten Freiraum zur Bearbeitung des Themas sowie die Bereitstellung der hervorragenden Arbeitsbedingungen am Institut.

Herzlichst danken möchte ich zudem Frau Dr. Diana Linke für ihre herausragende Betreuung und ihr offenes Ohr für Anliegen aller Art. Ihre Anregungen, wertvollen Tipps und geduldigen Erklärungen haben entscheidend zum erfolgreichen Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Mein Dank gilt außerdem Herrn PD Dr. Ulrich Krings, der mir mit seinem fachlichen Rat, insbesondere zur LC-MS/MS, stets zur Seite stand.

Herrn Prof. Dr. Andreas Hahn (Institut für Lebensmittelwissenschaft und Humanernährung, Leibniz Universität Hannover) danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferats und Frau Prof. Dr. Ursula Rinas (Institut für Technische Chemie, Leibniz Universität Hannover) für die Bereitschaft, den Vorsitz meiner Disputation zu übernehmen.

Des Weiteren gilt mein ausdrücklicher Dank allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Lebensmittelchemie für die hervorragende Arbeitsatmosphäre, die hilfsbereite Zusammenarbeit sowie die gemeinsam verbrachte Zeit. Unsere Gemeinschaft hat mir viel Freude bereitet.

Weiterhin danke ich von ganzem Herzen meinen Eltern, Beate und Frank Giesler, die mich in meinem Leben immer unterstützt und gefördert haben, meinen Wünschen und Plänen gegenüber offen waren und mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite standen. Ein besonderer Dank gilt zu guter Letzt meinen Geschwistern, Alicia und Philipp Giesler, meinem Partner und all meinen Freunden für ihre direkte und indirekte Hilfe, die Inspiration, den moralischen Beistand und das Verständnis.

Vorbemerkung

Diese Dissertationsschrift basiert auf einem bislang unveröffentlichten Manuskript und Arbeiten, die in folgenden *peer reviewed* Publikationen veröffentlicht wurden:

- Giesler, L.; Linke, D.; Rabe, S.; Appel, D.; Berger, R. G., (2013). Hydrolysis of wheat gluten by combining peptidases of *Flammulina velutipes* and electro dialysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(36), 8641-8649.
- Giesler, L.; Linke, D.; Berger, R. G., (2014). Factors limiting the enzymatic hydrolysis of wheat gluten. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(20), 4762-4768.

Nachfolgend gelistete Veröffentlichungen, Poster und Vorträge wurden im Rahmen dieser Doktorarbeit erarbeitet, sind jedoch nicht Gegenstand dieser Dissertationsschrift.

Posterpräsentation:

- Giesler, L.; Linke, D.; Berger, R. G.: Milk clotting using aspartic peptidases from Basidiomycetes. 6th International Congress on Biokatalysis, Hamburg, 02. – 06. September 2012
- Giesler, L.; Linke, D.; Berger, R. G.: Limiting Factors of enzymatic wheat gluten hydrolysis. Arbeitstagung des Regionalverband Nord, Lebensmittelchemische Gesellschaft, Hamburg School of Food Science, Hamburg, 24. – 25. März 2014

Vorträge:

- Giesler, L.; Linke, D.; Berger, R. G.: Peptidolyse plus Elektrodialyse zur Gewinnung von Speisewürze. DECHEMA Vortrags- und Diskussionstagung: Effiziente Verfahren und Anlagen in der Bioverfahrenstechnik und Lebensmittelbiotechnologie, Bad Wildungen, 06. – 08. Mai 2013
- Giesler, L.; Linke, D.; Berger, R. G.: Peptidolyse plus Elektrodialyse: Gewinnung von Speisewürze aus (dem Nebenstrom) Weizengluten. Arbeitstagung des Regionalverband Nord, Lebensmittelchemische Gesellschaft, Hamburg School of Food Science, Hamburg, 18. – 19. Februar 2013

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	IV
Zusammenfassung	VI
Abstract	VII
1 Einleitung	1
1.1 Peptidasen.....	1
1.1.1 Kommerzielle Peptidasen für die enzymatische Proteinhydrolyse.....	4
1.1.2 Peptidasen aus <i>Flammulina velutipes</i>	6
1.1.3 Prolylspezifische Peptidasen.....	8
1.2 Weizengluhenhydrolysate als Speisewürze.....	10
1.2.1 Geschmacksaktive Substanzen.....	10
1.2.2 Weizengluhen und Glutenintoleranz.....	13
1.2.3 Traditionelle Proteinhydrolyse.....	15
1.2.4 Enzymatische Proteinhydrolyse.....	16
1.3 Elektrodialyse.....	20
1.3.1 Prinzip und Anwendung der konventionellen Elektrodialyse.....	20
1.3.2 Elektrodialyse mit Ultrafiltrationsmembranen.....	23
1.4 Zielsetzung der Arbeit.....	25
2 Vorwort zur Publikation „Hydrolysis of wheat gluten by combining peptidasen of <i>Flammulina velutipes</i> and electro dialysis“	26
3 Hydrolysis of wheat gluten by combining peptidasen of <i>Flammulina velutipes</i> and electro dialysis	27
3.1 Introduction.....	28
3.2 Material and Methods.....	30
3.2.1 Material.....	30
3.2.2 Cultivation of <i>Flammulina velutipes</i>	30
3.2.3 Preparation of wheat gluten hydrolysates.....	30
3.2.4 Quantification of the peptidase activity.....	31
3.2.5 Quantification of L-amino acids.....	31
3.2.6 Quantification of soluble protein amount.....	32
3.2.7 Inhibitor studies.....	32

3.2.8	Influence of hydrolysate components.....	32
3.2.9	Influence of single L-amino acids	32
3.2.10	Electrodialysis	33
3.2.11	Process evaluation	34
3.2.12	Improvement of the conditions of electrodialysis	35
3.2.13	Enzymatic wheat gluten hydrolysis with electrodialysis	35
3.2.14	Statistical analysis	36
3.3	Results and Discussion	36
3.3.1	Inhibitory effect of components of wheat gluten hydrolysate.....	36
3.3.2	Inhibitory effects of L-amino acids	37
3.3.3	Electrodialysis using ion exchange and ultrafiltration membranes.....	40
3.3.4	AMX/CMX configuration.....	40
3.3.5	UF-membrane configuration	41
3.3.6	Combination of electrodialysis and wheat gluten hydrolysis.....	42
3.3.7	Prospects of peptidolysis combined with electrodialysis.....	44
4	Vorwort zur Publikation “Factors limiting the enzymatic hydrolysis of wheat gluten”	47
5	Factors limiting the enzymatic hydrolysis of wheat gluten	48
5.1	Introduction	49
5.2	Materials and Methods	50
5.2.1	Materials.....	50
5.2.2	Cultivation of <i>Flammulina velutipes</i>	50
5.2.3	Peptidase Activity	50
5.2.4	Preparation of wheat gluten hydrolysate	50
5.2.5	Electrodialysis	51
5.2.6	Autopeptidolysis and thermal stability.....	52
5.2.7	SDS-PAGE.....	52
5.2.8	Cleavage sites	52
5.2.9	Statistical analysis	53
5.3	Results and Discussion	53
5.3.1	Electrodialysis using six UF membranes	53
5.3.2	Autopeptidolytic activity of peptidase mixtures	56
5.3.3	Cleavage sites	59
6	Vorwort zu “Purification and characterization of an extracellular prolyl endopeptidase isolated from <i>Flammulina velutipes</i>”	62

7	Purification and characterization of an extracellular prolyl endopeptidase isolated from <i>Flammulina velutipes</i>	63
7.1	Introduction	64
7.2	Material and Methods	65
7.2.1	Materials	65
7.2.2	Cultivation of <i>Flammulina velutipes</i>	65
7.2.3	Peptidase activity	65
7.2.4	Purification of the prolyl endopeptidase	66
7.2.5	SDS-PAGE	66
7.2.6	pH and temperature optima and thermal stability	66
7.2.7	Effect of additives and inhibitors	66
7.2.8	Enzyme kinetics	67
7.2.9	Hydrolysis of chromogenic substrates	67
7.2.10	Hydrolysis of natural substrates and analysis of the products	67
7.2.11	Peptide analysis using LC-MS (QTOF)	68
7.2.12	Statistical analysis	69
7.3	Results and Discussion	70
7.3.1	Purification of an extracellular prolyl-specific peptidase from <i>Flammulina velutipes</i>	70
7.3.2	Enzymatic characterization of Fvp27 and An-Pep	71
7.3.3	Effect of various metal ions, inhibitors and solvents	74
7.3.4	Substrate specificity of Fvp27 and An-Pep	76
8	Ausblick	81
9	Literaturverzeichnis	82
	Lebenslauf	97

Abkürzungsverzeichnis

ACE	Angiotensin Converting Enzyme
AMX	Anionentauschermembran
Ang I	Angiotensin I
Ang 1-7	Angiotensin 1-7
An-Pep	Prolyl-Endopeptidase aus <i>Aspergillus niger</i>
aU	Arbitrary Unit ($\mu\text{mol}/\text{min}$)
BP	Bipolare Membran
CMX	Kationentauschermembran
1,3-DCP	1,3-Dichlor-2-propanol
DFP	Diisopropylfluorophosphat
DH	Degree of Hydrolysis
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPP-II	Dipeptidyl peptidase II
DPP-IV	Dipeptidyl peptidase IV
DTT	Dithiothreitol
EC	Enzyme Commission
ED	Elektrodialyse
EDBM	Elektrodialyse mit bipolaren Membranen
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EMR	Enzym-Membran-Reaktor
ESI-MS/MS	Elektrospray-Ionisations-Tandem-Massenspektrometrie
FPLC	Fast protein liquid chromatography
Fve	<i>Flammulina velutipes</i>
Fvp27	Prolylspezifische Peptidase aus <i>Flammulina velutipes</i>
Fx	Flavourzyme
HPLC	High performance liquid chromatography
IEF	Isoelektrische Fokussierung
3-MCPD	3-Monochlorpropan-1,2-diol
MM	Minimalmedium
MRM	Multiple reaction monitoring
MW	Molecular weight

MWCO	Molecular weight cut off
<i>m/z</i>	Masse- zu Ladungsverhältnis
ND	Not determined
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
pI	Isoelektrischer Punkt
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
<i>p</i> NA	<i>para</i> -Nitroanilin
RP	Reversed phase
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SEC	Size exclusion chromatography
SNL	Standardnährlösung
spp.	Species
TIC	Total ion current
TDI	Tolerable daily intake
U	Unit ($\mu\text{mol}/\text{min}$)
UF	Ultrafiltration
UV	Ultraviolett
<i>w/v</i>	Weight by volume

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

Zusammenfassung

Die enzymatische Weizenglutenhydrolyse zur Produktion von Speisewürze stellt eine umweltfreundliche und unter milderer Bedingungen ablaufende Alternative zur klassischen salzsauren Hydrolyse dar. Mithilfe des Einsatzes von Peptidasemischungen aus Exo- und Endopeptidasen wird die größtmögliche Hydrolyseeffizienz erzielt und die Entstehung von carcinogenen Chlorpropanolen und bitter schmeckenden Peptiden minimiert. Dessen ungeachtet kann mit diesem Verfahren die vollständige Freisetzung aller im Protein vorhandenen Aminosäuren bis dato nicht realisiert werden. Infolgedessen werden in der wissenschaftlichen Literatur zahlreiche mögliche Ursachen der limitierten Peptidolyse postuliert. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde dieser Punkt aufgegriffen, Lösungsansätze untersucht und das kommerziell eingesetzte Präparat Flavourzyme mit einer extrazellulären Enzymmischung aus der Submerskultur des essbaren Basidiomyceten *Flammulina velutipes* verglichen. Dabei kristallisierten sich drei wesentliche limitierende Faktoren für die enzymatische Weizenglutenhydrolyse heraus.

1. Erstmals konnte eine produktinhibierende Wirkung bestimmter Aminosäuren für die eingesetzten Peptidasenpräparate nachgewiesen werden. Darüber hinaus wurde mithilfe der Elektrodialyse ein neues Alternativverfahren zum bisher überwiegend vorgeschlagenen Enzym-Membran-Reaktor für die prozessbegleitende Abtrennung der Produkte unter Erhalt der Peptidaseaktivität optimiert. Der neu etablierte diskontinuierliche Prozess resultierte in einer dreifach höheren Freisetzung an Aminosäuren als der vergleichbare Batchversuch. Unter standardisierten Ausgangsbedingungen wiesen die *Flammulina velutipes* Peptidasen eine deutlich höhere Hydrolyseeffizienz als die Flavourzyme Peptidasen auf. Die höchsten Hydrolysegrade wurden mit niedrigen Glutenkonzentrationen erzielt.
2. Im Gegensatz dazu nahmen die autopeptidolytischen Prozesse der in den Enzymmischungen enthaltenen Peptidasen bei geringen Substratkonzentrationen zu. In den durchgeführten Untersuchungen wies Flavourzyme eine höhere Stabilität als die *Flammulina velutipes* Peptidasen auf.
3. Demgegenüber beeinträchtigt ein Mangel an ausreichenden Spaltstellen im Gluten die Peptidolyse mit Flavourzyme. Dieser Aspekt hat die beschriebene geringere Hydrolyseeffizienz als das Vergleichspräparat aus dem Basidiomyceten zur Folge und könnte mit dem möglichen Fehlen von prolylspezifischen Peptidasen begründet werden.

Flammulina velutipes hingegen sekretiert eine prolylspezifische Endopeptidase (Fvp27), welche eine native Molekülmasse von 27 kDa aufwies und durch typische prolylspezifische und Serin-Peptidase-Inhibitoren inhibiert wurde. Die detaillierte biochemische Charakterisierung dieser Peptidase eröffnet neue katalytische Eigenschaften und Applikationsmöglichkeiten für die Lebensmittel- und Pharmaindustrie (z. B. zur Entbitterung von Proteinhydrolysaten oder der Spaltung Zöliakie auslösender Epitope), da Fvp27 ähnliche Spaltspezifitäten für Weizengliadin wie eine kommerziell verfügbare prolylspezifische Peptidase aus *Aspergillus niger* besitzt.

Schlagwörter: Elektrodialyse, Produktinhibierung, *Flammulina velutipes*

Abstract

The enzymatic hydrolysis of wheat gluten for the production of seasonings is an environmentally friendly and milder alternative to the traditional chemical hydrolysis with hydrochloric acid. Using mixtures of exo- and endopeptidases a maximum hydrolytic efficiency was achieved, while the formation of carcinogenic chloropropanols and bitter-tasting peptides is minimized. Nevertheless, a complete release of all amino acids, which are present in the protein, is not yet reached with this procedure. As a result, numerous possible reasons for factors limiting peptidolysis have been postulated in the scientific literature. The present study focused on these limitations and possible approaches to overcome them. The commercially used peptidase preparation Flavourzyme was compared with an extracellular peptidase mixture from the submerged culture of the edible basidiomycete *Flammulina velutipes*. Three main limiting factors for the enzymatic hydrolysis of wheat gluten were determined.

1. For the first time, certain amino acids were identified to be responsible for product inhibition during the hydrolysis of wheat gluten. In order to overcome the product inhibition a new alternative process, compared to the usually suggested enzyme membrane reactor system, has been optimized using electrodialysis, while maintaining the peptidase activity. The newly established process resulted in a threefold higher release of amino acids than the comparable batch experiments. Under standardized conditions *Flammulina velutipes* peptidases exhibited a significantly higher hydrolysis efficiency than the Flavourzyme peptidases. The highest degrees of hydrolysis were obtained at low gluten concentrations.
2. In contrast, the autopeptidolysis of the peptidases increased at low substrate concentrations. Flavourzyme showed higher stability towards autopeptidolytic activities than the *Flammulina velutipes* peptidases.
3. A lack of sufficient cleavage sites in the wheat gluten limited the peptidolysis with Flavourzyme. This resulted in the described lower hydrolysis efficiency than the comparable hydrolysis with the peptidases of the basidiomycete. This was explained by a possible lack of prolyl specific peptidases.

Flammulina velutipes secreted a prolylspecific endopeptidase (Fvp27) with a native molecular mass of 27 kDa. Fvp27 was inhibited by typical prolylspecific and serine peptidase inhibitors. The extensive biochemical characterization of this peptidase revealed new catalytic properties and possible applications for the food and pharmaceutical industries (e. g. for the debittering of protein hydrolysates or the cleavage of celiac disease epitopes), as Fvp27 showed cleavage specificities for wheat gliadin similar to a commercially available prolylspecific peptidase from *Aspergillus niger*.

Key words: Electrodialysis, product inhibition, *Flammulina velutipes*

1 Einleitung

1.1 Peptidasen

Peptidasen zählen zu den wissenschaftlich am besten erforschten Enzymen, da sie ubiquitär in Eukaryoten und Prokaryoten, sowohl extra- wie intrazellulär vorkommen. Diese Enzyme, deren Funktion die Spaltung von Peptidbindungen ist, sind an diversen essentiellen Prozessen im Organismus, wie z. B. bei der Signalübertragung, der Verdauung, der Wundheilung, dem Proteinkatabolismus, dem Zellwachstum und dem programmierten Zelltod maßgeblich beteiligt. Bei der Peptidolyse wird durch Addition eines Wassermoleküls die Peptidbindung eines Proteins hydrolysiert. Hierbei handelt es sich um eine reversible Reaktion (Rao *et al.*, 1998; Hiemstra, 2002) (Fig. 1-1).

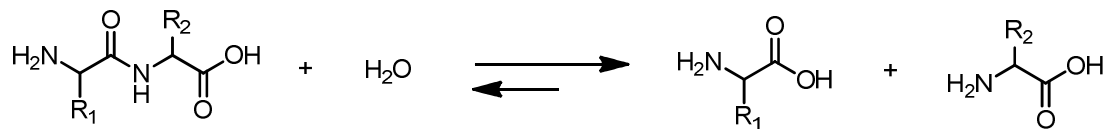


Fig. 1-1 | Reaktionsgleichung der Hydrolyse einer Peptidbindung.

Aus wissenschaftlicher Sicht wird zwischen limitierter und totaler Peptidolyse differenziert. Während die totale Peptidolyse im Organismus dem kompletten Abbau nicht benötigter Proteine und der damit verbundenen Bereitstellung von freien Aminosäuren für die Proteinbiosynthese dient, erfolgt durch die limitierte Peptidolyse, eine definierte Abspaltung einer Aminosäure oder eines Peptids. Die limitierte Peptidolyse ermöglicht damit eine gezielte Aktivierung oder Inaktivierung von Proteinen, wie Hormonen oder Enzymvorstufen (Zymogenen) (Stroud *et al.*, 1977; Khan & James, 1998).

Entsprechend der *Enzyme Commission*-(EC)-Nummerierung zählen Peptidasen (EC 3.4.-.-) zur dritten Enzymklasse, den Hydrolasen. Peptidasen können zum einen anhand der Lokalisation ihrer Spaltstelle in Exo- und Endopeptidasen oder zum anderen basierend auf den katalytisch wirksamen Gruppen im aktiven Zentrum unterschieden werden. Exopeptidasen spalten ausschließlich endständige Aminosäuren oder Peptide ab und Endopeptidasen hydrolysieren das Protein im Inneren (Fig. 1-2).

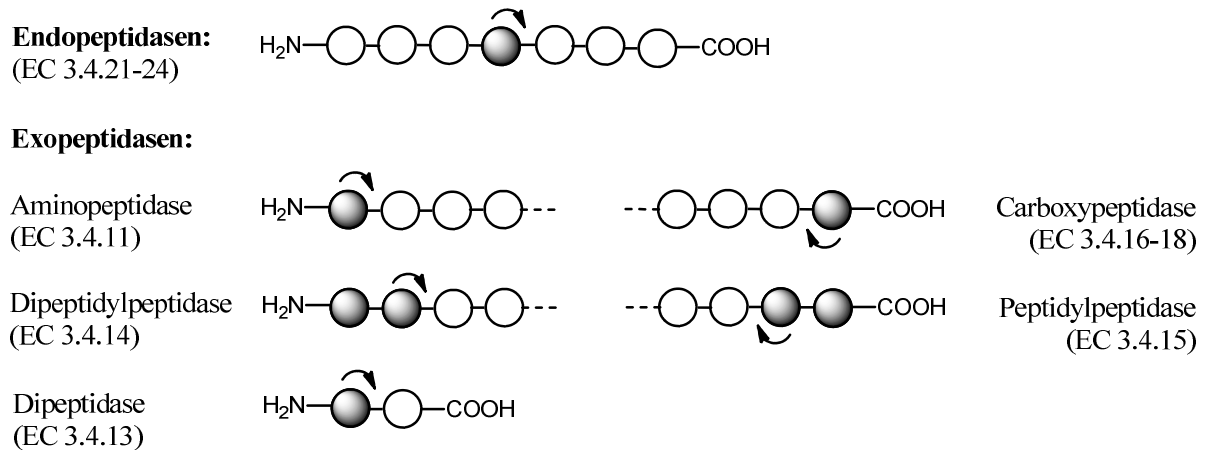


Fig. 1-2 | Klassifizierung der Peptidasen anhand der katalysierten Reaktion nach *Kenny* (1999). Die Aminosäuren der Peptidkette sind als Punkte dargestellt, wobei die schwarzen Pfeile die initiale Spaltung der Peptidbindung darstellen.

Exopeptidasen, die das Peptid vom Carboxy-Ende angreifen, werden entweder als Carboxypeptidasen oder Peptidylpeptidasen bezeichnet. Peptidasen, die das Amino-Ende des Peptids angreifen, sind Aminopeptidasen, Dipeptidyl-Peptidasen oder Dipeptidasen (*Kenny*, 1999) (Fig. 1-2). Bei der Klassifizierung nach der katalytisch wirksamen Aminosäure im aktiven Zentrum wird zwischen Serin-, Cystein-, Threonin-, Glutaminsäure-, Asparaginsäure- und Metallo-Peptidasen unterschieden. Die Vielfalt an Peptidasen und deren Unterfamilien werden in der Datenbank MEROPS zusammengefasst und systematisiert. Dabei bilden verschiedenen Gruppierungen von Familien, die sich ihrerseits aufgrund von Ähnlichkeiten in der Aminosäuresequenz ergeben sogenannte Clans (S-Serin-, C-Cystein, T-Threonin-, A-Aspartat-, G-Glutamat, M-Metallo, U-Unbekannte- Peptidase-Clan) (*Rawlings et al.*, 2010).

Serin-Peptidasen sind weit verbreitet in Viren, Bakterien und Eukaryoten. Sowohl die typischen Vertreter Trypsin, Chymotrypsin aus der Bauchspeicheldrüse als auch Subtilasen aus *Bacillus* spp. weisen eine katalytische Triade aus Asparaginsäure, Histidin und Serin, die über einen tetraedrischen Übergangszustand die Peptidolyse katalysiert, im aktiven Zentrum auf (*Pfleiderer & Zwilling*, 1972). Cystein-Peptidasen werden auch als Sulfhydryl-Peptidasen bezeichnet. Zu den bekanntesten Vertretern dieser Gruppe zählen Caspasen sowie die pflanzlichen Enzyme Papain und Bromelain. Diese Enzyme katalysieren die peptidolytische Spaltung im aktiven Zentrum über eine Diade bestehend aus Cystein und Histidin (*Barrett et al.*, 2004). Im Vergleich dazu wird bei Asparaginsäure- und Metallo-Peptidasen kein kovalent verknüpftes Enzym-Substrat-Intermediat gebildet. Asparaginsäure-Peptidasen, auch Carboxylpeptidasen genannt, z. B. Pepsin oder Chymosin weisen ein saures pH-Optimum auf.

Zwei Asparaginsäure-Reste im aktiven Zentrum stellen die Liganden für das aktivierte H₂O-Molekül, welches den nucleophilen Angriff der Peptidbindung ausübt, dar (Dunn, 2001). Ähnliche Mechanismen finden bei der Katalyse durch Metallo-Peptidasen statt; hierbei wird das H₂O-Molekül durch ein divalentes Metall-Kation gebunden und aktiviert. In den meisten Fällen sind hierfür Zn²⁺, Co²⁺ oder Mn²⁺ und die Aminosäureseitenketten des Enzyms gebunden. So weist z. B. Thermolysin das typische Zink-Bindemotiv His-Glu-Xaa-Xaa-His (HEXXH), in dem Histidin und Glutaminsäure die Zinkliganden darstellen, auf (Van Den Burg & Eijsink, 2004). Bei Metallo-Peptidasen mit zwei Metallionen handelt es sich ausschließlich um Exopeptidasen, während Peptidasen mit einem Metallionen, sowohl Endo- als auch Exopeptidasen sein können (Rawlings et al., 2012). Das Proteasom ist ein Proteinkomplex im Cytoplasma oder Zellkern (bei Eukaryoten), der zur Proteinqualitätskontrolle dient und entsprechend eine Vielzahl dieser aufgeführten Peptidaseklassen beinhaltet, z. B. auch die Threonin-Peptidase (Baumeister et al., 1998).

Die Spaltspezifität einer Peptidase und die Interaktion zwischen Substrat und Enzym werden durch das Modell von Schechter & Berger (1967) beschrieben. Demnach interagieren die Aminosäurereste des Substrates (P_i,...P₃, P₂, P₁, P₁' , P₂' , P₃' ,...P_i') während der Spaltung nach dem Schlüssel-Schloss-Prinzip mit den entsprechenden Bindungsstellen am Enzym (S_i,...S₃, S₂, S₁, S₁' , S₂' , S₃' ,...S_i') (Fig. 1-3). Die Substratspaltung erfolgt zwischen P₁ und P₁' , dabei ist die Spezifität abhängig von den Aminosäuren im Substrat.

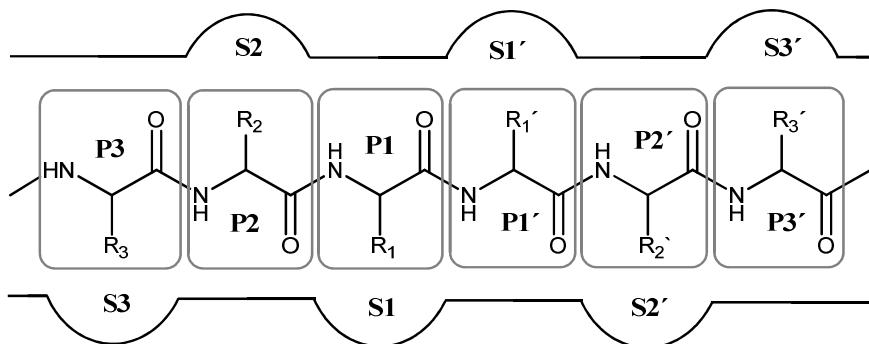


Fig. 1-3 | Schematische Darstellung der Nomenklatur nach Schechter & Berger (1967), Substratbindestellen S₃-S₃' der Peptidase und die Aminosäurereste P₃-P₃' des Peptids.

Peptidasen sind nicht nur für Organismen von essentieller Bedeutung, sondern aufgrund ihrer Spezifität und Stabilität auch für industrielle Applikationen. Industrieunternehmen sind zunehmend daran interessiert, die Produktionskosten zu senken, die Produktionsraten zu steigern und so den Produktionsprozess zu optimieren. Mehr als 50 % der industriell genutzten Enzyme sind Peptidasen, die sowohl in der Leder-, Kosmetik- und

Lebensmittelindustrie als auch in der Pharmaindustrie eingesetzt werden (Ravindran & Son, 2011; Li et al., 2013). Bakterielle Peptidasen mit alkalischem pH-Optimum sind vor allem in Wasch- und Reinigungsmitteln von Bedeutung (Schäfer et al., 2007). In der modernen Milchtechnologie wurde das Lab aus der Kälbermagenschleimhaut aufgrund der gegebenen Knappheit durch in Mikroorganismen gentechnisch produziertes Chymosin zur Caseinfällung ersetzt. Neben Chymosin eignen sich als Labersatz bei der Käseproduktion auch Peptidasen aus *Mucor miehi*, *Mucor pusillus*, *Endothia parasitica* (Hyslop, 2003) und aus gewissen Basidiomyceten (El-Baky et al., 2011). Darüber hinaus beschleunigen und verbessern pflanzliche und mikrobielle Peptidasen die Reifung und Zartheit von Fleischwaren (NÆS et al., 1994; Flores & Toldrá, 2011). Papain, gewonnen aus den Kernen der *Carica papaya*, verhindert im Brauprozess die Kältrübung von Bier (KÁŠ, 1984). Proteinhydrolysate werden vor allem in Sportler- und Säuglingsnahrung verwendet. Abgesehen von der Steigerung des Nährwerts und einem geringeren allergenen Potenzial kann die Hydrolyse von komplexen Proteinen zur Verbesserung der funktionellen Eigenschaften, Löslichkeit, Emulgierbarkeit und auch Freisetzung von geschmacksaktiven Substanzen, beispielsweise der Produktion von Speisewürze durch Peptidolyse von Pflanzenprotein (vgl. Kapitel 1.2.4) oder die Verflüssigung von Fischprotein (Clemente, 2000; Kong et al., 2007) genutzt werden. Diese exemplarischen Einsatzmöglichkeiten sollen das breite industrielle Anwendungsspektrum von Peptidasen zeigen.

1.1.1 Kommerzielle Peptidasen für die enzymatische Proteinhydrolyse

Der wachsende Bedarf an Enzymen, die zu einer optimierten Nutzung der verfügbaren Ressourcen sowie einer verbesserten Produktqualität und umweltfreundlicheren Produktion beitragen, führt zu einer verstärkten Herstellung von Peptidasen im industriellen Maßstab und auch zu einer höheren Nachfrage an Peptidasen in Lebensmittelqualität (Jegannathan & Nielsen, 2013).

Zu den bekannten kommerziell eingesetzten Enzympräparaten zählen u. a. Flavourzyme, welches ein Produkt der Firma Novozyme ist und eine Enzymmischung von Endo- und Exopeptidasen aus einer Submerskultur von *Aspergillus oryzae* bezeichnet. Die genaue Zusammensetzung ist unbekannt, da diese dem Firmengeheimnis unterliegt. Neben Flavourzyme werden weitere Peptidasenmischungen aus *Aspergillus oryzae* zur Produktion definierter Proteinhydrolysate angeboten. Es sind u. a. Umamizyme von Amano Pharmaceuticals oder Sumizyme von Shinnihon Chemical, (Guerard et al., 2002; Mizuno et

al., 2004) zur gezielten Freisetzung von antihypertensiven Peptiden (*Mizuno et al.*, 2004) zu nennen. Bisher wurden mittels Sequenzanalyse 18 verschiedene Peptidasen in *Aspergillus oryzae* Kulturen gefunden (*Kobayashi et al.*, 2007). Der Pilz sekretiert in Abhängigkeit der Kultivierungsbedingungen unterschiedliche Peptidasen. Demgemäß entstehen in einem Minimalmedium mit Gluten eine Prolyl-Dipeptidylpeptidase (*Doumas et al.*, 1998) oder in einer Sojabohnen-Koji Kultur eine Alanyl-Dipeptidylpeptidase (*Oda et al.*, 2006), Glutaminase, Metallo-Peptidase, Neutrale Protease I, Aspergillopepsin O, Leucin-Aminopeptidase und die Kette A von Deuterolysin (*Liang et al.*, 2009) (Fig. 1-4).

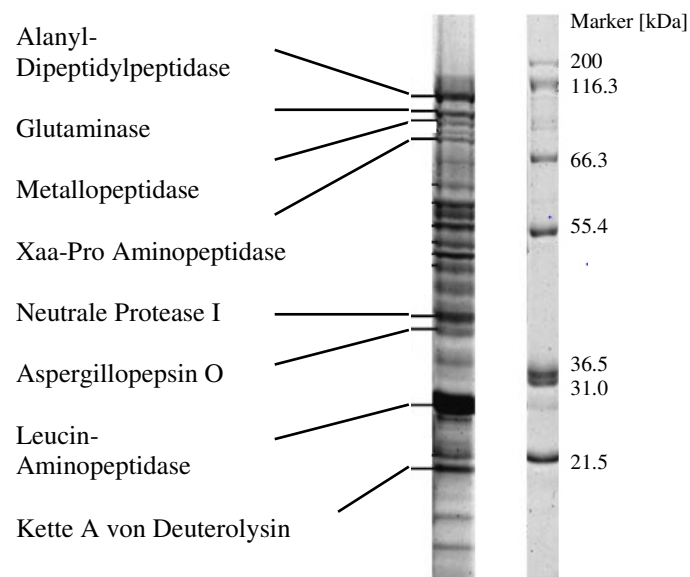


Fig. 1-4 | SDS-PAGE der extrazellulären Peptidasen einer Sojabohnen Kojikultur von *Aspergillus oryzae* AS 3.951 nach *Liang et al.* (2009).

Protamex von *Bacillus* spp., ebenfalls eine Peptidase von Novozyme mit einem pH-Optimum bei 8.0 und einem Temperatur-Optimum von 60 °C wird insbesondere zur Proteinhydrolyse von Nebenstrom aus der Fischindustrie zur Produktion von nicht bitteren Fischproteinextrakten oder Futtermitteln verwendet (*Liaset et al.*, 2003). *Bacillus* spp. sekretieren verschiedene Subtilasen, auch subtilisin-ähnliche Serin-Peptidasen (vgl. Kapitel 1.1) genannt. Darunter die zwei meist erforschten Subtilasen, Subtilisin Carlsberg und Subtilisin BPN' (*Ottesen & Svendsen*, 1970). Subtilisin BPN' wird hauptsächlich vom namensgebenden Bakterium *Bacillus subtilis* oder *Bacillus amyloliquefaciens* freigesetzt, während *Bacillus licheniformis* Subtilisin Carlsberg produziert. Zahlreiche Subtilasen, z. B. Alcalase (Novo Nordisk), Protease (Solvay Enzymes), Amano Protease S (Amano Pharmaceuticals) sind kommerziell erhältlich und weisen ähnliche Eigenschaften auf (*Markland Jr & Smith*, 1971; *Bommarius & Riebel-Bommarius*, 2004). Ihr alkalisches

Aktivitätsoptimum und die Thermostabilität bewirken ein breites Anwendungsgebiet in der Waschmittel- und Lederindustrie. Weiterhin können diese Enzyme durch gezielte Hydrolyse von Proteinen zur Erhöhung des Nährwertes von Säuglingsnahrung, Freisetzung von bioaktiven, blutdruckregulierenden Peptiden und Anreicherung von Fruchtsäften mit essentiellen Aminosäuren oder Peptiden genutzt werden (*Gupta et al.*, 2002; *Saeki et al.*, 2007).

1.1.2 Peptidasen aus *Flammulina velutipes*

Neben den in Kapitel 1.1.1 aufgeführten Peptidasenpräparaten von *Aspergillus* oder *Bacillus* spp. bieten essbare Basidiomyceten eine weitere für Lebensmittel geeignete Quelle von aktiven Peptidasen. Basidiomyceten, sogenannte Ständerpilze, sind mit 30.000 Arten eine Klasse, die 30 % aller Pilze umfasst. Das namensgebende und charakteristische Merkmal dieser Pilze ist die Basidie (Sporenständer), welche die Basidiosporen nach außen hin abschnürt. In der Natur übernehmen Basidiomyceten eine zentrale Funktion im Abbau von Pflanzenbiomasse und bieten damit ein überaus hohes Potenzial für die Sekretion von Peptidasen (*Raven et al.*, 2000; *Lüttge et al.*, 2010). Diese dienen dem Pilz zur Wirtsinvasion, zum Substratabbau, zur Freisetzung von kleineren, für die Pathogenese essentiellen Peptiden und zur Abwehr von Nahrungskonkurrenten (*Alfaro et al.*, 2014).

Flammulina velutipes, in Deutschland auch bekannt als gemeiner Samtfußrübling oder in Japan als Enoki, ist ein Basidiomycet und zählt zur Familie der *Physalacriaceae*. Neben seiner Funktion als Speisepilz werden diesem Pilz pharmakologische Eigenschaften zugesprochen (*Fukushima et al.*, 2001). In einer Submerskultur und auch als Koji sezerniert *Flammulina velutipes* eine Vielzahl von extrazellulären Peptidasen (*Grimrath et al.*, 2011) (Tab. 1-1).

Tab. 1-1 | Peptidasen aus der Submerskultur von *Flammulina velutipes*, bezeichnet nach ihrer Molekülmasse in der Gelatinezymographie nach *Grimrath* (2011).

Peptidase aus <i>F. velutipes</i>	Clan	Peptidasefamilie		Katalytischer Typ
Fvp150	MA	M36	Fungalysin	Metallo-Endopeptidasen
Fvp37	SB	S08	Subtilasen	Serin-Endopeptidasen

Peptidase aus <i>F. velutipes</i>	Clan	Peptidase familie	Katalytischer Typ	Peptidase aus <i>F. velutipes</i>
Fvp32	SK	S41	C-terminal processing peptidase family	Serin-Exopeptidasen
Fvp27	SC	S28	Prolylspezifische Serinpeptidasen	Serin- Endo- und Exo- Peptidasen
Fvp15	MA	M35	Deuterolysine	Metallo-Endopeptidasen

Einige dieser Peptidasen wurden bereits in Bezug auf deren optimalen Reaktionsbedingungen, deren native und denaturierte Molmasse sowie auf deren isoelektrischen Punkt charakterisiert. Zudem wurden sie, wenn möglich, anhand homologer Sequenzen einer Familie und Unterfamilie zugeordnet (*Grimrath, 2011*) (Tab. 1-1). Anhand von Sequenzvergleichen konnte nachgewiesen werden, dass Fvp150 zur Familie der Fungalysine gehört, die bis dato nur in Asco- und Basidiomyceten nachgewiesen wurden. Bei Fvp150 handelt es sich um eine Metallo-Endopeptidase mit einer nativen Molmasse von 150 kDa und einer denaturierten Masse von 59 kDa. Außerdem wurde eine Serin-Endopeptidase der Familie der S08 Substilasen (Clan SB) mit einer nativen Molmasse von 37 kDa identifiziert (Fvp37). Eine Fibrin-spaltende Peptidase mit Eigenschaften ähnlich Chymotrypsin und einer Molekülmasse von 37 kDa wurde bereits von *Park et al. (2007)* im Kulturüberstand des Basidiomyceten entdeckt. *Iketani et al. (2013)* identifizierten eine ähnliche Peptidase der S41 Familie im Fruchtkörper von *Flammulina velutipes*. Diese wies eine Molmasse von 34,5 kDa (325 Aminosäuren) und Legumain- und Caspase-ähnlichen Aktivitäten auf. Außerdem wurde postuliert, dass dieses Enzym autopeptidolytische Aktivitäten besitzt und folglich in einem späten Wachstumsstadium am programmierten Zelltod beteiligt ist. Die Peptidase Fvp32 gehört zur Serin-Peptidase-Familie S41 der „C-terminal processing peptidase family“, welche sich durch die katalytische Diade mit Serin und Lysin auszeichnet (Tab. 1-1). Weiterhin konnte in dem Basidiomyceten eine Serinpeptidase Fvp27, der Familie S28, mit einer hohen Spezifität für die Spaltung von Prolylbindungen identifiziert werden. Die Metallo-Peptidase Fvp15, welche zur M35 Familie der Deuterolysine gehört, wurde bislang nur in Pilzen und Bakterien gefunden (Tab. 1-1). Letztlich sind in dem Überstand der Submerskultur von *Flammulina velutipes* eine Vielzahl von Exo- und Endopeptidasen vorhanden, welche komplexe Proteine wie Weizengluten effektiv hydrolysieren können und sich somit zur Produktion von Würzen eignen (*Grimrath, 2011*).

1.1.3 Prolylspezifische Peptidasen

Proteine wie Weizengluten oder Gelatine enthalten große Mengen an Prolin (vgl. Kapitel 1.2.2). Die cyclische Struktur dieser sekundären Aminosäure bringt konformative Einschränkungen mit sich, die zu einem Knick in der Peptikette führen und einen Richtungswechsel zur Folge haben. Bestimmte Struktur motive wie β -hairpin-loops können dadurch entstehen (Blundell et al., 1987; Haque et al., 1996). Darüber hinaus weist Prolin keine funktionellen Gruppen auf, weswegen es bei der Ausbildung der für die Sekundärstruktur erforderlichen Wasserstoffbrückenbindungen nicht mitwirken kann (Jakubke & Jeschkeit, 1982). Die genannten strukturellen Elemente beeinflussen letztendlich die Interaktion mit anderen Proteinen wie Enzymen und können somit zumindest teilweise vor der Peptidolyse schützen.

Einzig prolylspezifische Peptidasen vermögen es, spezifisch prolinhaltige Substrate an der Carboxy-Gruppe von Prolin-Resten zu hydrolysieren. Ihr Vorkommen ist ubiquitär in Bakterien, Pilzen, Pflanzen und dem menschlichen Organismus. Es existieren sowohl prolylspezifische Endo- als auch Exopeptidasen. Diese können aufgrund ihrer Spaltspezifität in verschiedene Klassen eingeteilt werden (Tab. 1-2) und gehören zumeist der Unterklasse der Serin-Peptidasen an (Walter et al., 1980; Rawlings et al., 1991).

Tab. 1-2 | Einteilung prolylspezifischer Peptidasen anhand ihrer Spaltspezifität für Prolin (Pro) nach Walter et al. (1980) Spaltstelle -↓-, X: Aminosäure, Y: Peptid oder geschützte Aminosäure, Y': Aminosäure, Amid, aromatisches Amid oder Alkohol, Y'': Aminosäure, Peptid oder -OH, Z: Schutzgruppe oder Peptid.

Name	EC Nummer	Spaltsequenz
Endopeptidasen:		
Prolylspezifische Endopeptidase	EC 3.4.21.26	Y - Pro -↓- Y'
<i>post-proline cleaving enzyme</i>	EC 3.4.21.-	Y - Pro -↓- Y'
Exopeptidasen:		
N-Terminal:		
Post-prolyl-Dipeptidyl-Amino-peptidase	EC 3.4.14.-	X - Pro -↓- Y'
Prolyl-Imino-peptidase	EC 3.4.11.5	Pro -↓- Y
C-Terminal:		
Prolylcarboxypeptidase	EC 3.4.16.4	Z - Pro -↓- X
Carboxypeptidase P	EC 3.4.17.16	Z - Pro -↓- X

Die Prolyl-Endopeptidase (EC 3.4.21.26, Peptidasefamilie S09) wurde erstmals als ein Oxytocin-spaltendes Enzym im menschlichen Uterus von Walter et al. (1971) entdeckt und gilt als bekanntester Vertreter dieser Enzymklasse. Der Enzymname wurde später in Prolyl-Oligopeptidase geändert, da das eukaryotische Enzym nur Peptide mit einer maximalen Länge von bis zu 30 Aminosäuren spaltet (Webb, 1992). Charakteristisch für die Klasse der Serin-

Peptidasen wird die Peptidspaltung über eine Triade aus Serin (554), Asparaginsäure (641) und Histidin (680) katalysiert. Das Motiv GGSXGGLL (X = typischerweise Asn oder Ala) umgibt das katalytisch wirksame Serin. Die Struktur der Prolyl-Oligopeptidase ergibt sich aus zwei Domänen. Dies ist zum einen die Peptidase-Domäne mit einer α/β -Hydrolase-Faltung und dem aktiven Zentrum und zum anderen ist der Mitteltunnel mit einem β -Propeller bedeckt (Fig. 1-5) (Fülöp *et al.*, 1998; Fülöp *et al.*, 2000).

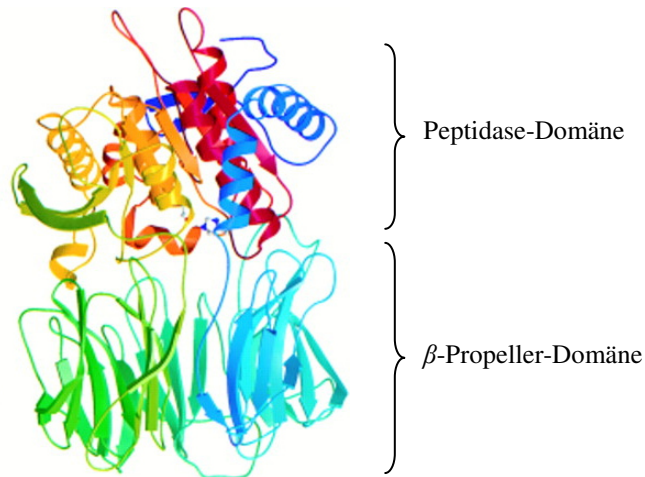


Fig. 1-5 | Struktur der Prolyl-Oligopeptidase nach Fülöp *et al.* (1998) in einem Farbverlauf von blau (N-Terminus) nach rot (C-Terminus) und der β -Propeller-Domäne.

Neben den bereits erwähnten Vorkommen wurden prolylspezifische Aktivitäten auch in verschiedenen Membranen, in den Mitochondrien, im *Liquor cerebrospinalis* und in der Leber entdeckt. Demgemäß spielt dieses Enzym in verschiedensten Stoffwechselprozessen bei der Bildung und beim Abbau von Peptidhormonen und Neuropeptiden (z. B. zur Spaltung von Substanz P, Bradykinin, Angiotensin I und Arginin-Vasopressin) eine wesentliche Rolle. Allerdings sind die genauen *in vivo* Funktionen und die biologische Relevanz der Prolyl-Oligopeptidase bislang nicht vollends und schlüssig aufgeklärt, was hinsichtlich bereits existierender klinischer Studien über Prolyl-Oligopeptidase-Inhibitoren zur Anwendung als Arzneimittel überraschend ist (Maes *et al.*, 1995; Garcia-Horsman *et al.*, 2007).

Seit ihrer Entdeckung unterliegen prolylspezifische Peptidasen einer stetig wachsenden wissenschaftlichen und wirtschaftlichen Aufmerksamkeit, weil ihre Katalyse neben der pharmazeutische Anwendung, ebenfalls in vielen biotechnologischen Bereichen z. B. der Brau- oder Back-Industrie benötigt wird (Lopez & Edens, 2005; Tanner *et al.*, 2014). Die bislang einzig kommerziell angebotene prolylspezifische Peptidase (An-Pep, DSM Food Specialties) stammt aus dem Ascomyceten *Aspergillus niger* und gehört zur Peptidasefamilie

S28. Das Enzym weist eine große Stabilität gegenüber sauren Bedingungen sowie im Magen befindliche Peptidasen auf. Darüberhinaus wird An-Pep eine entbitternde Wirkung von Caseinhydrolysaten zugeschrieben (Edens et al., 2005). Allerdings eignen sich nicht nur Ascomyceten als potentielle pilzliche Quellen für prolylspezifische Peptidasen. Eine weitere vielversprechende Familie der Pilze sind die Basidiomyceten (vgl. Kapitel 1.1.2). Dabei wurden in folgenden Basidiomyceten bereits extrazelluläre prolylspezifische Peptidasen identifiziert: *Agaricus bisporus* (Sattar et al., 1990), *Coprinopsis clastophylla* (Chen et al., 2012), *Grifola frondosa* (Hiwatashi et al., 2004) *Lyophyllum cinerascens* (Yoshimoto et al., 1988), *Phanerochaete chrysosporium* (Li et al., 2010), *Ustilago maydis* (Juárez-Montiel et al., 2014) und *Flammulina velutipes* (Grimrath, 2011).

1.2 Weizengluhenhydrolysate als Speisewürze

Würzen werden mittels Hydrolyse von Proteinen hergestellt und aufgrund ihrer schmackhaften Wirkung zur Verfeinerung von Suppen und Snacks, sowie zur Fleisch- und Gemüsezubereitungen verwendet. Gemäß den *Leitsätzen für Gewürze und andere würzende Zutaten* (27.05.1998) wird unter einer Würzsoße eine fließfähige und pastenförmige Zubereitung mit ausgeprägt würzendem Geschmack aus zerkleinerten und/oder flüssigen Zutaten verstanden. Eine schon seit vielen Jahrtausenden in Asien hergestellte Würzsoße ist die Sojasoße, bei deren Herstellung traditionell Mikroorganismen Sojabohnen fermentieren. In Europa wurde die Herstellung von Würzmitteln erst viele Jahrhunderte später entdeckt. Das wohl bekannteste Beispiel ist die 1886 erfundene Maggi-Suppenwürze. Während früher Soja- und Weizenproteine zuerst mit Salzsäure hydrolysiert und anschließend mit Natronlauge wieder neutralisiert wurden, sind heute enzymatisch hergestellte Speisewürzen nicht mehr wegzudenken (Becker & Hölper, 1996). Für die Hydrolyse wird zumeist Weizengluhen (vgl. Kapitel 1.2.2) als Substrat und eine Enzymmischung aus Exo- und Endopeptidasen (vgl. Kapitel 1.1.1 und 1.1.2) verwendet (Clemente, 2000). Die Geschmacksaktivität in diesen Würzmitteln wird vor allem von Aminosäuren, kleineren Peptiden und den im Pasteurisationsschritt erzeugten *Maillard*-Produkten erzeugt.

1.2.1 Geschmacksaktive Substanzen

Hydrolysate von Pflanzenproteinen, z. B. Weizengluhen, werden in Lebensmitteln häufig aufgrund ihrer würzig schmeckenden Eigenschaften eingesetzt. 1908 entdeckte der japanische

Forscher Ikeda neben süß, sauer, bitter und salzig, die bis dahin noch nicht identifizierte fünfte Geschmacksrichtung umami in getrockneten Meeresfrüchten (*Ikeda, 1908*). Diese Geschmacksrichtung wird als wohlschmeckend beschrieben und wird auf die sensorischen Eigenschaften von Natrium-L-glutamat und verschiedenen Purin-5'-Nucleotide, wie z. B. Inosin-5'-monophosphat oder Guanosin-5'-monophosphat, zurückgeführt. Charakteristische Eigenschaften dieser Substanzen sind ihre geschmacksverstärkende Wirkung und die gegenseitigen synergistischen Effekte (*Yamaguchi, 1967*). Umami-Substanzen vermindern unangenehme Geschmacksnoten von Lebensmitteln und führen zur Harmonisierung des Geschmacks. Weiterhin fördern diese Verbindungen den Appetit und die Verdauung (*Rogers & Blundell, 1990*), nehmen Einfluss auf den Blutdruck und erhöhen die Ausschüttung von bestimmten Hormonen, z. B. Insulin (*Niijima, 1991*). Natrium-L-glutamat ist nach *Zusatzstoffzulassungs-Verordnung* (29. Januar 1998), Anlage 4 als Lebensmittelzusatzstoff (E621) mit *quantum satis* Prinzip u. a. für Würzmittel zugelassen. Dabei werden Konzentrationen zwischen 0,2-0,8 % eingesetzt und die Verbindung entfaltet bei pH 5,5-6,5 die größte Wirksamkeit (*Löliger, 2000*). Die Mechanismen zur Erregung der Umami-Geschmacksrezeptorzellen ähneln denen des Süßgeschmacks, bei denen ein G-Protein gekoppelter Rezeptor bestehend aus zwei Protein-Heteromeren T1R1 und T1R3 die zentrale Rolle spielt (*Li et al., 2002*). L-Glutamat ist ein hauptsächlich exzitatorischer Neurotransmitter des Gehirns und wird im menschlichen Körper von sehr unterschiedlichen Rezeptoren, welche im Zentralnervensystem an der Übertragung von Nervenimpulsen beteiligt sind, gebunden. Ein erhöhter Verzehr von Natrium-L-glutamat-haltigen Speisen wurde bislang für Symptome wie Kopfschmerzen, Herzrasen, Erröten, Benommenheit in Brust und Nackenbereich (China-Restaurant-Syndrom) verantwortlich gemacht (*Kwok, 1968; Schaumburg et al., 1969*). Neuere Studien hingegen widerlegen diese Erkenntnis und lassen den Zusammenhang als wenig wahrscheinlich erscheinen (*Geha et al., 2000*).

Der Würzgeschmack von Proteinhydrolysaten wird neben der hohen Konzentration an freien Aminosäuren, insbesondere Glutaminsäure, auf kleine Peptide, Maillard-Produkten, Salze und organische Säuren zurückgeführt (*Aaslyng et al., 1999*). Herzhaft schmeckende Peptide werden in der Literatur kontrovers diskutiert; so wiesen die von *Schlichtherle-Cerny & Amadò* (2002) identifizierten Pyroglutaminsäure-Peptide, pGlu-Pro-Ser, pGlu-Pro, pGlu-Pro-Glu und pGlu-Pro-Gln, in Weizenglutenhydrolysaten hergestellt mit Flavourzyme, einen Natrium-L-glutamat-ähnlichen Geschmack auf. Ferner wurden in Sojasoße ebenfalls verschiedenste umami-verstärkende Pyro-Verbindungen, beispielsweise pGlu-Gln (1,6 mM),

pGlu-Gly (0,2 mM) sowie gebunden an einen Fructoserest, Fru-pGlu (1,6 mM) gefunden (Kaneko *et al.*, 2010) (Fig. 1-6).

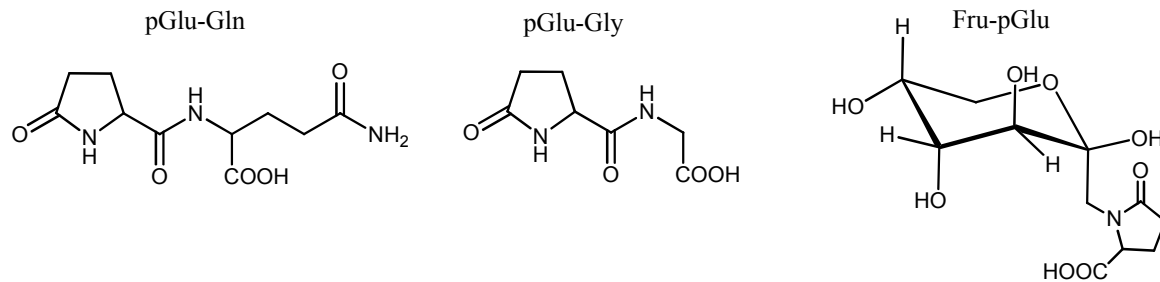


Fig. 1-6 | Chemische Struktur der Pyroglutamylpeptide und des Amadoriprodukts (β -Pyranoseform) nach Kaneko *et al.* (2010).

Arai *et al.* (1972) schlussfolgert, dass vor allem Peptide bestehend aus Glutaminsäure und hydrophilen Resten einen umami Geschmack erzeugen. Demgemäß wurden nach der Hydrolyse von Fischprotein die Peptide Glu-Asp-Glu, Asp-Glu-Ser, Thr-Glu und Ser-Glu-Glu als wohlschmeckend erkannt (Noguchi *et al.*, 1975). Van den Oord & Van Wassenaar (1997) wiederum stellen die generelle Existenz von umami-Peptiden in Frage. Da als umami-beschriebene Peptide, wie Glu-Glu oder Glu-Asp in Lösungen mit oder ohne Natriumchloridzusatz neutral oder leicht bitter schmeckten.

Laut Ney (1971) können Peptide mit einer Molekülmasse unter 6 kDa in Abhängigkeit der Hydrophobizität ihrer Seitenketten bitter schmecken. Diese Peptide haben einen hohen Gehalt an Leucin, Prolin, Phenylalanin, Tyrosin, Isoleucin und Tryptophan (Ishibashi, Arita, *et al.*, 1987; Ishibashi, Sadamori, *et al.*, 1987). Die Lage dieser Aminosäuren spielt eine bedeutende Rolle für die Entstehung des Bittereindrucks. Im Peptid liegende hydrophobe Aminosäuren führen zu einem bitteren Geschmack. Befinden sich die Reste hingegen am C- oder N-Terminus der Peptide, wird ein weniger bitterer Geschmack festgestellt (Matoba & Hata, 1972). Für die Entbitterung von Proteinhydrolysaten bieten sich diverse Möglichkeiten, wie z. B. die Adsorption von bitterschmeckenden Peptiden an Aktivkohle, die chromatographische Entfernung mit verschiedenen Matrices oder die selektive Extraktion mit Alkoholen an. All diesen Verfahren ist ein Verlust einiger Aminosäuren gemein. Neben den aufgeführten Möglichkeiten kann der bittere Geschmackseindruck auch durch den Zusatz von Polyphosphaten, spezifischen Aminosäuren (Glu und Asp) oder α -Cyclodextrinen maskiert werden. Eine weitere Chance stellt der Einsatz von spezifischen Peptidasen dar. So kann die gezielte Verwendung von erhöhten Exopeptidaseaktivitäten durch die Abspaltung der äußeren hydrophoben Aminosäuren zu einer deutlichen Entbitterung beitragen (FitzGerald & O'cuinn,

2006). Ebenso wurde eine Minimierung des Bittergeschmacks in Caseinhydrolysaten (u.a. Val-Pro-Pro-Phe-Leu-Gln) mithilfe der prolylspezifischen Endopeptidase aus *Aspergillus niger* (An-Pep) beobachtet (*Edens et al.*, 2005; *FitzGerald & O'cuinn*, 2006) (vgl. Kapitel 1.1.3).

Unter Einwirkung von Wärme wird aus Kohlenhydraten und Aminosäuren eine Vielzahl von Verbindungen gebildet, welche die typischen Röstaromen oder den Kochgeschmack auslösen. Diese umfassen Vertreter verschiedener Stoffklassen wie zum Beispiel Alkyl- und Methoxypyrazine, Pyrrole, Pyrroline, aliphatische und cyclische Dicarbonyl-Verbindungen, Furane, Thiole und Thiazole. Die kennzeichnenden Substanzen entstehen während der *Maillard*-Reaktion oder anschließender Abbauprozesse (*Manley & Ahmedi*, 1995; *Fayle & Gerrard*, 2002; *Steinhaus & Schieberle*, 2007). In einem Weizenglutenhydrolysat mit Flavourzyme, welches ebenfalls Glucose enthielt, wurden 19 Pyrazine, zwei Furane und fünf Schwefel-Verbindungen gefunden (*Lee et al.*, 2012).

Zusammenfassend zeigen diese Erkenntnisse, wie bedeutend die sorgfältige Auswahl der Reaktionsbedingungen und der Spezifität der genutzten Enzympräparate für die Herstellung möglichst schmackhafter Speisewürzen mit reduzierter Bitterkeit ist.

1.2.2 Weizengluten und Glutenintoleranz

Weizen weist einen Proteingehalt von 10-12 % auf, wobei Gluten den größten Anteil besitzt. Weizengluten ist ein Nebenprodukt, das bei der Herstellung von Stärke entsteht und sich in zwei Hauptbestandteile unterteilen lässt. Diese sind in 60 % Ethanol löslichen Gliadine und unlöslichen Glutenine (*Wieser*, 2007). Beide Komponenten weisen einen hohen Anteil an Glutamin (35-55 %) und Prolin (13-27 %) auf (*Woychik et al.*, 1961; *Belitz et al.*, 2001). Gliadine sind überwiegend monomere Proteine mit einer Molekülmasse von 28-55 kDa, die in α -Gliadine, γ -Gliadine und ω -Gliadine klassifiziert werden können. Hingegen umfasst die Glutenin-Fraktion aggregierte und über Disulfidbrücken verbundene Proteine mit variierenden Molekularmassen von 500-10.000 kDa. Nach Reduktion der Disulfidbrückenbindungen können Glutenine in hochmolekulare Untereinheiten (67-88 kDa) und niedermolekulare Untereinheiten (32-35 kDa) unterteilt werden. Aufgrund der hydrophoben Seitenketten des Prolin sinkt die Löslichkeit mit steigendem Prolin-Gehalt. Infolgedessen ist der Prolin-Anteil in Gluteninen deutlich höher als in Gliadinen. Die Anteile

an Kohlenhydraten und Fetten in Weizengluten variieren je nach Trocknungsgrad, ebenso schwankt der Protein-Gehalt in einer Spanne von 75-85 % (Wieser, 2007).

Da bestimmte Peptidfragmente bei einigen Menschen eine Entzündung der Darmepithelzellen hervorrufen, erweist sich das Vorhandensein bzw. der Zusatz von Gluten in Lebensmitteln als problematisch (Catassi & Fasano, 2008). Diese T Zell-gesteuerte Glutenintoleranz wird auch als Zöliakie bezeichnet. In Deutschland ist von einer gemittelten Prävalenz von 1:270 (8/2157) (bei Frauen von 1:224 und 1:518 bei Männern) mit steigender Tendenz auszugehen (Kratzer *et al.*, 2013). Die klinische Symptomatik der Krankheit variiert je nach Alter, Krankheitsdauer und Ausdehnung der Zottenveränderungen (Keller, 2003). Die verantwortlichen Peptidfragmente (Epitope) sind in den prolinreichen Gliadinen wiederzufinden. Als zöliakie-auslösendes Epitop aus α -Gliadinen wird „PQPQLPYPQPQLP“ beschrieben (Walz *et al.*, 1996; Stepniak *et al.*, 2006). Der hohe Prolin-Anteil in den Gluten-gerichteten T-Zell Epitopen führt zu einer hohen Resistenz gegen einen proteolytischen Abbau im Verdauungstrakt. Die Toxizität hängt jedoch ausschließlich von der Primärstruktur ab (Wieser, 2007). In den letzten Jahren wurden insbesondere für prolylspezifische Peptidasen Möglichkeiten der Detoxifizierung glutenhaltiger Lebensmittel und Rohstoffe untersucht. Sowohl für die während der Keimung von Getreide induzierten Peptidasen, als auch für die kommerziell in Lebensmittelqualität produzierbaren prolylspezifischen Peptidasen (vgl. Kapitel 1.1.3) aus *Aspergillus niger* (An-Pep) (Stepniak *et al.*, 2006; Schwalb *et al.*, 2012; Walter *et al.*, 2013) und aus *Aspergillus oryzae* (Dipeptidyl-Peptidase IV) (Ehren *et al.*, 2009) konnte eine Spaltung bzw. Detoxifizierung von Zöliakie-auslösenden Substraten nachgewiesen werden. Neue Studien betonen zu dem, dass die Variationen im Glutengehalt von Weizen nicht die Ursache für eine erhöhte Sensibilisierung und den Anstieg der Zöliakiepatienten in den letzten Jahre sind (Kasarda, 2013).

Weizengluten besitzt vor allem als Klebereiweiß in der Backindustrie, wo es der Ausbildung des Teiggerüsts bei Brot dient, eine große Bedeutung (Graveland, 1988; Khatkar *et al.*, 2002). Ferner weist es die Fähigkeit auf, Wasser und Fett zu binden, den Proteingehalt gleichzeitig zu erhöhen und die Struktur von Käse, Fleisch und Fisch aufgrund der elastischen Eigenschaften zu verbessern (Day *et al.*, 2006). Ein Überblick der Anwendungsmöglichkeiten differenziert nach Regionen ist in Tab. 1-3 aufgeführt.

Tab. 1-3 | Überblick der weltweiten Verwendung von Weizengluten nach *Day et al.* (2006), angegeben in Prozent [%] in Relation zur gesamten Nutzung in der jeweiligen Region.

Verwendung	Europa	Nordamerika	Australien	Japan	Gesamte Welt
Backwaren	17	83	54	30	63
Anreicherung von Mehl	66	1	9	-	14
Fleischprodukte	-	1	9	25 ^a	5
Würste	-	-	-	12	-
Frühstückscerealien	-	1	12	-	2
Nudeln	-	-	-	10	-
Tiernahrung	13	12	13	-	8
Anderes	4	2	3	23	8

^a beinhaltet Weizengluten für synthetische Fischprodukte

Die Unlöslichkeit dieses Proteingemischs stellt einen limitierenden Faktor für eine weitergehende industrielle Nutzung dar, weshalb Möglichkeiten zur Hydrolyse von großem Interesse sind.

1.2.3 Traditionelle Proteinhydrolyse

Proteine, wie Weizengluten und Sojaproteine können durch saure oder alkalische Hydrolyse chemisch gespalten werden. Das klassische salzsaure Verfahren wurde früher zur Produktion von Speisewürze aus Pflanzenprotein und zur Freisetzung von Glutaminsäure angewandt (*Prendergast, 1974*). Dabei wurde 30 %-ige Salzsäure zum Protein gegeben und für 2-6 h bei 100-120 °C erhitzt. Anschließend erfolgte eine Abkühlung auf 50 °C, die Neutralisation mit 50 %-iger Natronlauge oder Natriumcarbonat auf einen pH-Wert von 4-6 und eine Filtration möglicher unlöslicher Bestandteile. Die Salzkonzentration in den chemisch erzeugten Weizenglutenhydrolysaten variierte zwischen 40 % und 45 % (*Manning, 1950; Chigurupati et al., 2001*).

Neben den positiven Effekten der totalen Proteinhydrolyse, der Bildung geschmacksaktiver würziger Substanzen und der schnellen Reaktionszeit, ist dieses Verfahren durch umweltunfreundliche Bedingungen, mangelnde Prozessregulierung, hohe Salzlasten, Verlust essentieller Aminosäuren wie Tryptophan (*Tsugita & Scheffler, 1982*) und der Bildung gesundheitsschädlicher Substanzen gekennzeichnet. So können im Gluten enthaltene Triacylglyceride unter sauren Bedingungen mit den vorhandenen Chlorid-Ionen zu toxischen Chlorpropanolen reagieren (Fig. 1-7). Dabei wird vor allem das 3-Monochlor-1,2-propandiol (3-MCPD) und 1,3-Dichlorpropan-2-ol (1,3-DCP) gebildet.

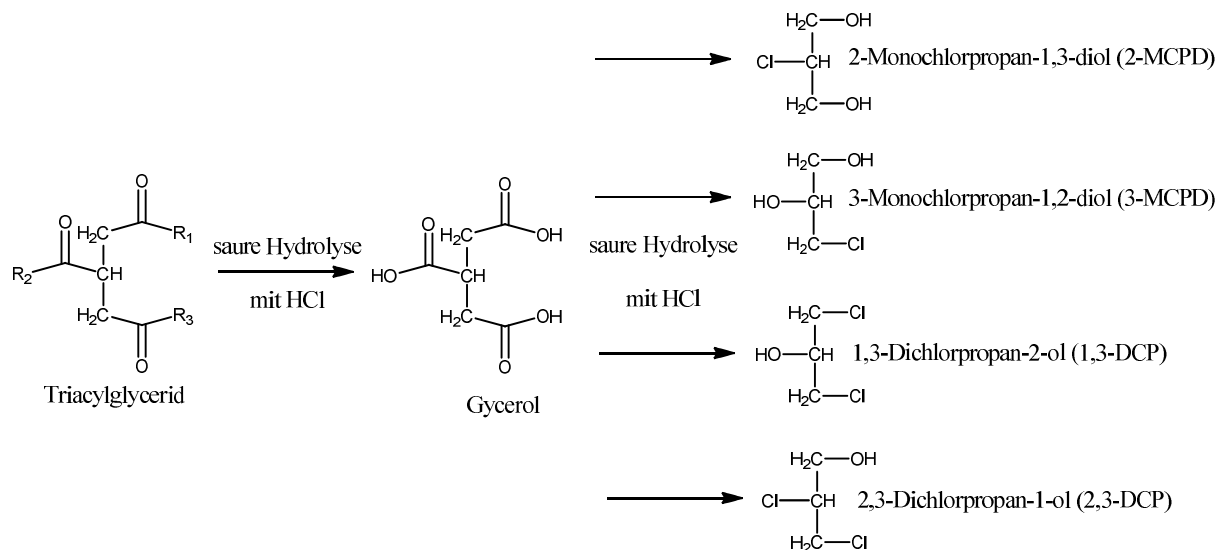


Fig. 1-7 | Bildung der Chlorpropanole während der sauren Hydrolyse von Proteinen nach *Hamlet et al.* (2002).

In Tierversuchen wurden für einige dieser Stoffe krebserregende Eigenschaften nachgewiesen (*Collier et al.*, 1991). 3-MCPD führte im Tierversuch zu einer Zunahme der Zellzahl (Hyperplasie) in den Nierentubuli, wobei in höheren Konzentrationen gutartige Tumoren ausgelöst wurden. Allerdings konnte keine erbgutschädigende Wirkung nachgewiesen werden. Basierend auf diesen wissenschaftlichen Erkenntnissen und der Einschätzung als nichtgenotoxisches Karzinogen haben der Wissenschaftliche Lebensmittelausschuss der EU-Kommission, das Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives eine tolerierbare tägliche Aufnahmemenge (Tolerable Daily Intake, TDI) von 2 µg (freiem) 3-MCPD je Kilogramm Körpergewicht für den Menschen abgeleitet. Der lebensmittelrechtlich festgesetzte zulässige Höchstgehalt für freies 3-MCPD in Sojasoßen und hydrolysiertem Pflanzenprotein beträgt 20 µg/kg laut *Kontaminanten-Höchstmengen Verordnung 1881/2006* (19. Dezember 2006) und bezieht sich auf das flüssige Erzeugnis mit 40 % Trockenmasse. Durch Verwendung fettarmer Ausgangsprodukte oder durch Reinigung mittels Wasserdampfdestillation konnten die gemittelten Gehalte an freiem 3-MCPD in Sojasoße von 5,71 mg/kg (1998) auf 0,04 mg/kg (2001) deutlich gesenkt werden (*Breitling-Utzmann*, 2002).

1.2.4 Enzymatische Proteinhydrolyse

Eine umweltfreundliche und unter milden Bedingungen ablaufende Alternative zur klassischen chemischen Hydrolyse stellt die enzymatische Proteinhydrolyse dar. Durch dieses Verfahren werden toxische Nebenreaktionen und der Verlust des Nährwertes vermieden (*Jens*

Adler-Nissen, 1986). Einen weiteren Vorteil stellt die Spaltspezifität der Peptidasen dar (vgl. Kapitel 1.1), durch die definierte chemische, funktionell und ernährungsphysiologisch wertvolle Proteinhydrolysate generiert werden können. Als Bestandteil der menschlichen Ernährung können diese unter anderem für die Produktion von Speisewürze, für die Proteinsupplementierung von Energiedrinks und Sportlernahrung, bei Diäten zur Gewichtskontrolle sowie als spezieller Ernährungsbestandteil für ältere Menschen genutzt werden. Ferner eignen sich diese Peptidasen für klinische/medizinische Zwecke bei Phenylketonurie, bei akuten oder chronischen Erkrankungen der Leber, bei Pankreatitis, bei Morbus Crohn sowie zur Herstellung hypoallergener Säuglingsnahrung (*Clemente*, 2000). Eine 2012 veröffentlichte randomisierte Doppelblind-Studie - die sogenannte GINI-Studie (German Infant Nutritional Intervention) - untersuchte über einen Zeitraum von zehn Jahren (anfängliche Teilnehmerzahl: 5991) den Einfluss einer Ernährung während der ersten vier bis sechs Lebensmonate mit unterschiedlicher hypoallergener Säuglingsnahrung hinsichtlich der Allergieentstehung bei Kindern mit bekannten familiären Allergielastungen. Die Forscher kamen unter anderem zu dem Ergebnis, dass eine auf einem Milch-Protein-Hydrolysat basierende Säuglingsnahrung eine unterschiedlich hohe präventive Wirkung erzielt, als eine nicht hydrolysierte Säuglingsnahrung auf Basis von intakten Kuhmilchproteinen (*Von Berg et al.*, 2012). Ferner spiegelt die Freisetzung von antioxidativen Peptiden aus Weizengluten mithilfe von Papain (*Wang et al.*, 2007) oder das ebenfalls in Weizenglutenhydrolysaten mit Pepsin gefundene antihypertensive Tripeptid Ile-Ala-Pro (*Motoi & Kodama*, 2003) die ernährungsphysiologische Relevanz und Bioaktivität von enzymatisch hergestellten Proteinhydrolysaten wider.

Durch eine gezielte Steuerung der Reaktionsbedingungen der Peptidolyse ist es möglich, Hydrolysate mit unterschiedlichen Eigenschaften zu erhalten. In den letzten Jahren konzentrierte sich die Forschung besonders auf eine vor der eigentlichen Hydrolyse stattfindende chemische oder enzymatische Modifikation der Proteinsubstrate, um eine verbesserte Löslichkeit, Schaum- und Emulgierbarkeit der Hydrolysate zu erzielen (*Wang et al.*, 2009). Demgegenüber werden in neueren Untersuchungen bestimmte Faktoren wie die Peptidasemischungen, Substrate und Reaktorsysteme und die verwendeten Post-Peptidolyse-Prozesse variiert, um mit einer hohen Ausbeute definierte Hydrolysate zu erzeugen (Fig. 1-8) (*Edens et al.*, 2002).

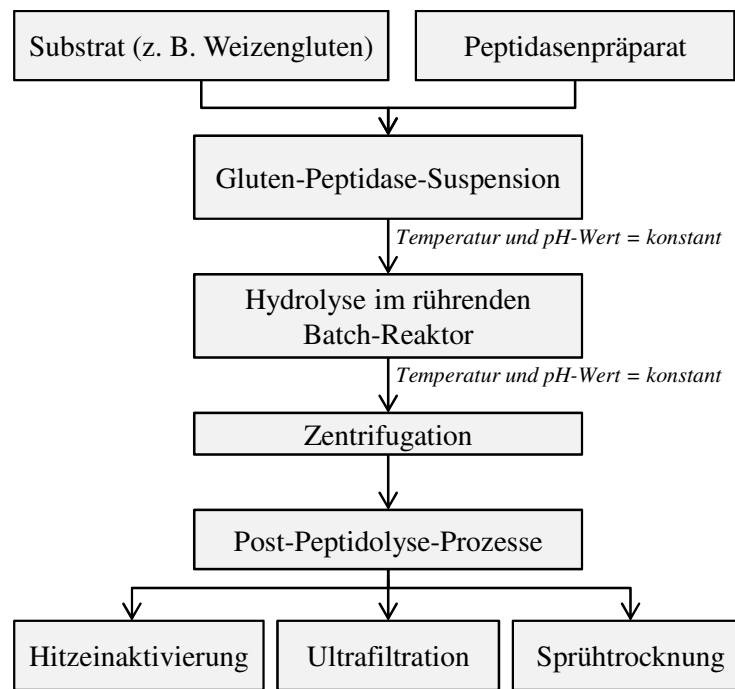


Fig. 1-8 | Prozessschema für die enzymatische Proteinhydrolyse im Batchansatz.

Typischerweise findet die enzymatische Proteinhydrolyse, z. B. von Weizengluten, Casein, Molken- oder Sojaprotein, in Abhängigkeit der Reaktionsoptima der verschiedenen Peptidasenpräparate (vgl. Kapitel 1.1.1 oder 1.1.2) meist bei pH 5-8, über mehrere Stunden (16-24 h) und bei Temperaturen zwischen 40-55 °C statt. Die in der Literatur beschriebenen höchsten Substratkonzentrationen für Weizengluten bewegen sich zwischen 17 % und 22 % (Kong *et al.*, 2007). In Abhängigkeit von der Verwendung des Hydrolysats erfolgt im Nachgang eine Hitzeinaktivierung der Peptidasen, eine Ultrafiltration oder eine Sprühtrocknung (Fig. 1-8) (Jens Adler-Nissen, 1986; Edens *et al.*, 2002).

Charakteristisch für den Hydrolyseverlauf ist, dass in den ersten vier Stunden ein rapider Anstieg des Hydrolysegrades (DH in %), d.h. der Menge an freigesetzten Aminosäuren, und in den Folgestunden eher eine Stagnation zu verzeichnen ist (Fig. 1-9) (Nchienzia *et al.*, 2010). Der beschriebene typische Verlauf der enzymatischen Weizenglutenhydrolyse zeigt sich sowohl für Flavourzyme (Fig. 1-9) (Hardt *et al.*, 2014) als auch bei der Nutzung von anderen Peptidasepräparaten wie Alcalase, Pancreatin, Neutrase und Protamex (Kong *et al.*, 2007).

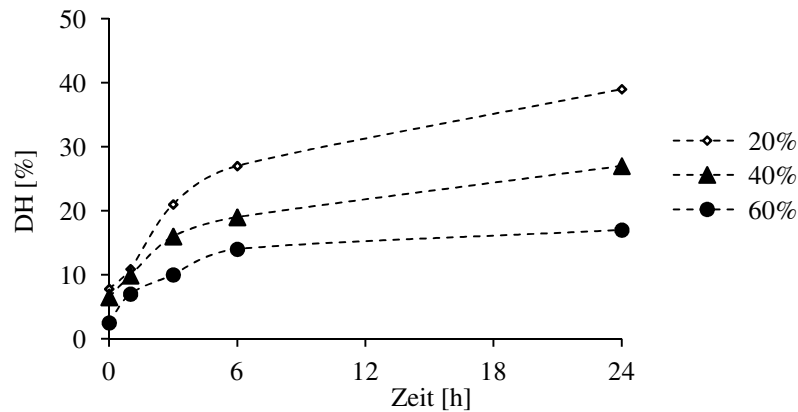


Fig. 1-9 | Hydrolyseverlauf mit Flavourzyme (Enzym-Substrat-Verhältnis 1:30) bei unterschiedlichen Weizenglutenkonzentrationen (20, 40 und 60 %) nach *Hardt et al.* (2014).

Neueste Studien zeigen, dass Weizengluten bei einem konstanten Enzym-Substrat-Verhältnis bis zu einer Ausgangskonzentration von 50 % ohne Verlust der Enzymaktivität hydrolysiert werden kann. Hingegen verringert sich bei extrem hohen Feststoffkonzentrationen von über 60 % (Weizengluten) die Reaktionsgeschwindigkeit und der Hydrolysegrad aufgrund der Massentransferbeschränkungen und der gesenkten Wasseraktivität deutlich (Fig. 1-9) (*Hardt et al.*, 2014).

Eine vollständige enzymatische Hydrolyse, d.h. Freisetzung aller im Protein vorhandenen Aminosäuren mithilfe einer einzelnen Peptidase ist unmöglich, weshalb für industrielle Applikationen zumeist Enzymmischungen aus Exo- und Endopeptidasen eingesetzt werden (vgl. Kapitel 1.1.1) (*Nchiencia et al.*, 2010). Allerdings weist auch diese Vorgehensweise Limitierungen auf. Bislang verläuft die Peptidolyse nur unvollständig und mit einer geringen Hydrolyseeffizienz, wodurch zum Teil bittere Hydrolysate entstehen. Weiterhin existiert die Schwierigkeit der Separation von bioaktiven Peptiden aus dem Hydrolysat. Demgemäß wird postuliert, dass die Instabilität der Peptidasen als solches, aber auch autopeptidolytische Prozesse (*Constantinides & Adu-Amankwa*, 1980), die Unlöslichkeit des Substrates, die geringe Substratzugänglichkeit, das Vorhandensein von Inhibitoren, das Fehlen von Cofaktoren und die Produktinhibierung (*Jens Adler-Nissen*, 1986; *Quaglia & Orban*, 1987; *Souissi et al.*, 2007) zu den beschränkenden Ursachen zählen. Laut *Bisswanger* (2000) ist für jede reversible Enzymreaktion eine Produktinhibierung anzunehmen, welche überdies im Verlauf der Reaktion zunimmt. Im Falle einer kompetitiven Produktinhibierung konkurriert das Produkt mit dem Substrat um die Bindestelle am aktiven Zentrum des Enzyms. In neueren Studien konnte belegt werden, dass die Produktinhibierung einen zentralen limitierenden Faktor der Peptidolyse darstellt. Für ein Weizenglutenhydrolysat mit Flavourzyme wurde L-

Cystein als stärkster Inhibitor innerhalb eines Aminosäureclusters identifiziert (*Berends et al.*, 2014).

Die wesentlichen Bestrebungen der Forschung zur Optimierung der enzymatischen Proteinhydrolyse bestehen darin, geeignete Reaktorsysteme wie z. B. Enzym-Membran-Reaktoren (EMR) zu entwickeln. Hauptaugenmerk liegt dabei auf der prozessbegleitenden Abtrennung der Produkte, um so die Produktinhibierung zu verhindern (*Cui et al.*, 2011). *Berends et al.* (2014) beobachteten nach 20 h Peptidolyse mit Flavourzyme in einem Enzym-Membran-Reaktor (Ausschlussgröße der Membran: 10 kDa) eine Steigerung der Hydrolyseeffizienz von 2,5 mg Produkt/nkat im Batchansatz auf 4,9 mg Produkt/nkat.

1.3 Elektrodialyse

Membranverfahren sind ein wesentlicher Bestandteil der modernen Biotechnologie. Sie spielen während oder nach Biotransformationen eine zentrale Rolle bei der Produktabtrennung. Klassischerweise kommen die Pervaporation, Ionenpaar-Extraktion, Nano- bzw. Ultrafiltration, Umkehrosiose und die Elektrodialyse zum Einsatz (*Lütz et al.*, 2005).

Elektrodialyse (ED) bezeichnet einen Prozess zur Konzentration bzw. zur Abreicherung von geladenen Ionen und Molekülen aus wässrigen Lösungen, die durch eine ionenselektive Membran unter Einfluss eines elektrischen Potentials wandern (*Strathmann & Chmiel*, 1984; *Melin & Rautenbach*, 2007). Die Selektion der abzutrennenden Teilchen erfolgt zwischen ionischen und nicht ionischen Inhaltsstoffen, wobei die treibende Kraft für den Trennvorgang das elektrische Feld ist. Darin liegt der grundsätzliche Unterschied zu den druckgetriebenen Trennprozessen, wie Umkehrosiose, Nano- oder Ultrafiltration. Im Folgenden werden die konventionelle Elektrodialyse und die Elektrodialyse mit Ultrafiltrationsmembranen näher beleuchtet.

1.3.1 Prinzip und Anwendung der konventionellen Elektrodialyse

Die konventionelle Elektrodialyse wurde erstmals 1940 beschrieben. Bei diesem Verfahren ist ein Elektrodialysezellpaar (bis zu 500 Zellpaare) im Membranstapel (Stack) aus alternierend angeordneten Anionen- und Kationentauschermembranen, einer Diluat (Retentat)- und einer

Konzentrat (Permeat)- Kammer zwischen Anode und Kathode aufgebaut (Meyer & Straus, 1940; Melin & Rautenbach, 2007) (Fig. 1-10).

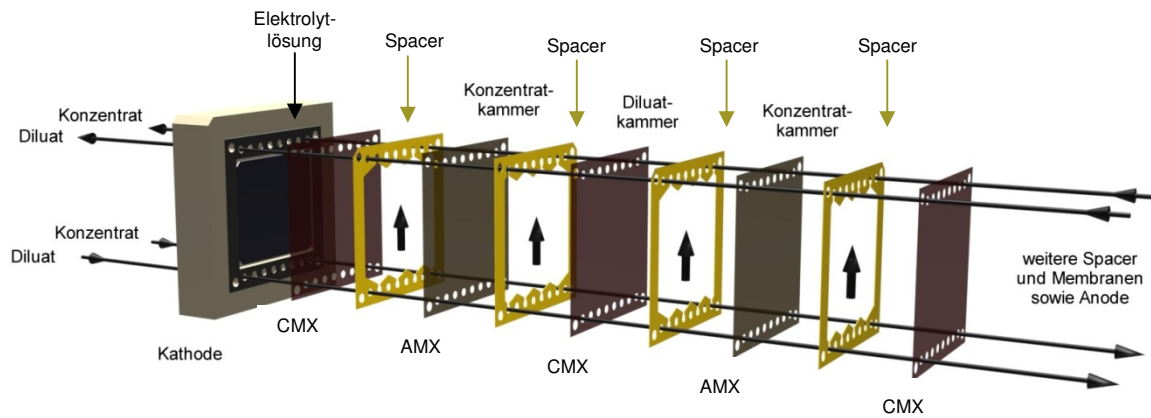
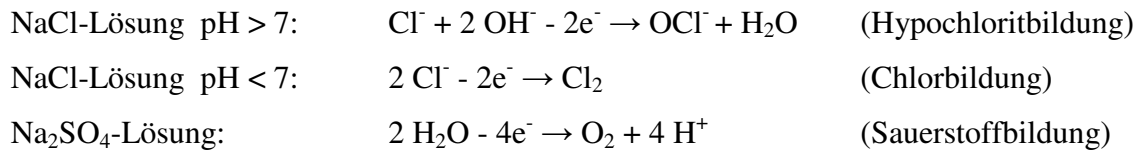


Fig. 1-10 | Aufbau des konventionellen Elektrodialyse-Stacks von Hescon GmbH (Engstingen, Deutschland), CMX – Kationenaustauschermembranen, AMX – Anionenaustauschermembranen.

Damit die einzelnen Membranen einen Abstand zwischen 0,5 bis 2 mm aufweisen, werden Abstandshalter, sogenannte „Spacer“ im Zellinneren installiert, die zudem für eine über den Querschnitt konstante, aber möglichst geringe Zelldicke sorgen (Fig. 1-10). Beim orthogonalen Anliegen einer Gleichspannung zu den Membranen wandern Anionen durch die Anionenaustauschermembran in Richtung Anode und werden von der folgenden Kationenaustauschermembran zurückgehalten. Entsprechend entgegengesetzt verhalten sich Kationen. So kommt es im Diluat zu einer Verarmung und im Konzentratkreislauf zu einer Anreicherung der Ionen. Die Elektroden werden in einem gesonderten dritten Kreislauf mit Elektrolytlösung, meist Na_2SO_4 -Lösung, umspült (Melin & Rautenbach, 2007). Um eine Verunreinigung des Elektrolyten und des Diluatkreislaufs zu vermeiden, schließen beim klassischen Stackaufbau beide Seiten mit einer Kationenaustauschermembran ab. Die erste Kammer auf beiden Seiten des Stacks ist immer der Konzentratkreislauf. Wenn Strom fließt, wandert auf der Anodenseite das Na^+ aus dem Elektrolyt ins benachbarte Konzentrat und auf der gegenüberliegenden Seite aus dem Konzentrat wieder zurück in die Elektrodenspülung. Das Elektrodialyseverfahren erlangte schon 1960 industrielle Reife und wird zur Entsalzung von Meerwasser angewandt (Lacey et al., 1963; Volckman, 1963).

Dabei finden nachfolgend dargestellte Elektrodenreaktionen statt. Die entstehenden Elektrodengase und andere Reaktionsprodukte werden mithilfe der Elektrolytlösung (Na_2SO_4) abgeführt (Shaffer & Mintz, 1966; Melin & Rautenbach, 2007):

Anode:



Kathode:



Die Wirtschaftlichkeit einer Elektrodialyse wird im Wesentlichen durch zwei Kenngrößen beeinflusst. Dies sind die Investitionskosten bzw. Materialkosten für die Membranen und die Energiekosten. Um die Membranfläche und damit die Materialkosten möglichst gering zu halten, kann die Leistungsfähigkeit der Anlage durch eine Erhöhung der Stromdichte gesteigert werden. Als limitierender Faktor tritt mit steigender Stromdichte die Konzentrationspolarisation auf, wodurch eine ionenärmere laminare Grenzschicht an der Membranoberfläche entsteht. Infolgedessen kommt es auf der Diluatseite zur kritischen Absenkung der Ionenkonzentration und auf der Konzentratseite zur Konzentrationsüberhöhung, die zum Ausfällen von anorganischen Salzen (Scaling) oder organischer Verbindungen (Fouling) führt. Dies hat das Erreichen der Grenzstromdichte und damit verbunden die Dissoziation von Wasser und eine verminderte Entsalzungsleistung zur Folge. Mit der Erhöhung der Grenzstromdichte durch eine gesteigerte und gleichmäßige tangentiale Flüssigkeitsüberströmung der Membranen kann die Entstehung der Grenzschicht verringert und die Leistung der Elektrodialyse verbessert werden (*Strathmann & Chmiel, 1984; Chmiel et al., 2011*).

Das weite Anwendungsspektrum der Elektrodialyse erstreckt sich von der Behandlung von Wasser (*Sadrzadeh & Mohammadi, 2008*) über verschiedenste Reinigungsprozesse in der chemischen Industrie. Hier sind u. a. die Trinkwassergewinnung aus Brackwasser oder die Entfernung von Fluorid, Sulfat, Nitrat und Ammonium aus dem Grundwasser (*Tahaikt et al., 2006; Kabay et al., 2008*), die Herstellung von Periodsäure und EDTA-Rückgewinnung oder die Rückgewinnung von Kupfer, Quecksilber, Zink und Chrom aus verschmutzten Gewässern zu nennen (*Hansen et al., 1997; Nunes & Peinemann, 2006*). Im Bereich der Lebensmittelbiotechnologie werden mithilfe der Elektrodialyse Kaliumtartrat aus Wein (*Gonçalves et al., 2003*) und Citrat aus Fruchtsäften (*Vera et al., 2003*) entfernt, bioaktive Peptide aus Soja-Hydrolysaten separiert (*Bazinet et al., 1998*) oder Milchsäure aus den Molkereispulwässern zurückgewonnen. Für Letzteres wird zum Teil eine spezielle Variante der Elektrodialyse (EDBM) verwendet, bei der zu den Ionenauschermembranen ebenfalls

biopolare Membranen (BP) im Stack eingesetzt werden. Bipolare Membranen sind durch eine anion- und eine kationenselektive Seite gekennzeichnet, zwischen denen ein infinitesimal dünner Flüssigkeitsfilm liegt. Bei angelegtem elektrischem Feld dissoziiert Wasser in H^+ und OH^- , was zur Gewinnung der Säure und Base aus einem Salz genutzt werden kann. Dieses Verfahren ist vor allem für die Getränkeindustrie von Interesse, da damit eine präzise pH-Absenkung von Most, Wein oder Saft ohne Zugabe von Zusatzstoffen erreicht werden kann (Sridhar, 1989; Tronc *et al.*, 1998). Biotechnologisch dient die Elektrodialyse neben der Gewinnung von schwachen Säuren (Essig-, Milch-, Salicyl- und Ascorbinsäure) aus Fermentationsbrühen (X. Wang *et al.*, 2012), auch der Abtrennung bzw. Konzentrierung von Aminosäuren (Sandeaux *et al.*, 1998).

1.3.2 Elektrodialyse mit Ultrafiltrationsmembranen

Eine wesentliche Limitierung der konventionellen Elektrodialyse wird deutlich, sobald die Abtrennung von größeren (> 200 Da) und weniger geladenen Molekülen das Ziel darstellt. Eben diese permeieren nicht durch die Anion- und Kationentauschermembranen. Mit dem kombinierten Einsatz von Ionentauschermembranen und Ultrafiltrationsmembranen (UF-Membranen) im Stack wird das Anwendungsspektrum der Elektrodialyse für wässrige Lösungen erheblich erweitert und die geschilderte Einschränkung aufgehoben. Die Isolierung von Polyphenolen aus Tabakextrakten oder die Abtrennung der Katechine aus Grünteeextrakten (Labbé *et al.*, 2005) bildeten die ersten Applikationen. Die neue Technologie der Elektrodialyse mit UF-Membranen (EDUF) eröffnet die Möglichkeit der Trennung von Molekülen nach Ladung und Molmasse.

Vergleichbar zur konventionellen Elektrodialyse wird die Effektivität des Verfahrens ebenso maßgeblich durch die Membranfläche, die Anzahl der Zellpaare im Stack, die angelegte Stromdichte sowie die Flussrate beeinflusst (J.-F. o. Poulin *et al.*, 2007). Allerdings kann je nach Trennproblem die molekulare Ausschlussgröße (cut-off) der UF-Membran angepasst werden. Insbesondere im Bereich der modernen Lebensmitteltechnologie, beispielsweise bei der Anreicherung von bioaktiven Peptiden aus einem komplexen Proteinhydrolysat, eröffnet die EDUF neue Perspektiven (Ohlrogge & Ebert, 2012). So wurden z. B. nach 90 min Betriebszeit 30 % der anti-hypertensiven Peptide aus einem tryptischen β -Lactoglobulin-Hydrolysat unter Verwendung einer UF-Membran (cut-off 20 kDa) konzentriert (Doyen *et al.*, 2013). Weiterhin konnte ein 800 Da Peptid mit antibakteriellen Eigenschaften gegenüber einigen gramnegativen und grampositiven Bakterien mittels EDUF von einem Hydrolysat aus

Krabbenresten separiert werden (*Doyen et al.*, 2011). In der Literatur werden bislang nur Elektrodialyseverfahren für die Weiterverarbeitung nach einer abgeschlossenen Proteinhydrolyse aufgeführt. Es existieren bislang keine Studien die aufzeigen, inwieweit eine Kombination aus Peptidolyse (vgl. Kapitel 1.2.4) und Elektrodialyse zur *in situ* Abtrennung der freigesetzten Produkte (Aminosäuren und kleinere Peptide), bei gleichzeitigem Erhalt der Peptidaseaktivität, realisierbar ist.

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Der Basidiomycet *Flammulina velutipes* produziert in Submerskultur eine vielversprechende Mischung an Exo- und Endopeptidasen. Einen Schwerpunkt dieser Arbeit bildeten Untersuchungen, welche das Potenzial dieser Peptidasemischung für die Weizenglutenhydrolyse hinsichtlich der peptidolytischen Eigenschaften, der Hydrolyseeffizienz und der Spaltspezifität evaluierten. Ferner sollte herausgestellt werden, ob die aus dem Kulturüberstand von *Flammulina velutipes* gewonnenen Peptidasen als Alternative für das kommerziell verfügbare Enzympräparat Flavourzyme aus *Aspergillus oryzae* in Betracht kommen.

Zwar bestehen Vermutungen, dass die enzymatische Proteinhydrolyse von Weizengluten limitierenden Faktoren unterliegt, allerdings waren diese zum Beginn nachfolgender Untersuchungen wissenschaftlich nicht näher konkretisiert und publiziert. Als denkbare Ursachen kommen insbesondere die inhibierende Wirkung der freigesetzten Aminosäuren und Peptide, die gegenseitige Hydrolyse der vorhandenen Peptidasen (Autopeptidolyse) und ein Mangel an verfügbaren Spaltstellen im Substrat für die Enzyme infrage. Die vorliegende Arbeit hatte das Ziel, die aufgeführten Ursachen näher zu untersuchen, zu bewerten und gleichzeitig ein effektives Verfahren aufzuzeigen, welches die Limitierungen der Peptidolyse minimiert und so zu einer Steigerung des Hydrolysegrads führt. Hierfür wurde die Elektrodialyse, eine Membrantechnik, bei der zusätzlich zum Konzentrationsgradienten ein elektrisches Potenzial als treibende Trennkraft fungiert, als Möglichkeit zur Abtrennung der Reaktionsprodukte erprobt und an die Erfordernisse für eine zielgerichtete Anwendung während der Peptidolyse angepasst.

Ein weiterer Untersuchungsschwerpunkt widmete sich den prolylspezifischen Peptidasen. Diese unterliegen einem stetig steigenden Interesse der Lebensmittel- und Pharmaindustrie beispielsweise zur Entbitterung von Proteinhydrolysaten, zur Spaltung der Zöliakie-Epitope und als Target für diverse Erkrankungen wie Depressionen, Alzheimer, Parkinson oder Herz-Kreislauf-Problemen. Vor diesem Hintergrund wird ein Enzym, welches prolylspezifische Peptidaseaktivität im Kulturüberstand von *Flammulina velutipes* aufweist, gereinigt, biochemisch charakterisiert und der bereits bekannten kommerziellen prolylspezifischen Peptidase An-Pep aus *Aspergillus niger* gegenübergestellt.

2 Vorwort zur Publikation „Hydrolysis of wheat gluten by combining peptidases of *Flammulina velutipes* and electro dialysis“

Die enzymatische Hydrolyse von Pflanzenproteinen löste in den letzten Jahren die chemische Hydrolyse bei der Produktion von Speisewürze im industriellen Maßstab ab (vgl. Kapitel 1.2). Gleichwohl erfolgt bis dato keine vollständige Spaltung aller Peptidbindungen (Hydrolysegrad < 40 %). Somit verbleibt nicht hydrolysiertes Substrat im Batchansatz, welches neben möglichen geschmacklichen Unterschieden auch wirtschaftliche Verluste und Filtrationsprobleme verursacht.

Zu Beginn der experimentellen Untersuchungen dieser Publikation waren in der Literatur nur Vermutungen angeführt, welche limitierenden Faktoren für die enzymatische Proteinhydrolyse existieren (vgl. Kapitel 1.2.3). Die Hypothese, dass während der Hydrolyse aus den Proteinen freigesetzte Aminosäuren oder Peptide inhibierend wirken, ist für Weizengluten bislang nur unzureichend wissenschaftlich belegt. In nachfolgender Publikation wurde festgestellt, dass vor allem Hydrolysat-Fractionen kleiner 3 kDa eine Produktinhibierung verursachen und diese nur durch bestimmte Aminosäuren ausgelöst wird. Zusätzlich zu den Inkubationsstudien aller einzelnen proteinogenen Aminosäuren, die während der Weizenglutenhydrolyse mit dem kommerziellen Enzympräparat Flavourzyme und der Peptidasenmischung aus dem Basidiomycet *Flammulina velutipes* freigesetzt wurden, konnte ein neuer Lösungsansatz zur prozessbegleitenden Abtrennung der Reaktionsprodukte werden.

Neben dem für diese Anwendung etablierten Enzym-Membran-Reaktor-System wurde im Rahmen dieser Publikation eine neue Membrantechnik, die Elektrodialyse, für die erstmalige Anwendungsmöglichkeit zur Peptidolyse (vgl. Kapitel 1.2.4) von Weizengluten optimiert. Hierfür musste die klassische Elektrodialyse (vgl. Kapitel 1.3.1) modifiziert werden. Die Elektrodialyse kann nur partikelfrei genutzt werden, weshalb vor jedem Elektrodialyseschritt ein Zentrifugation des Hydrolysats vorangestellt werden muss, sodass noch nicht hydrolysiertes ungelöschliches Gluten nicht die Membranen verstopft. Dementsprechend erfolgte die effektive Produktabtrennung mithilfe von Ultrafiltrationsmembranen (cut-off 4 kDa) und einem diskontinuierlichen Prozessverlauf. Unter den angeführten Bedingungen wurde so eine deutliche Verbesserung des Hydrolysegrads im Vergleich zum Batchansatz erzielt.

3 Hydrolysis of wheat gluten by combining peptidases of *Flammulina velutipes* and electro dialysis

Reproduced with permission from *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2013, 61 (36), pp 8641–8649. Copyright 2013 American Chemical Society.

Abstract

Wheat gluten hydrolysis, used to generate seasonings, was studied using peptidases from *Flammulina velutipes* or commercial Flavourzyme. L-Amino acids were added in a range from 0.5 to 75.0 mM, and L-isoleucine, L-leucine, L-valine and L-phenylalanine, were identified as the strongest inhibitors for both enzyme mixtures. L-serine inhibited *Flammulina velutipes* peptidases only, while L-histidine and L-glutamine inhibited Flavourzyme peptidases only. To reduce product inhibition by released L-amino acids, electro dialysis was explored. An increase of the degree of hydrolysis of up to 60 % for *Flammulina velutipes* peptidases and 31 % for Flavourzyme compared to the best control batch was observed after applying an electro dialysis unit equipped with an ultrafiltration membrane for two times 1 h during the 20 h of hydrolysis. The total transfer of free L-amino acids into the concentrate reached 25-30 % per hour. Peptides passed the membrane less easily, although the nominal cut-off was 4 kDa.

Keywords

Enzymatic hydrolysis, wheat gluten, product inhibition, electro dialysis, *Flammulina velutipes*

3.1 Introduction

The water-insoluble wheat gluten, a by-product of the wheat starch industry, is an abundant source of protein. Dry wheat gluten contains up to 8 % moisture, varying amounts of starch, lipids, fiber and 80-85 % proteins, which can be divided into glutenins and gliadins. Gliadins have a low level of charged L-amino acids, but are rich in L-proline and L-glutamine (*Van Der Borgh et al.*, 2005). The full or partial hydrolysis of gluten is a universal process carried out for the production of L-glutamate rich seasonings and bioactive peptides, and for improving nutritional value, imparting texture, increasing solubility, adding foaming or coagulation properties. The traditional hydrochloric acid hydrolysis may form toxicologically critical substances, such as 3-chloro-1,2-propanediol (3-MCPD) and 1,3-dichloro-2-propanol (1,3-DCP), and results in high sodium chloride concentrations in the neutralized products. The enzymatic processing alternative, introduced into industry recently, provides more sustainable and environmentally-friendly conditions (*Kong et al.*, 2007; *Koo et al.*, 2011).

An extensive hydrolysis, preferably using mixtures of endo- and exo-peptidases is desired to reduce the bitterness of the hydrolysate as well as to obtain a high level of free L-glutamate and small peptides (*Kong et al.*, 2007). Numerous studies showed the hydrolytic efficiency of commercially available peptidases, such as Alcalase, Pepsin, Neutrase and Protamex. A maximum degree of hydrolysis (DH) of 15.8 % was observed using Alcalase (*Kong et al.*, 2007). Other studies using trypsin and chymotrypsin achieved a DH of 2.8 % and 4.3 %, respectively, while Flavourzyme (from *Aspergillus oryzae*) was particularly efficient and gave 31.5 % (*Mutilangi et al.*, 1995; *Schlichtherle-Cerny & Amadò*, 2002).

The traditional heterogeneous batch fermentations are lasting for months and are characterized by a low reaction rate (*Adler-Nissen*, 1976). It was postulated that the hydrolytic efficiency of peptidases is decreasing during the established processes due to accumulating soluble peptides and free L-amino acids (*Hardwick & Glatz*, 1989; *Souissi et al.*, 2007; *Cabrera-Padilla et al.*, 2009). Product inhibition was first described for the hydrolysis of soluble synthetic substrates (*Thomas et al.*, 1951). Since then, the effect was recurrently observed with various peptidases and different substrates, e.g. soy protein, casein, gelatin, and wheat and corn gluten (*Adu-Amankwa & Constantinides*, 1984; *Mutilangi et al.*, 1995).

Thus, high peptidase activities and long incubation times are required reducing the economic viability of this procedure. Product inhibition could be overcome by separating the products

of hydrolysis step-wise or continuously (*Cheison et al.*, 2006). Enzyme membrane reactors (EMR) allowed a rapid separation of bioactive peptides from the hydrolysate: *Cui et al.* (2011) used a continuous EMR with ultrafiltration (UF) membranes (cut-off 1 kDa) to produce bioactive peptides from wheat gluten. *Cabrera-Padilla et al.* (2009) hydrolyzed whey protein using Chymotrypsin and Carboxypeptidase A in an EMR to obtain low levels of phenylalanine for phenylketonuria patients. They noticed that the permanent removal of L-amino acids through the membrane of the EMR implied higher reaction rates compared to the batch experiment.

Electrodialysis (ED) is widely applied in the food industry for water desalination, for the production of table salt or organic acids (*Huang et al.*, 2007; *Sadrzadeh & Mohammadi*, 2008; *X. Wang et al.*, 2012; *Ghyselbrecht et al.*, 2013), for deacidification of fruit juice (*Vera et al.*, 2003) or wine stabilization (*Gonçalves et al.*, 2003), but not as a separation process combined with the hydrolysis of proteins. It is an electromembrane process using an electrical potential gradient to transport ions through ion-permeable membranes from one solution to another. Commonly, ion exchange membranes are used, which are selective for anions or cations. Consequently, this technology may also separate charged L-amino acids (*Sandeaux et al.*, 1998; *Readi et al.*, 2011). *Readi et al.* (2011) focused on the isolation of L-glutamic acid and L-aspartic acid from a mixture of L-amino acids at pH 6.0 using electro dialysis with commercially available ion exchange membranes. Because of the different pI the negatively charged Glu and Asp were separated with a recovery of around 90 % and 83 %, respectively. *Kumar et al.* (2009) provided an example of the separation of L-glutamic acid (recovery 86 %) and L-lysine from their mixture due to their different pI values using ion-exchange membranes at pH 8. The combination of electro dialysis with ultrafiltration (UF) membranes showed potential applications for the food industry, notably for the separation and recovery of bioactive compounds from food hydrolysates (*J.-F. o. Poulin et al.*, 2007; *Firdaous et al.*, 2010) or the isolation of polyphenols from tobacco extract (*Bazinet et al.*, 2005) and from green tea infusion (*Labbé et al.*, 2005). *Doyen et al.* (2013) demonstrated enzymatic hydrolysis of β -lactoglobulin and electro dialysis stacked with UF membranes in one step. The total migration rate of the antihypertensive peptide ALPMHIR was 66 % after 240 min.

The objective of this study was to investigate the inhibitory effect of L-amino acids and peptides generated during wheat gluten hydrolysis using commercial Flavourzyme. A mixture of peptidases from the basidiomycete *Flammulina velutipes* was included into the study,

because this edible fungus, when cultivated on wheat gluten, also produced savory hydrolysates (Grimrath *et al.*, 2011). Electro dialysis was configured with UF or ion exchange membranes and examined as a tool to enhance the degree of hydrolysis.

3.2 Material and Methods

3.2.1 Material

All used chemicals and solvents were of analytical grade or HPLC grade and obtained from Sigma-Aldrich GmbH (Taufkirchen, Germany) and VWR International GmbH (Darmstadt, Germany), respectively.

3.2.2 Cultivation of *Flammulina velutipes*

Precultures of *Flammulina velutipes* (DSMZ, no. 1658) were grown according to Grimrath *et al.* (2011) for seven days in 100 mL standard nutrient medium (30 g/L *D*-glucose monohydrate, 3 g/L yeast extract, 4.5 g/L L-asparagine monohydrate, 0.5 g/L MgSO₄, 1.5 g/L KH₂PO₄, 1 mL trace element solution, pH 6.0 [0.08 g/L FeCl₃, 0.09 g/L ZnSO₄·7 H₂O, 0.005 g/L CuSO₄·5 H₂O, 0.027 g/L MnSO₄, 0.4 g/L Titriplex III]) at 150 rpm and 24 °C. 20 mL of the mycelium culture were separated by centrifugation (10 min, 5000 rpm, 4 °C) and washed two times with 20 mL of mineral salt medium (MM) (0.5 g/L MgSO₄, 1.5 g/L KH₂PO₄, 1 mL trace element solution, pH 6.0). For the main cultures 230 mL of fresh MM with 4 % dry sterilized (130-135 °C, 8 h) gluten were inoculated with 20 mL of the pre-washed mycelia. After 6 or 7 days, the supernatant was concentrated using ultrafiltration with a molecular weight cut-off (MWCO) of 3 kDa (Millipore, Bedford, MA) for the enzymatic conversions.

3.2.3 Preparation of wheat gluten hydrolysates

Hydrolysis experiments were carried out with dry sterilized (130-135 °C, 8 h) wheat gluten concentrations from 1 to 10 % (*w/v*) at 800 rpm, 45 °C and pH 6.0 in 25 mM sodium acetate buffer to maintain reaction optima of the enzymes with two different peptidase mixtures from either *Flammulina velutipes* (Fve) or Flavourzyme from Novozymes (Copenhagen, Denmark), using standardized peptidase activities per mL hydrolysate. The enzyme reaction was stopped after 20 h by heat inactivation at 100 °C for 10 min. For each hydrolysate both,

the concentration of L-amino acids [mM/g gluten] and soluble protein [mg/L] were investigated over time. The degree of hydrolysis (DH [%]) was calculated after *Nielsen et al.* (2006) using equation (1)

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

with h as the milli-equivalent/g protein of α -amino group generated by the peptidase and h_{tot} as the 8.3 milli-equivalent/g of total α -amino groups from wheat gluten.

3.2.4 Quantification of the peptidase activity

The azocasein assay is a photometric end-point method with a substrate solution consisting of 2.5 % azocasein in 0.1 M $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ buffer at pH 6. Enzyme activity was measured at 37 °C in a total volume of 1.5 mL containing 200 μL of substrate and 275 μL of $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ buffer (0.1 M, pH 6). Reaction was started by the addition of 25 μL of enzyme solution at 43 °C and stopped after 20 min with 1 mL of trichloroacetic acid (3 %). Blanks were prepared by adding enzyme after trichloroacetic acid treatment. Blanks and samples were stored on ice for 10 min and centrifuged at 15,000 rpm for 15 min. The absorbance of the supernatant was measured at 366 nm using a spectrophotometer (UV-1650 PC, Shimadzu, Duisburg, Germany). One arbitrary U [aU] is defined as the enzyme activity that catalyses an increase of absorbance of 0.01 at 43 °C per min (*Iversen & Jørgensen*, 1995).

3.2.5 Quantification of L-amino acids

L-Amino acids were analyzed by RP-HPLC with fluorescence detection (Shimadzu RF-10AxL, Duisburg, Germany) and *o*PA precolumn derivatization: 110 μL of borate buffer (0.5 M, pH 10), 10 μL hydrolysate and 20 μL of *o*PA-reagent (100 mg *o*-phthaldehyde, 1 mL borate buffer, 9 mL methanol, 100 μL 3-mercaptopropanoic acid) were incubated for 2 min and stopped with 50 μL of 1 M acetic acid. 20 μL of the derivatized sample was injected and measured with a fluorescence detector ($\lambda_{\text{excitation}} = 330 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{emission}} = 460 \text{ nm}$). Separation was performed with a Nucleodur C18 Pyramid column (250 x 4 mm, 5 μm , Macherey-Nagel, Düren, Germany) at a flow rate of 1 mL/min 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 100 % A, 50-55 min 10 % A

and 55-60 min 10 % A. The concentration of L-amino acids was calculated according to five point calibration curves for each L-amino acid using β -alanine (30 μ M) as an internal standard. oPA does not react with imines; thus, L-proline and hydroxyproline and also L-cysteine were not detected.

3.2.6 Quantification of soluble protein amount

Soluble protein concentration was measured after *Lowry et al.* (1951) using the DCTM Protein assay (BIO-RAD no. 500-0111, Munich, Germany) and bovine serum albumin (0.2-1.0 mg/mL) as calibration standard.

3.2.7 Inhibitor studies

Experiments to investigate the postulated product inhibition for wheat gluten hydrolysis were performed as described for the regular 20 h hydrolyses, but using a total volume of 1.5 mL and taking aliquots of 60 μ L.

3.2.8 Influence of hydrolysate components

10, 50, or 100 g/L gluten were hydrolyzed by *Flammulina velutipes* peptidases or Flavourzyme (10 kaU/mL hydrolysate) and blended with various amounts of 20 h hydrolysate solutions (0, 10, 30 and 50 % volume of hydrolysate/1.5 mL) into 25 mM sodium acetate buffer at pH 6. The concentrations of L-amino acids [M/h] produced were plotted against the substrate concentrations [g/L] according to Lineweaver-Burk. The influence of peptides </>3 kDa and >10 kDa on product inhibition was measured using ultra-filtered hydrolysate solutions (MWCO of 3 kDa and 10 kDa, Millipore, Bedford, MA) with 100 g/L gluten for both enzyme compositions and compared to a control in buffer.

3.2.9 Influence of single L-amino acids

The inhibitory effect on *Flammulina velutipes* peptidases and Flavourzyme were determined by performing wheat gluten hydrolysis for 20 h (100 g/L gluten) in the presence of single L-amino acids, such as L-alanine, L-arginine, L-aspartic acid, L-asparagine, L-cysteine, L-glutamic acid, L-glutamine, L-glycine, L-histidine, L-isoleucine, L-leucine, L-lysine, L-

methionine, L-phenylalanine, L-proline, L-serine, L-threonine, L-tryptophan, L-tyrosine and L-valine (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany) in different concentrations (0.5-75.0 mM). The inhibitory effect was expressed as relative inhibition [%] of produced L-amino acids in comparison to the control without inhibitor (0 % inhibition).

An enzyme activity-dependent inhibitory effect was calculated from the hydrolysis of 100 g/L gluten with different *Flammulina velutipes* and Flavourzyme activities and L-isoleucine (25 mM in the assay) as an exemplary inhibitor.

3.2.10 Electrodialysis

Electrodialysis experiments were carried out using the laboratory-scale EDL02 (Hescon GmbH, Engstingen, Germany) equipped with a DSE electrode to separate the L-amino acids from the wheat gluten hydrolysates during the hydrolysis. There was a diluate (feed solution = hydrolysate), concentrate (permeate solution = L-amino acids and peptides) and an electrolyte compartment (Fig. 3-1). Different configurations of the membrane stack with anion/cation exchange (AMX/CMX) or ultrafiltration (UF) membranes are compiled in Tab. 3-1. The stack configuration with UF-membranes consisted of two circuits to increase the transfer rate, wherein every diluate solution is surrounded by a concentrate solution on the anode side and a second on the cathode side.

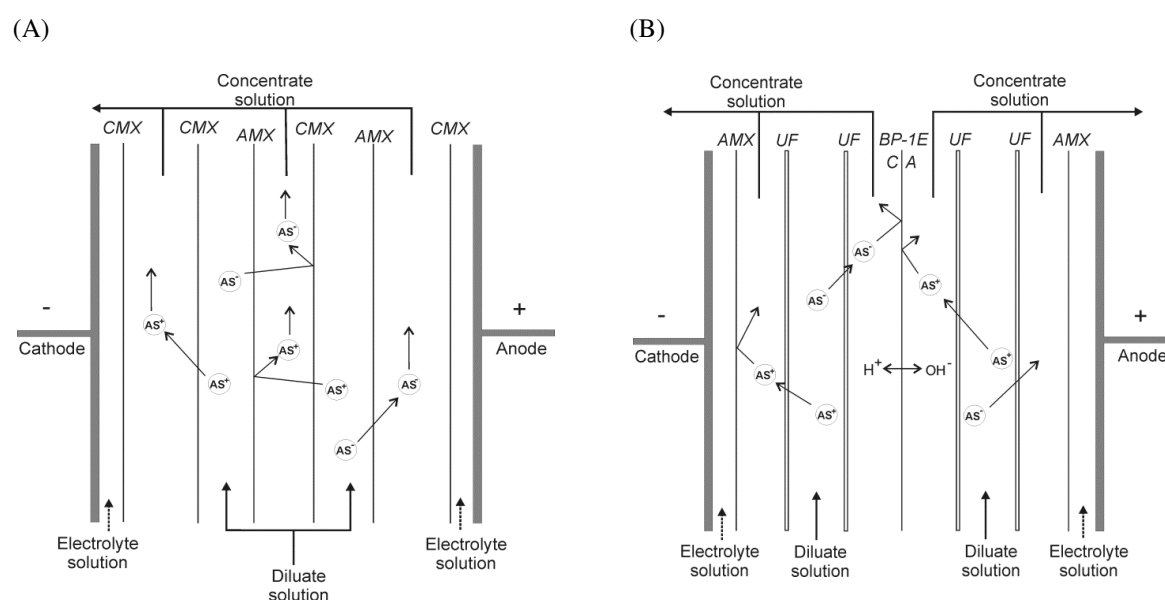


Fig. 3-1 | Schematic configuration of the electro dialysis stack for the separation of amino acids (AS), cationic membrane (CMX), anionic membrane (AMX), bipolar membrane (BP-1E) to block ion migration and delivery of the counter-ion, and ultrafiltration membrane (UF). (A) Traditional stack configuration with AMX and CMX membranes; (B) novel configuration with UF, BP and AMX membranes.

The two circuits were separated by a bipolar membrane. The function of the bipolar membrane was to block ion migration and delivery of the counter-ion. The effective membrane area was 57 cm² for each membrane, and the flow rate was 30 mL/min. Silicone/PES spacers with a thickness of 800 μm were placed between the membranes in the diluate and concentrate compartments.

Tab. 3-1 | Main characteristics of the membranes used.

Characteristics	Nadir UH004P	NEOSEPTA BP-1E	NEOSEPTA AMX	NEOSEPTA CMX
Type	Ultrafiltration membrane(PESH with PE/PP as backing material)	Bipolar membrane composition of cationic and anionic membranes	Strongly basic anion permeable	Strongly acid cation permeable
Electric resistance [Ω/cm ²]	-	0.9-1.7	2.4	3.0
Membrane thickness [nm]	0.21-0.25	0.22	0.14	0.17
Thermal stability [°C]	95	40	40	40
Nominal MWCO [kDa]	4	-	0.2	0.2
Company	Microdyn-Nadir	Tokuyama	Tokuyama	Tokuyama

3.2.11 Process evaluation

The standard diluate buffer contained 25 mM sodium acetate, pH 6, the concentrate buffer 2.5 mM sodium acetate pH 6 and Na₂SO₄ was used as the electrolyte (500 mL). The experiments were carried out at constant voltage (variable from 1.0 to 12.0 V) and a maximal current density of 40 mA/cm². To assess the process conductivity, was measured with SevenMulti (Mettler-Toledo GmbH, Schwerzenbach, Switzerland), temperature and transfer rate of the ions from the diluate into the concentrate, expressed as recovery, were determined. Some properties, such as diluate and concentrate volume, electrolyte concentration and effective voltage were varied as outlined below. The recovery is the percentage of L-amino acids originally present in the diluate that is transported to the concentrate during one h on 150 mL compartment volume, as given in equation (2):

$$R [\%] = (n_{i, \text{concentrate}, t} / n_{i, \text{diluate} + \text{concentrate}, t}) \times 100 \quad (2)$$

with n as the amount of moles of L-amino acids present in the diluate and/or concentrate of component i [mol] at time t [h] and the recovery R .

3.2.12 Improvement of the conditions of electro dialysis

The recovery of a model solution consisting of L-glutamic acid, L-asparagine, L-serine and L-leucine (50 mM in 25 mM sodium acetate buffer) was measured under different conditions: The compartment volumina (100, 150, 200 and 250 mL) of diluate and concentrate, the pH values (5.0, 5.5, 6.0 and 6.5), the electrolyte concentration (0.25 and 2.50 % Na₂SO₄), the applied voltages (1, 3, 6, 9 and 12 V) and the concentration of the L-amino acid solution (10, 50 and 100 mM) during 1 h electro dialysis were systematically varied.

3.2.13 Enzymatic wheat gluten hydrolysis with electro dialysis

Considering the low water solubility of wheat gluten, a discontinuous process was realized. Hydrolyses were performed with different wheat gluten concentrations in a total volume of 150 mL. Aliquots of 100 μ L of diluate, concentrate and hydrolysate were taken over time. Prehydrolysis at 45 °C (water bath, 200 rpm) and centrifugation of the prehydrolysates (5000 rpm, 5 min, 4 °C) to prepare a particle-free solution were carried out prior to electro dialysis. The separation process was performed at 12 V with a current density of 14.0 mA/cm², 150 mL compartment volume at 30 to 35 °C and 0.25 % Na₂SO₄ as electrolyte solution. Hydrolysis was performed using 10, 50 and 100 g/L gluten, *Flammulina velutipes* peptidases or Flavourzyme (1, 10 and 35 kaU/mL hydrolysate), 1, 3 or 6 h prehydrolysis in a total hydrolysis time of 20 h. Experiments were performed alternating with two hydrolysis samples (sample 1 (S1) and sample 2 (S2)) as shown in Fig. 3-2. For every experiment a batch control was carried along. Hydrolysate samples were analyzed for peptidolytic activity, the concentration of L-amino acids [mM/g gluten] and the soluble peptides [mg/mL].

0 h – 3 h	4 h	5 h	7 h	8 h	9 h	20 h
prehydrolysis (45 °C)	electro dialysis with S1 (30-35 °C)	hydrolysis S1 (45 °C)	hydrolysis S1 and S2 (45 °C)	electro dialysis with S1 (30-35 °C)	hydrolysis S1 (45 °C)	hydrolysis S1 and S2 (45 °C)
	hydrolysis S2 (45 °C)	electro dialysis with S2 (30-35 °C)		hydrolysis S2 (45 °C)	electro dialysis with S2 (30-35 °C)	

Fig. 3-2 | Experimental design of the enzymatic wheat gluten hydrolysis in combination with electro dialysis for a prehydrolysis time of 3 h with S1 is sample 1 and S2 is sample 2.

3.2.14 Statistical analysis

The inhibitory effect of L-amino acids was subjected to statistical analysis (error probability $p < 0.05$) using the one-way ANOVA of the Origin 6.1 software. All data presented are averages of duplicate measurements. Numerous experiments were conducted and single parameters, such as enzyme activity, were changed to distinguish critical from insignificant factors; for the bulk of these measurements the standard deviation of repetitions was typically below 5 %.

3.3 Results and Discussion

3.3.1 Inhibitory effect of components of wheat gluten hydrolysate

In order to evaluate the inhibitory effect of hydrolysis products and to determine the type of inhibitor, the reaction rate at different substrate concentrations was investigated by adding various volumes of hydrolysate solutions. For each experiment the concentration of L-amino acids produced was linearized according to Lineweaver-Burk (Fig. 3-3, A and B).

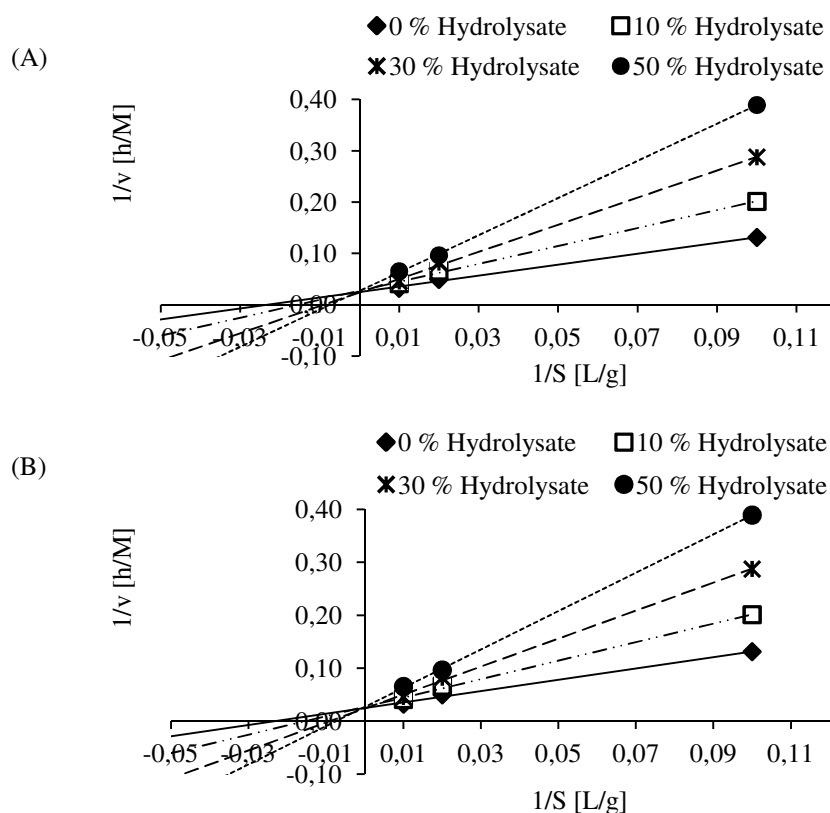


Fig. 3-3 | Lineweaver-Burk plots for the release of L-amino acids [M/h] performed with the addition of different volumes of hydrolysate and 100 g/L gluten for 20 h, at pH 6 and 45 °C with (A) Flavourzyme and (B) *Flammulina velutipes* peptidases (10 kaU/mL hydrolysate each), (0 % (v/v), 10 % (v/v), 30 % (v/v), 50 % (v/v) hydrolysate).

The relative inhibition increased with higher percentages of added hydrolysate fractions. Peptidases of *Flammulina velutipes* were slightly stronger inhibited with increased DH compared to Flavourzyme. Peptidolysis of 10 g/L wheat gluten with 50 % of hydrolysate added resulted in a reduction of L-amino acid released of up to 66 % for *Flammulina velutipes* peptidases and of 60 % using Flavourzyme. The inhibition for both Flavourzyme and *Flammulina velutipes* peptidases was competitive (Fig. 3-3, A and B). Kinetic constants were not calculated, because mixtures of endo- and exopeptidases were used. A previous study on Alcalase found a competitive inhibition by the hydrolysate (*J. Adler-Nissen, 1986*). *Apar & Ozbek (2010)* determined product inhibition for Alcalase acting on corn gluten hydrolysate and reported a noncompetitive inhibition type.

To evaluate which compounds were responsible for the product inhibition, wheat gluten hydrolysates were fractionated by UF. The fractions <3 kDa, 3-10 kDa and >10 kDa were incubated in different percentages with wheat gluten and peptidase preparations. The addition of peptide fractions 3-10 kDa and >10 kDa decreased the DH compared to the control for both Flavourzyme and *Flammulina velutipes*. The fraction <3 kDa showed the strongest inhibitory effect on the release of L-amino acids and soluble peptides (data not shown). This fraction mainly consisted of L-amino acids, di- and tripeptides. Therefore, the focus was put on the inhibitory effect of single L-amino acids.

3.3.2 Inhibitory effects of L-amino acids

A suspension of 100 g/L gluten was supplemented with 25 mM of each L-amino acid and incubated. The presence of single L-amino acids resulted in inhibitory effects on the release of L-amino acids as well as on soluble peptides with both Flavourzyme and *Flammulina velutipes* enzymes. Using Flavourzyme, the hydrolysis of soluble peptides was more strongly inhibited than the release of free L-amino acids (Tab. 3-2).

The hydrophobic L-amino acids L-isoleucine, L-leucine, L-valine and L-phenylalanine were identified as the strongest inhibitors of both peptidase mixtures. *Koo et al. (2011)* revealed a possible relationship between the DH and the hydrophobic amino acid content of wheat gluten hydrolysates obtained by Flavourzyme. The presence of 25 mM L-isoleucine resulted in a relative inhibition of >50 % in comparison to the control. L-serine inhibited only *Flammulina velutipes* peptidases, while L-histidine and L-glutamine inhibited only Flavourzyme peptidases (Tab. 3-2). The inhibitory effect of L-glutamine is remarkable, because this substance is

precursor to L-glutamic acid, the major target compound of the entire process (Aaslyng *et al.*, 1999; Dunkel *et al.*, 2007). Bacon (1965) supposed that the L-amino acids remain in the active site of the peptidase, thereby preventing the attachment of a new substrate molecule and resulting in a competitive inhibition, as was found in this work (Fig. 3-3).

Tab. 3-2 | Inhibitory effect [%] of L-amino acids [25 mM each] compared to the control without inhibitor added (0 % inhibition) during hydrolysis of 100 g/L gluten for 20 h, at pH 6 and 45 °C with Flavourzyme or *Flammulina velutipes* peptidases (10 kaU/mL each), respectively.

L-Amino acid		Relative inhibition of the L-amino acid release [%]		Relative inhibition of the soluble peptide release [%]	
		Flavourzyme	<i>Flammulina velutipes</i>	Flavourzyme	<i>Flammulina velutipes</i>
Alanine	Ala	-	-	23.1 ± 2.7	-
Arginine	Arg	-	-	-	-
Asparagine	Asn	-	-	26.4 ± 1.2	-
Aspartic acid	Asp	-	-	-	-
Cysteine	Cys	-	-	-	-
Glutamic acid	Glu	-	-	-	-
Glutamine	Gln	23.5 ± 2.0	-	48.9 ± 3.8	-
Glycine	Gly	-	-	-	-
Histidine	His	39.5 ± 0.8	-	48.3 ± 1.8	-
Isoleucine	Ile	54.5 ± 0.8	57.1 ± 1.3	34.4 ± 4.1	51.3 ± 1.1
Leucine	Leu	42.4 ± 2.8	50.2 ± 1.1	26.5 ± 4.4	22.2 ± 2.4
Lysine	Lys	-	-	-	-
Methionine	Met	-	-	-	-
Phenylalanine	Phe	34.9 ± 4.0	21.9 ± 1.8	37.1 ± 1.7	30.2 ± 3.9
Proline	Pro	-	-	-	-
Serine	Ser	-	34.3 ± 1.8	-	16.7 ± 1.8
Threonine	Thr	-	-	6.5 ± 0.8	-
Tryptophan	Trp	-	-	-	-
Tyrosine	Tyr	-	-	-	-
Valine	Val	28.6 ± 0.6	51.1 ± 3.5	14.0 ± 1.0	27.7 ± 0.3

L-Leucine was identified as competitive inhibitor of an intracellular aminopeptidase of *Lactobacillus acidophilus* (Machuga & Ives, 1984). Derivatives, such as isoleucine-thiazolidine were described as dipeptidyl peptidase IV inhibitor (Pederson *et al.*, 1998). L-Amino acids were also found to feedback inhibit in allosteric systems, such as L-isoleucine for the biosynthetic L-threonine deaminase (Changeux, 1961) and L-histidine for the ATP-PRPP-pyro-phosphorylase (*S. typhimurium*) (Martin, 1963).

The spectrum of the L-amino acids released varied depending on inhibitor and peptidase preparation. L-leucine and L-isoleucine showed similar effects in reducing almost all L-amino acid concentrations, most likely because of their structural similarity. In the case of

Flavourzyme, the incubation with L-leucine or L-isoleucine showed a decreased production of L-threonine, L-glycine and L-valine, while *Flammulina velutipes* peptidases remained unaffected. The release of L-glutamine was reduced in the presence of every L-amino acid.

To explore critical inhibitory thresholds, the L-amino acids were added in a range from 0.5 to 75.0 mM (Fig. 3-4). With increasing concentration of the respective L-amino acid the DH, measured as concentration of released free L-amino acids, decreased. Using Flavourzyme, the inhibitory effect of L-isoleucine was stronger than with L-leucine, followed by L-histidine > L-valine > L-phenylalanine > L-glutamine. The peptidases of *Flammulina velutipes* were inhibited by L-isoleucine, followed by L-valine > L-leucine > L-phenylalanine > L-serine at the same concentrations. At higher peptidase activity and L-isoleucine concentrations the inhibitory effect on Flavourzyme was stronger than on *Flammulina velutipes* peptidases.

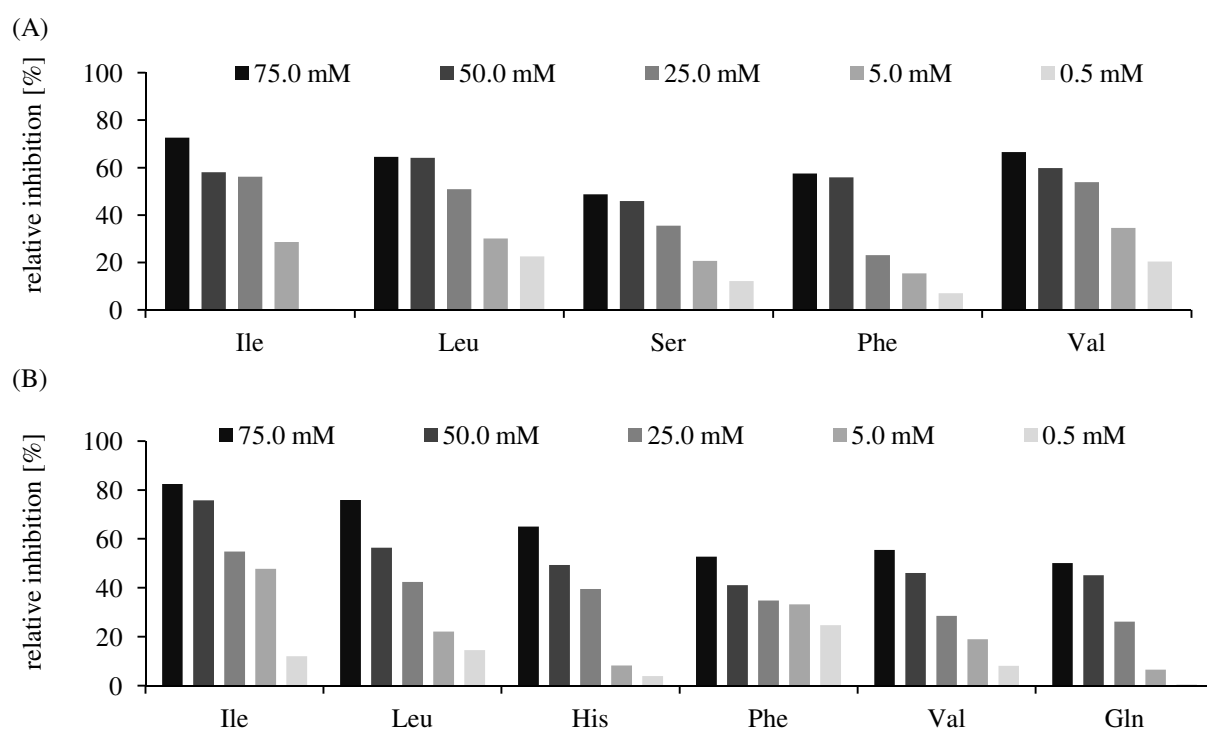


Fig. 3-4 | Concentration-dependent inhibitory effect [%] of L-amino acids [0.5, 5, 25, 50, 75 mM] during hydrolysis of 100 g/L gluten for 20 h, at pH 6 and 45 °C with *Flammulina velutipes* (A) or Flavourzyme (B) (10 kaU/mL hydrolysate each) expressed as release of L-amino acids in comparison to the control.

The following concentrations of inhibitory L-amino acids accumulated in the standard batch hydrolysis using either Flavourzyme or / the mixture from *Flammulina velutipes*: L-isoleucine (12.1 ± 1.2 mM / 15.5 ± 2.3 mM), L-leucine (30.6 ± 1.1 mM / 27.1 ± 2.4 mM), L-valine (16.3 ± 0.2 mM / 14.0 ± 2.7 mM), L-phenylalanine (14.9 ± 0.3 mM / 17.4 ± 2.0 mM),

L-glutamine (67.0 ± 2.5 mM / 78.1 ± 5.2 mM), L-serine (16.2 ± 0.1 mM / 8.1 ± 1.7 mM) and L-histidine (6.0 ± 0.3 mM / 6.5 ± 0.5 mM). L-Glutamine reached the highest concentration of all L-amino acids after peptidolysis of wheat gluten with *Flammulina velutipes* peptidases. According to Fig. 3-4 the actual inhibitory effect of each L-amino acid in the hydrolysate control batch was estimated for Flavourzyme / *Flammulina velutipes* peptidases after 20 h: L-isoleucine (51 % / 40 %), L-leucine (34 % / 47 %), L-valine (21 % / 40 %), L-phenylalanine (28 % / 23 %), L-glutamine (42 % / 0 %), L-histidine (11 % / 0 %) and L-serine (0 % / 14 %). Obviously, the accumulated concentrations showed a strong inhibition already after 4 h of hydrolysis, for example, L-isoleucine for Flavourzyme / *Flammulina velutipes* peptidases 31 % / 29 %. Thus, the above mentioned L-amino acids must be separated *in situ* to increase the DH.

3.3.3 Electro dialysis using ion exchange and ultrafiltration membranes

Two different membranes (AMX/CMX and UF) were investigated for the separation of L-amino acids (Fig. 3-1, A and B). A model solution composed of four L-amino acids, L-glutamic acid, L-asparagine, L-serine and L-leucine, was used. Best recoveries of all L-amino acids were obtained at pH 6, 150 mL for diluate and concentrate volume and 0.25 % Na_2SO_4 as the electrolyte. These optimal conditions were similar for all membrane configurations, but the individual transfer rates of the single L-amino acids from the diluate into the concentrate compartment differed. No L-amino acids were found in the electrolyte solution at any stage of the experiments.

3.3.4 AMX/CMX configuration

At the pH-optimum of wheat gluten hydrolysis at pH 6 the L-amino acids dissociate into cations (His, Arg, Lys), anions (Asp, Glu) and zwitterions (Ser, Gly, Thr, Ala, Pro, Val, Leu, Ile, Phe). Electro dialysis configured with AMX/CMX showed a low transfer of L-asparagine 8 %, L-serine 8 % and L-leucine 8 % per hour at pH 6. In contrast, L-glutamic acid ($\text{pI} = 3.22$) was transferred with a recovery of 51 % at 12 V and 57 cm^2 (Fig. 3-5, A). Zhang *et al.* (2007) reported the separation of L-glutamic acid from an isoelectric supernatant at pH 3 with a similar recovery of 30 % per hour and an effective area of 147 cm^2 at 15 V. Based on different pIs, charged L-amino acids, such as L-glutamic acid ($\text{pI} = 3.22$), can be easily separated from

others. At pH 6 neutral L-amino acids, such as L-leucine (pI = 5.98), L-asparagine (pI = 5.41), L-serine (pI = 5.68) possess a low mobility in the electric field.

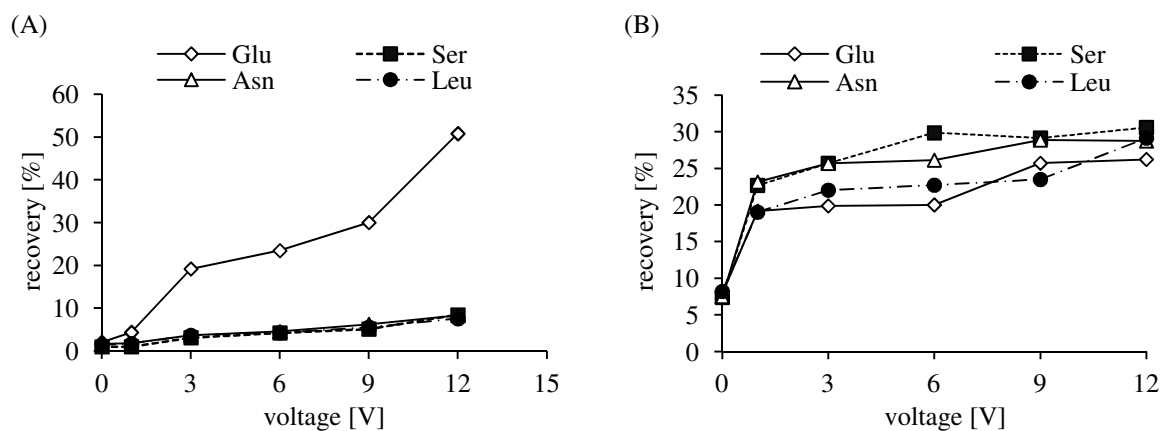


Fig. 3-5 | Effect of different voltages on the transport from diluate into concentrate per hour using (A) the AMX/CMX configuration or (B) UF-membranes, expressed as recovery of the L-amino acids: L-asparagine, L-glutamic acid, L-serine and L-leucine (50 mM model solution).

3.3.5 UF-membrane configuration

For the separation of all L-amino acids, especially the hydrophobic L-leucine, L-isoleucine, L-valine and L-phenylalanine, UF membranes (cut-off 4 kDa) were investigated which classified molecules according to charge and molecular mass. All L-amino acids were transported at similar rates. Compared to the traditional stack configuration, the UF membranes were characterized by increased ion mobility due to lower retention and membrane interaction. The recovery of the L-amino acids increased with higher voltages (Fig. 3-5, B). Best transfer rates were achieved with 12 V: L-asparagine 25 ± 2 %, L-glutamic acid 21 ± 2 %, L-serine 26 ± 1 % and L-leucine 25 ± 3 % per hour. Without voltage the transfer rates varied between 5 and 8 %. Due to the increased pore size and ion mobility this osmosis effect was higher for the electro dialysis unit configured with UF (cut-off 4 kDa and four concentrate solutions) membranes than for the AMX/CMX configuration (1-2 %). It is supposed that the smaller pore size of the AMX/CMX membranes (cut-off 200 Da; manufacturer's data) and only three concentrate solutions caused an increased barrier. When UF membranes were stacked in the electro dialysis cell, an increase of the applied voltage (from 1 V to 12 V) resulted in a higher electrophoretic velocity (Adamson & Reynolds, 1997) and an increase of the transfer rate, e.g.: for L-asparagine 6 %, for L-glutamic acid 7 %, for L-serine 8 % and for L-leucine 10 % per hour. The tested conditions not resulted in a typical linear correlation with the voltage applied

(Fig. 3-5, B) (*J.-F. o. Poulin et al., 2007*). Using different concentrations of the model solution (10, 50 and 100 mM) no significant changes of relative recovery were observed.

3.3.6 Combination of electro dialysis and wheat gluten hydrolysis

When electro dialysis using AMX/CMX membranes was combined with 1 h of prehydrolysis (1 kaU/mL hydrolysate of *Flammulina velutipes* peptidases or Flavourzyme activity (Fig. 3-2)), no major difference in the DH expressed as released amount of L-amino acids between batch and electro dialysis was obtained for either one of the peptidase preparations (Fig. 3-6, A and B). Only L-aspartic acid, L-glutamic acid and L-lysine were effectively transported (up to 50 %) after one hour at a current density of 14.0 mA/cm². Product inhibition was not alleviated, because the inhibitory L-amino acids remained in the hydrolysate. The average transfer rates of free L-amino acids from diluate to concentrate achieved 7-10 % for every electro dialysis period.

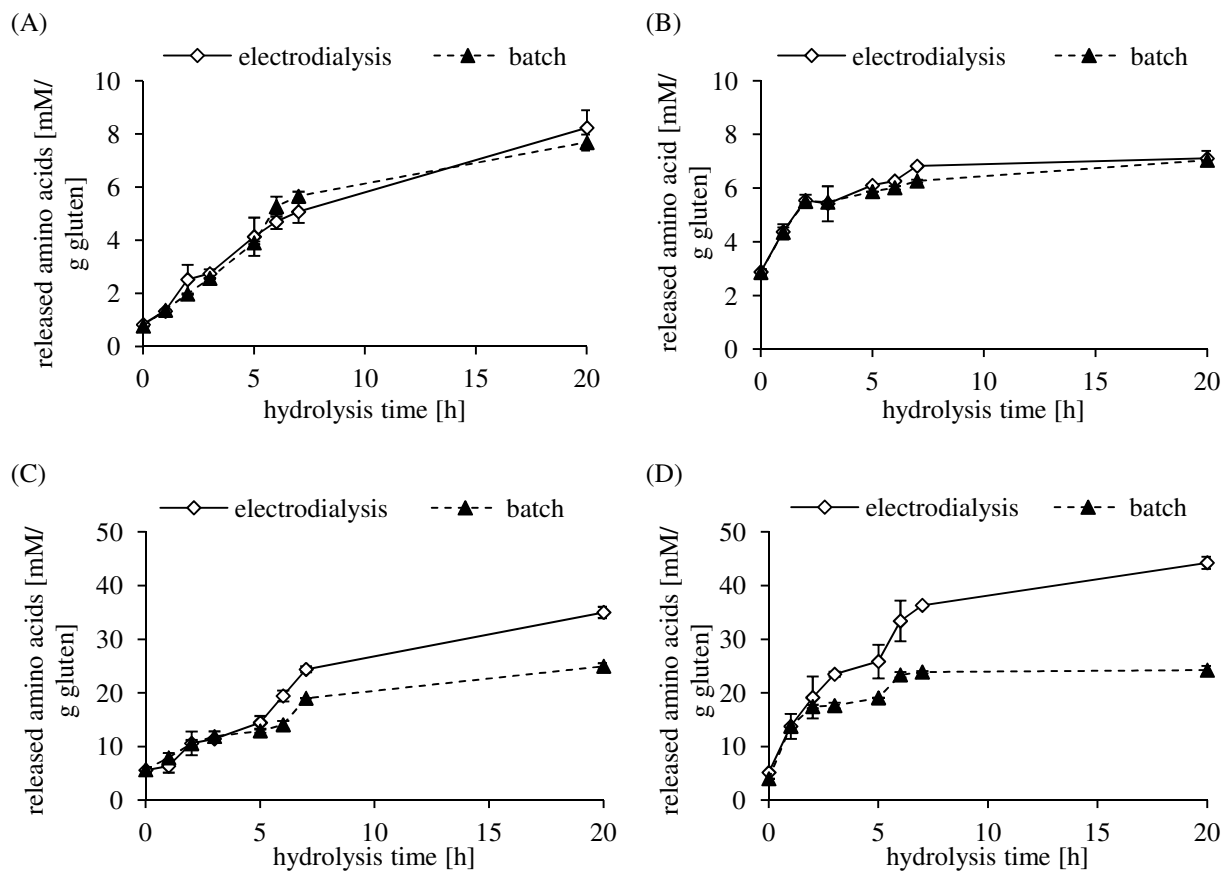


Fig. 3-6 | Wheat gluten hydrolysis in combination with electro dialysis (A) and (B) the AMX/CMX configuration, (C) and (D) UF configuration with (A, C) Flavourzyme or (B, D) *Flammulina velutipes* peptidases (1 kaU/mL hydrolysate each) for 20 h, 10 g/L gluten at pH 6, 45 °C, 1 h prehydrolysis, 2-fold electro dialysis for 1 h at 12 V, 35 °C.

Sandeaux et al. (1998) reported a high transfer of cationic and anionic L-amino acids at pH 5 to 6 of up to 100 % (88 % for L-Glu) after 2 h at 30 mA/cm² current density from protein hydrolysates using electro dialysis with AMX/CMX membranes (Fig. 3-6, A and B). They also obtained low transfer rates of 4 % for the zwitterionic L-amino acids, such as L-leucine and L-phenylalanine.

Since the objective of this study was not the selective removal of individual L-amino acids but the removal of all inhibitory compounds, other membranes were evaluated. Using UF membranes the average transfer rates varied from 22-30 % after 1 h at 14 mA/cm² current density. The conductivity was continuously measured at the beginning and at the end of each electro dialysis event. During 1 h electro dialysis (UF membrane configuration) with 10 g/L gluten hydrolysate and 1 kaU/mL peptidase activity, the conductivity in the diluate decreased (usually from 21-23 mS/cm at 35 °C to 16-18 mS/cm), while it increased in the concentrate (from 0 mS/cm at 35 °C to 6-7 mS/cm) due to the transfer of L-amino acids. The conductivity of the electrolyte solution was constant during the process. The pH was measured before and after electro dialysis and no variations were detected for neither the UF configuration nor the AMX/CMX configuration, because of the buffer solution in both compartments (diluate and concentrate).

L-amino acids possessing inhibitory properties were effectively removed from the hydrolysates obtained using Flavourzyme or/ *Flammulina velutipes* peptidases: L-isoleucine (29 % / 27 %), L-leucine (29 % / 24 %), L-valine (27 % / 27 %), L-phenylalanine (28 % / 23 %), L-glutamine (25 % / 26 %), L-histidine (24 % / 25 %) and L-serine (30 % / 22 %). As a positive side-effect soluble peptides were also transported (*Doyen et al.*, 2013). Actual transfer rates of soluble peptides <4 kDa ranged from 7 to 10 % per hour. However, after 20 h of peptidolysis no further increase of the concentration of soluble peptides was noticeable compared with the batch experiment. This may be explained by a rapid degradation of these peptides through exopeptidases.

A declining increase of L-amino acids was found after 7 h of hydrolysis for all batch experiments (Fig. 3-6, A-D) (*Schlichtherle-Cerny & Amadò*, 2002; *Koo et al.*, 2011). Upon the partial removal of the inhibitors, the release of free L-amino acids compared to the batch control increased (Fig. 3-6, C and D). Both enzyme mixtures produced similar amounts of L-amino acids in the batch process: Flavourzyme 19.3 ± 0.1 mM/g gluten, and *Flammulina velutipes* peptidases 20.3 ± 0.8 mM/g gluten after 20 h (Tab. 3-3, Fig. 3-6, C and D).

Supported by electro dialysis, both peptidases showed a higher release compared to the batch control: 29.4 ± 0.9 mM/g gluten for Flavourzyme and 39.1 ± 1.2 mM/g gluten for *Flammulina velutipes* (Fig. 3-6, C and D). Several reasons may explain the different behavior of both peptidase mixtures: Flavourzyme was inhibited by more L-amino acids than *Flammulina velutipes* peptidases. Flavourzyme inhibitors were not adequately separated and still caused a strong inhibitory effect. Other possible explanations are the different contribution of exopeptidases and endopeptidases, the loss of peptidase activity during the process, or the lack of cleavage sites in gluten. For the batch process, a decrease of the peptidase activity of about 5-10 % after 20 h of peptidolysis at 45 °C was observed. The influence of the electric potential during the electro dialysis (two times for 1 h) diminished the activity of Flavourzyme by around 30 % and of *Flammulina velutipes* peptidases by around 40 % after 20 h. Despite the slightly lower residual activity, *Flammulina velutipes* peptidases hydrolyzed wheat gluten more effectively than Flavourzyme (Fig. 3-6, C and D). Further experiments with different times of prehydrolysis and substrate concentrations confirmed this and also demonstrated that the beneficial over-all effects of electro dialysis were less significant for Flavourzyme than for *Flammulina velutipes* peptidases (Tab. 3-3).

Tab. 3-3 | Efficiency of electro dialysis compared to the previous batch process expressed as degree of hydrolysis [%]. Wheat gluten hydrolysis for 20 h plus electro dialysis (2 x 1 h), at pH 6 and 45 °C with Flavourzyme (Fx) or *Flammulina velutipes* (Fve) peptidases, respectively.

Peptidases	Activity [kaU/mL hydrolysate]	Wheat gluten [g/L]	Prehydrolysis time [h]	Degree of hydrolysis [%]		
				Batch	Electro dialysis	Difference
Fve	1	10	1	11	27	16
Fx	1	10	1	10	17	7
Fve	35	10	1	30	48	18
Fx	35	10	1	29	38	9
Fve	1	10	3	11	17	6
Fx	1	10	3	8	10	2
Fve	10	50	3	13	20	7
Fx	10	50	3	14	18	4
Fve	10	100	6	16	22	6
Fx	10	100	6	15	17	2

3.3.7 Prospects of peptidolysis combined with electro dialysis

Previously, enzyme membrane reactors (EMR) were used to generate bioactive peptides and to avoid the disadvantages of batch reactions, such as product inhibition or inefficient use of enzyme (Cui *et al.*, 2011). The significant difference and advantage of electro dialysis is the

faster separation of the products of hydrolysis driven by an electric potential. Nevertheless, both processes may imply a loss of enzyme activity and membrane fouling (Rios *et al.*, 2004). Tab. 3-3 shows a set of experiments with different peptidase activities (1 or 35 kaU/mL hydrolysate), different substrate concentrations (1-100 g/L wheat gluten) and different times of prehydrolysis (1-6 h). The largest DH of the batch control (29 % for Flavourzyme and 30 % for *Flammulina velutipes* peptidases) was reached by using 10 g/L gluten and a peptidase activity of 35 kaU/mL hydrolysate. Combining electro dialysis with hydrolysis (two times 1 h) an increase of the DH using Flavourzyme of 31 % and 60 % using *Flammulina velutipes* peptidases was achieved. The best relative yields were obtained under the following conditions: 1 h prehydrolysis, 10 g/L gluten and a peptidase activity of 1 kaU/mL: Improvement of 70 % (from 10 up to 17 % DH) for Flavourzyme and of 145 % (from 11 up to 27 %) for *Flammulina velutipes* peptidases were recorded (Tab. 3-3, Fig. 3-6, C and D). With longer times of prehydrolysis higher concentrations inhibitory effects started early during peptidolysis, and the electro dialysis was started too late to compensate for this (Tab. 3-3, Fig. 3-6, C and D). Similar effects were noticed with both peptidase compositions for higher wheat gluten concentrations.

With the present experimental set-up a continuous electro dialysis was not possible, because the enzyme had to be returned to the remaining insoluble substrate. So far, electro dialysis was applied two times for one hour during 20 h (Fig. 3-2). An improvement of the DH could be achieved by a more frequent involvement of electro dialysis in the process, an increased area of the UF membranes or using membranes with a larger cut-off.

In conclusion this study quantified for the first time single L-amino acids as inhibitors of Flavourzyme and of peptidases of *Flammulina velutipes* during wheat gluten hydrolysis. Hydrophobic amino acids, such as L-isoleucine, L-leucine, L-valine and L-phenylalanine showed a strong inhibitory effect on both peptidase mixtures. L-glutamine, which occurs in large quantities in wheat gluten, only inhibited Flavourzyme. Preliminary observations indicated that also peptides inhibited the hydrolysis. For more detailed data all the peptidases of the mixture should be purified and incubated with different L-amino acid or peptide concentrations. Electro dialysis configured with UF membranes (cut-off 4 kDa) was a suitable tool to reduce product inhibition. Optimized conditions of electro dialysis are expected to further improve the total release of L-amino acids.

Acknowledgement

Cooperation of the Nestlé Product Technology Centre, Singen/Hohentwiel, Germany, is gratefully acknowledged.

4 Vorwort zur Publikation “Factors limiting the enzymatic hydrolysis of wheat gluten”

Wie in Kapitel 3 deutlich wurde, spielt die Produktinhibierung bei der enzymatischen Hydrolyse von Weizengluten eine zentrale Rolle. Diese wurde durch eine zweifache Integration der Elektrodialyse innerhalb des Prozesses minimiert. Inwieweit eine Erhöhung der Membrananzahl im Elektrodialysestack von vier auf sechs UF-Membranen (cut-off 4 kDa) und eine gesteigerte Anzahl an Elektrodialysesritten während der Hydrolyse zu einer weiteren Steigerung des Hydrolysegrads führt, wurde in der nachfolgenden Publikation näher untersucht.

Dabei zeigte sich sowohl im Batchansatz als auch im Elektrodialyseansatz eine Inaktivierung der Enzymaktivität von Flavourzyme und *Flammulina velutipes* Peptidasen. In beiden Fällen wurden zur Steigerung der Hydrolyseeffizienz Enzymmischungen aus Exo- und Endopeptidasen verwendet (vgl. Kapitel 1.2.4). Ferner konnte gezeigt werden, dass dabei die autopeptidolytische Aktivität der Peptidasen einen weiteren limitierenden Faktor darstellt. In Abhängigkeit von unterschiedlichen Substratkonzentrationen und dem Vorhandensein von diversen Ionen erfolgte eine Verstärkung oder Minimierung der Autopeptidolyse.

Weshalb mit dem kommerziellen Peptidasenpräparat Flavourzyme trotz mehrfacher Elektrodialyse in Kombination mit einer effektiven Produktabtrennung unter vergleichbaren Hydrolysebedingungen ein niedrigerer Hydrolysegrad als unter Verwendung von *Flammulina velutipes* Peptidasen erzielt wurde, warf neue Fragen auf. Mithilfe einer terminierten zusätzlichen Dosierung von Enzym oder Substrat zum Batchansatz wurden erste Rückschlüsse gezogen, dass für Flavourzyme eine dritte Limitierung kombiniert mit der Produktinhibierung und der Autopeptidolyse auftritt.

5 Factors limiting the enzymatic hydrolysis of wheat gluten

Reproduced with permission from *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2014, 62 (20), pp 4762–4768. Copyright 2014 American Chemical Society.

Abstract

The enzymatic hydrolysis of wheat gluten for the production of seasonings using mixtures of endo- and exopeptidases results in yields typically below 40 %. Possible limiting parameters, such as an increasing product inhibition, autopeptidolysis of the enzymes and lack of cleavage sites were studied using novel peptidases from *Flammulina velutipes* or the commercial Flavourzyme preparation. Seven intermittent electro dialysis steps (10 g/L gluten and 10 kaU/mL) for the *in situ* removal of amino acids minimized the product inhibition. During 16 hours, hydrolysis progressed nearly linearly. Compared to the batch control, a threefold yield of amino acids released was obtained indicating that an integrated product removal alleviates the problem of product inhibition. Autopeptidolysis, as shown using SDS-PAGE and enzyme activity assays, was suppressed with increasing concentrations of competing gluten substrate. Peptidases of *Flammulina velutipes* showed product inhibition only, whereas a combined effect of product inhibition and lack of cleavage sites was observed for Flavourzyme.

Keywords

Wheat gluten, hydrolysis, electro dialysis, autopeptidolysis, cleavage site, Flavourzyme, *Flammulina velutipes*

5.1 Introduction

The enzymatic protein hydrolysis is widely used in the food industry for applications, such as the production of seasonings from soy or wheat proteins or the improvement of the functional properties of dairy products and confectionary (Clemente, 2000). So far, total hydrolysis of the protein as obtained by the former hydrochloric acid catalyzed process, was not achieved, even if complex enzyme preparations were used (Kong *et al.*, 2007). Previous studies suggested limitations, such as product inhibition, autopeptidolysis, and the decline of sufficient cleavage sites in the substrate in the course of the process (Souissi *et al.*, 2007; Nchienzia *et al.*, 2010; Giesler *et al.*, 2013). An advanced cleavage of peptide bonds might result in the formation of bitter tasting peptides. Thus, the technical aim is often not just to improve the degree of hydrolysis, but preferably to bring the reaction to completion.

To date, research focused on product inhibition as the limiting factor (Apar & Ozbek, 2010). As shown previously, Flavourzyme and *Flammulina velutipes* peptidases were both inhibited by the hydrophobic L-amino acids L-isoleucine, L-leucine, L-valine, and L-phenylalanine. L-serine inhibited only *Flammulina velutipes* peptidases, while L-histidine and L-glutamine inhibited only Flavourzyme peptidases (Giesler *et al.*, 2013). The same study Giesler *et al.* (2013) confirmed that electro dialysis equipped with four ultrafiltration membranes (UF, cut-off 4 kDa) was suitable to minimize the product inhibition. After applying the electro dialysis twice for one hour during the 20 hours of hydrolysis, a large increase of the degree of hydrolysis (DH) of up to 145 % for *Flammulina velutipes* peptidases and of 70 % for Flavourzyme compared to the control batch was observed (Giesler *et al.*, 2013). To fully explore the potential of electro dialysis, the membrane surface was increased (J.-F. Poulin *et al.*, 2007) and the electro dialysis step repeatedly implemented during the hydrolysis.

The phenomenon of autopeptidolysis was described for individual enzymes, such as subtilisin-like serine peptidases (Abraham & Breuil, 1995), retroviral aspartyl proteases (Rose *et al.*, 1993) or neutral peptidases (Dürschmidt *et al.*, 2010). A pure peptidase is generally not susceptible to autopeptidolysis under native conditions. After an irreversible inactivation by high temperature or chemical denaturants, the native structure becomes impaired, and autopeptidolysis by residual active peptidase may occur (Tatsumi *et al.*, 1994; Dürschmidt *et al.*, 2010). Thus, the application of mixtures of endo- and exopeptidases bears the risk of peptidases degrading each other. In this study, the robustness and reaction behavior of Flavourzyme, a commercial preparation from *Aspergillus oryzae*, was compared to a mixture of peptidases from the edible basidiomycete *Flammulina velutipes*, previously proven for the

hydrolysis of wheat gluten (Giesler *et al.*, 2013). Autopeptidolysis and the availability of cleavage sites in the substrate were studied.

5.2 Materials and Methods

5.2.1 Materials

All chemicals and solvents were of analytical or HPLC grade and obtained from Carl Roth (Karlsruhe, Germany), Merck (Darmstadt, Germany), Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Germany) and VWR International GmbH (Darmstadt, Germany), respectively.

5.2.2 Cultivation of *Flammulina velutipes*

Cultivations were carried out as described previously (Giesler *et al.*, 2013).

5.2.3 Peptidase Activity

The peptidolytic activity was determined with the azocasein assay as a photometric end-point method following Giesler *et al.* (2013).

Two more specific peptidase assays were performed in 96-well microtiter plates: First 50 mM Tris-buffer pH 7 and 10 μ L Z-Ala-Ala-Pro-Phe-*para*-nitroanilide (2 mM AAPF) or second 25 mM sodium acetate buffer pH 5 and Z-Gly-Pro-*para*-nitroanilide (2 mM) from Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Germany); each substrate in dimethyl sulfoxide and 20 μ L enzyme preparation in a total volume of 150 μ L. The molar extinction coefficient of *para*-nitroaniline was determined at $\epsilon^* = 4,567 \mu\text{L}/\mu\text{M}$ at 405 nm in a BioTek Synergy 2TM microtiter plate reader (Bad Friedrichshall, Germany). The absorption was measured at 37 °C and 405 nm over 90 min. One unit of peptidolytic activity was calculated as the amount of enzyme required to produce 1 μM *para*-nitroaniline per minute.

5.2.4 Preparation of wheat gluten hydrolysate

Various hydrolysis experiments were carried out with dry sterilized (130-135 °C, 8 h) wheat gluten (5-100 g/L) at 180 rpm, 45 °C and pH 6.0 in 25 mM sodium acetate buffer with two different peptidase mixtures, *Flammulina velutipes* or Flavourzyme from Novozymes (Copenhagen, Denmark), using standardized peptidase activities per mL hydrolysate. For each

hydrolysate, the concentration of L-amino acids [mM], soluble protein [mg/L] and the degree of hydrolysis were investigated over time as described in *Giesler et al.* (2013).

5.2.5 Electrodialysis

Electrodialysis equipped with six ultrafiltration membranes (UF, cut-off 4 kDa, UH004P from Microdyn-Nadir, Wiesbaden, Germany) was used to increase the transfer rate of L-amino acids from the diluate into the concentrate solution. The stack configuration with UF-membranes is shown in Fig. 5-1 (*Giesler et al.*, 2013).

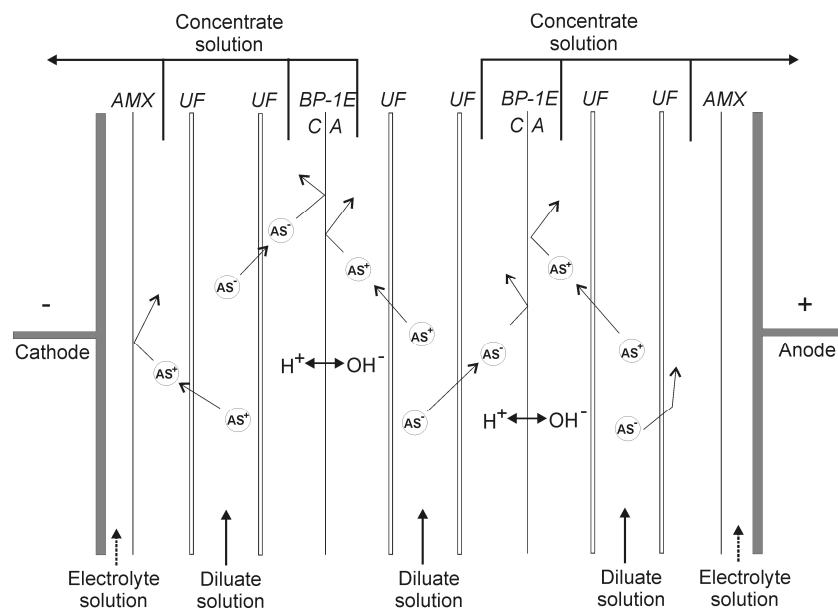


Fig. 5-1 | Configuration of the electrodialysis stack for the separation of amino acids (AS), anionic membrane (AMX), bipolar membrane (BP-1E) to block ion migration and delivery of the counter-ion, and six ultrafiltration membranes (UF).

To check the transfer increase, the recovery of the model solution consisting of L-glutamic acid, L-asparagine, L-serine and L-leucine (50 mM in 25 mM sodium acetate buffer, pH 6) was calculated. Electrodialysis experiments were carried out using the laboratory-scale EDL02 (Hescon GmbH, Engstingen, Germany), equipped with a DSE electrode at pH 6, 12 V with a current density of 14.0 mA/cm² and 0.25 % Na₂SO₄ as electrolyte solution, to separate the L-amino acids from the wheat gluten hydrolysates during the hydrolysis following. The recovery of the L-amino acids was calculated as reported previously (*Giesler et al.*, 2013). Two alternating hydrolysis samples (sample 1 (S1) and sample 2 (S2)) were used, and the electrodialysis was integrated alternating fourfold or sevenfold into the 20 or 26 hours hydrolysis process. For every experiment a batch control was carried along.

5.2.6 Autopeptidolysis and thermal stability

The peptidase mixtures of *Flammulina velutipes* or Flavourzyme were incubated in 25 mM sodium acetate buffer pH 6 at different temperatures (4, 20, and 45 °C) over 20 hours with or without addition of gluten (10 or 100 g/L) as substrate. After the incubation at defined temperatures or substrate concentrations, residual peptidase activity was assayed with the azocasein and the AAPF assay as described above. Glycerol, (NH₄)₂SO₄, MgCl₂, CaCl₂, ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) and phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) were tested as protectants against thermal inactivation of the peptidases. The inactivation [%] was calculated using the change in activity compared to the initial activity. SDS-PAGE was used to follow autopeptidolytic process of the enzymes.

5.2.7 SDS-PAGE

SDS-PAGE analyses were performed using 12 % (w/v) polyacrylamide separation gels after *Laemmli* (1970). Samples were prepared by mixing 10 µL of enzyme solution and 10 µL of loading buffer (0.1 M Tris/HCl (pH 6.8), 0.2 M DTT, 4 % SDS, 20 % glycerol, 0.2 % bromophenol blue) and boiling for 10 min. After electrophoresis at 18 mA per gel, the gels were stained with Instant Blue (Gentaur GmbH, Aachen, Germany). Marker proteins from 10 to 250 kDa (BioRad, Munich, Germany) were used for molecular mass determination.

5.2.8 Cleavage sites

To determine, whether enough cleavage sites for the peptidases were present in the wheat gluten, the following hydrolysis experiments were performed. Prehydrolysis for three hours was performed at 180 rpm, 45 °C and pH 6 in 25 mM sodium acetate buffer with two different peptidase mixtures from either *Flammulina velutipes* (Fve) or Flavourzyme. Thereafter, the hydrolysate was centrifuged (10 min, 5000 rpm, 4 °C). Fresh peptidases and buffer were added to the gluten that was already partly hydrolyzed (C1). To the already used peptidases and buffer solution fresh wheat gluten was added (C2). Both mixtures were then further incubated for 17 hours. For every experiment a batch control was carried out. Hydrolyzed samples were analyzed for peptidolytic activity, the concentration of L-amino acids [mM] and the soluble peptides [mg/mL].

5.2.9 Statistical analysis

The electro dialysis, autopeptidolysis, and cleavage site studies were subjected to statistical analysis (error probability $p < 0.05$) using the one-way ANOVA of the Origin 6.1 software (OriginLab Corporation, Northampton, USA). All data presented are averages of duplicate measurements. Numerous experiments were conducted and single parameters, such as enzyme activity, were changed to distinguish critical from insignificant factors; for the bulk of these measurements the standard deviation of repetitions was typically below 5%.

5.3 Results and Discussion

5.3.1 Electrodialysis using six UF membranes

In order to reduce inhibition by the recently identified amino acids (L-isoleucine, L-leucine, L-valine, L-phenylalanine, L-histidine and L-glutamine) for *Flammulina velutipes* and Flavourzyme peptidases, the transfer rate of the electro dialysis unit was increased by using six UF membranes (previously four) (Giesler *et al.*, 2013). The three diluate circuits and six concentrate circuits of the electro dialysis (ED) stack led to an enhanced recovery (Fig. 5-1). As previously described Giesler *et al.* (2013), all of the L-amino acids measured were transported at similar rates, and the recovery increased with higher voltages (Fig. 5-2, A).

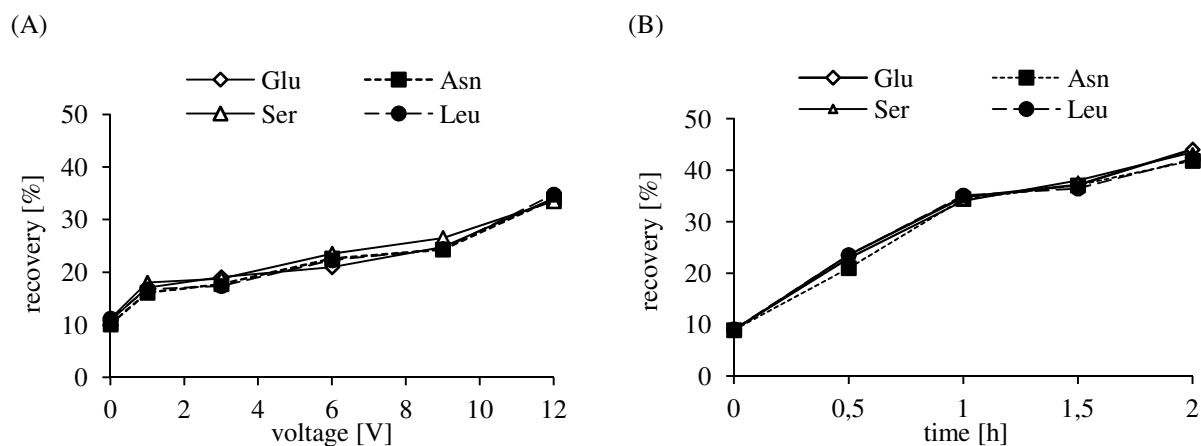


Fig. 5-2 | Effect of different voltages on the transport from diluate into concentrate using UF-membranes (A) at different voltages per hour or (B) over 2 hours at 12 V, expressed as recovery of the L-amino acids: L-asparagine, L-glutamic acid, L-serine and L-leucine (50 mM model solution, pH 6).

After one hour of electro dialysis at 12 V with six UF membranes, the best transfer rates were achieved: L-asparagine 34 ± 1 %, L-glutamic acid 34 ± 2 %, L-serine 34 ± 3 %, and L-leucine 35 ± 2 % per hour. Without an electric potential applied, the transfer rates varied between 8 % and 9 %. With increased time of electro dialysis, the recovery increased as well, as did the

conductivity of the concentrate. After two hours of electro dialysis at 12 V, transfer rates of 42-44 % were reached (Fig. 5-2, B), and a higher conductivity in the concentrate solution (16.2 mS/cm) compared to the diluate (13.5 mS/cm) was observed. With converging conductivity in both circuits, the transport of ions through the membranes slowed down (Fig. 5-2, B). With the commonly used stack configurations, i.e. AMX/CMX (anionic/cationic membrane) or four UF membranes, lower transfer rates of 8-10 % and 22-30 %, respectively, were obtained (Giesler *et al.*, 2013). Similar results were reported by J.-F. Poulin *et al.* (2007) who found a four-fold increase of the peptide transfer when stacking four UF membranes instead of one. L-amino acids possessing inhibitory properties were effectively removed from the hydrolysates obtained using either Flavourzyme or/ *Flammulina velutipes* peptidases: L-isoleucine (34 % / 33 %), L-leucine (33 % / 33 %), L-valine (34 % / 32 %), L-phenylalanine (34 % / 31 %), L-glutamine (33 % / 33 %), L-histidine (34 % / 35 %), and L-serine (32 % / 34 %). Furthermore, soluble peptides <4 kDa were transported, with transfer rates ranging from 10-12 % per hour.

A further improvement of the efficiency of hydrolysis was achieved by combining the increased area of the UF membranes with a more frequent application of the electro dialysis step. During 20 hours of hydrolysis (10 g/L gluten and 1 kaU/mL peptidase mixture) and a fourfold electro dialysis, each for one hour, an increased release of L-amino acids of 94 % for Flavourzyme and of 153 % for *Flammulina velutipes* was recorded (Tab. 5-1).

Tab. 5-1 | Efficiency of electro dialysis (ED) compared to the batch process. Hydrolysis of wheat gluten for 20 hours plus electro dialysis (one hour prehydrolysis) at pH 6 and 45 °C using Flavourzyme (Fx) or *Flammulina velutipes* (Fve) peptidases, respectively.

Peptidases	Activity [kaU/mL hydrolysate]	Wheat gluten [g/L]	ED cycles (each 1h)	Amino acids released [mM]	
				Batch	ED
Fx	1	10	4	14.1	27.5
Fx	10	10	4	20.7	40.7
Fve	1	10	4	14.8	37.5
Fve	10	10	4	19.5	39.2
Fve	10	10	7	19.5	56.4
Fve	75	5	4	14.1	30.8

These results indicated an improvement compared to previous studies with twofold electro dialysis and four UF membranes (Flavourzyme: 70 % and *Flammulina velutipes* 145 % (Giesler *et al.*, 2013)). The best yields of hydrolysis (batch: DH 35 % and ED: DH 76 %) were achieved with a low substrate concentration (5 g/L gluten) and a high peptidase activity of 75 kaU/mL *Flammulina velutipes* peptidases. With a sevenfold integrated

electrodialysis (10 g/L gluten and 10 kaU/mL) a nearly linear progression for the first 16 hours of the hydrolysis process (Fig. 5-3, A) and a threefold concentration of amino acids released was obtained (Tab. 5-1). Thus, the manifold integration of ED proved to be suitable for overcoming product inhibition.

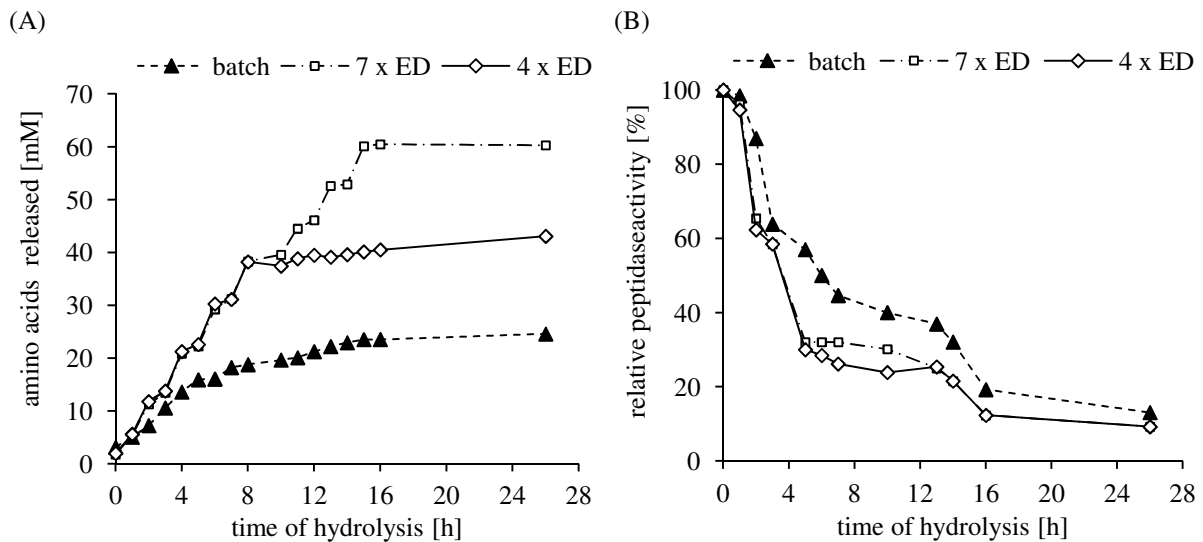


Fig. 5-3 | Hydrolysis of wheat gluten combined with electro dialysis (UF configuration) using *Flammulina velutipes* peptidases (10 kaU/mL hydrolysate each) for 26 hours, 10 g/L gluten at pH 6, 45 °C, one hour pre-hydrolysis, fourfold or sevenfold electro dialysis for one hour at 12 V, 35 °C, (A) Released amino acid concentration (B) Change of the relative peptidase activity [%] quantified using the azocasein assay.

Transfer rates decreased during the seven steps of the electro dialysis from initially 32-35 % to 26-27 %. This is explained by clogging of the membrane pores over time, as there was no washing step after each step. *Poulin et al.* (2006) reported a weak fouling, if one UF membrane was used in the ED stack, which was removed by rinsing the membrane with distilled water. Although fouling is of minor importance due to the absence of pressure in a ED stack with UF membranes, various interactions between the clogging membranes and the peptides may take place which influence the migration (*Doyen et al.*, 2011).

Peptidase activity decreased in the batch as well as in the electro dialysis process over time. After 26 hours, around 9 % of the introduced peptidase activity remained in the electro dialysis experiment, and about 18 % in the batch (Fig. 5-3, B). *Cui et al.* (2011) also observed a decrease of Alcalase activity during the hydrolysis of wheat gluten in an enzyme membrane reactor. There are two possible explanations: First, some peptidases remained adsorbed at the membranes, which would explain the difference between ED and batch experiment. Second, peptidases were lost due to a high autopeptidolytic activity. Hence, two washing steps were integrated after every electro dialysis step. The first washing step, refreshing the buffer solution in the diluate and rinsing for 10 min, recovered 3-4 % of initial *Flammulina velutipes*

and 8-9 % of initial Flavourzyme peptidase activity. Afterwards the buffer solution was refreshed for a second time and the poles were switched for further ten minutes. One percent of the initial *Flammulina velutipes* peptidase activity and up to four percent of Flavourzyme activity was recovered. The recovery rate showed no differences with or without the use of wheat gluten as the substrate.

5.3.2 Autopeptidolytic activity of peptidase mixtures

An extensive hydrolysis, preferably using mixtures of endo- and exopeptidases, is desired to reduce the bitterness of the hydrolysate as well as to obtain a high DH (Kong *et al.*, 2007). Besides the degradation of the substrate, peptidases may hydrolyze each other. An intermolecular mechanism by which peptidases digest other peptidases has been suggested (Abraham & Breuil, 1995). The autopeptidolysis of *Flammulina velutipes* and Flavourzyme peptidases was monitored by measuring the residual activity after different incubation studies at various temperatures without substrate and at different substrate concentrations (Tab. 5-2).

Tab. 5-2 | Peptidase inactivation [%] at different incubation temperatures (4, 20, 45 °C), with different additives and wheat gluten concentrations (0, 10, 100 g/L) after 20 hours incubation at 45 °C and pH 6 by using different initial peptidase activities (A: high activity, B: low activity) of Flavourzyme and *Flammulina velutipes*, quantified with Azocasein and AAPF assay.

Peptidase inactivation [%] (Azocasein Assay)				
Temperature	Flavourzyme		<i>Flammulina velutipes</i>	
	A [250 kaU/mL]	B [10 kaU/mL]	A [80 kaU/mL]	B [10 kaU/mL]
4 °C	65.4 ± 1.2	4.7 ± 0.5	60.7 ± 1.2	7.0 ± 0.4
20 °C	65.9 ± 1.6	6.4 ± 0.9	69.8 ± 1.1	10.4 ± 1.7
45 °C	72.7 ± 2.6	34.3 ± 1.1	96.1 ± 2.9	86.2 ± 3.1
Substrate	[10 kaU/mL]		[10 kaU/mL]	
0 g/L		32.1 ± 1.0		85.2 ± 0.2
10 g/L		28.3 ± 0.5		79.3 ± 0.2
100 g/L		30.3 ± 1.9		62.0 ± 0.1
Peptidase inactivation [%] (AAPF Assay)				
Temperature	Flavourzyme		<i>Flammulina velutipes</i>	
	A [15 U/L]	B [1 U/L]	A [15 U/L]	B [1 U/L]
4 °C	2.6 ± 0.3	3.8 ± 0.7	0.0 ± 0.1	0.0 ± 0.2
20 °C	28.9 ± 1.4	17.4 ± 1.4	16.4 ± 1.3	5.8 ± 1.5
45 °C	50.5 ± 2.9	27.5 ± 1.9	97.1 ± 2.8	65.0 ± 2.9
Substrate	[1 U/L]		[1 U/L]	
0 g/L		28.1 ± 0.2		66.2 ± 1.3
10 g/L		25.5 ± 3.0		48.4 ± 0.4
100 g/L		17.2 ± 0.2		43.1 ± 6.7

Additives	Peptidase inactivation [%] (AAPF Assay)	
	Flavourzyme [1 U/L]	<i>Flammulina velutipes</i> [1 U/L]
Control	27.5 ± 1.9	61.3 ± 0.5
Glycerol (1.9 M)	58.8 ± 2.5	69.9 ± 1.0
(NH ₄) ₂ SO ₄ (0.5 M)	41.6 ± 6.9	63.3 ± 3.4
MgCl ₂ (9 mM)	18.4 ± 1.8	58.2 ± 1.1
EDTA (100 µM)	98.9 ± 0.5	99.5 ± 0.2
PMSF (100 µM)	89.1 ± 0.3	96.6 ± 0.1
CaCl ₂ (36 mM)	5.8 ± 0.2	35.5 ± 1.2

With increasing incubation temperature, the recovered peptidase activity decreased. Incubation at 45 °C, corresponding to the temperature optimum of the applied peptidases, showed a decrease of the peptidase activity (initially 10 kaU/mL) of 86.2 % for *Flammulina velutipes* and 34.3 % for Flavourzyme. *Bajorath et al.* (1988) observed a constant slow decrease in Proteinase K (initial concentration 0.01 mg/mL) activity at room temperature. With higher initial peptidase activity, the residual activity for *Flammulina velutipes* and Flavourzyme peptidases decreased (Tab. 5-2). The absence of gluten in these incubations implied that the peptidase breakdown was an autopeptidolytic event. These data were confirmed with a second peptidase activity test using AAPF – in addition to the azocasein assay – as the substrate. Similar results were obtained by *Abraham & Breuil* (1995). The incubation with different substrate concentrations (10 and 100 g/L wheat gluten) resulted in the competitive minimization of autolysis (Tab. 5-2). Thus, autolysis became negligible in the presence of excess substrate.

To achieve a more detailed picture of the products of autopeptidolysis, the enzyme solutions without substrate were analyzed by SDS-PAGE. At the lower incubation temperature (4 °C), no changes of the electrophoretic patterns were detected, neither for *Flammulina velutipes*, nor for Flavourzyme peptidases (Fig. 5-4, A and B). After 20 hours at 45 °C, four bands (73 kDa, 48 kDa, 32 kDa and 15 kDa, Fig. 5-4, A, black boxes) of the mixture from *Flammulina velutipes* disappeared in the SDS-PAGE gel. The bands at 20 kDa, 27 kDa, 37 kDa and 50 kDa did not change after 20 hours. Gelatin zymography visualized active peptidases in the supernatant of *Flammulina velutipes* at 15 kDa, 27 kDa, 32 kDa, 37 kDa, 75 kDa and 150 kDa (*Grimrath et al.*, 2011). Flavourzyme showed no modifications of the pattern on the SDS-PAGE gel (Fig. 5-4, B) and in the gelatin zymography after 20 hours of incubation at 45 °C. Thus, it is supposed that hypothetical degradation products were smaller than 10 kDa.

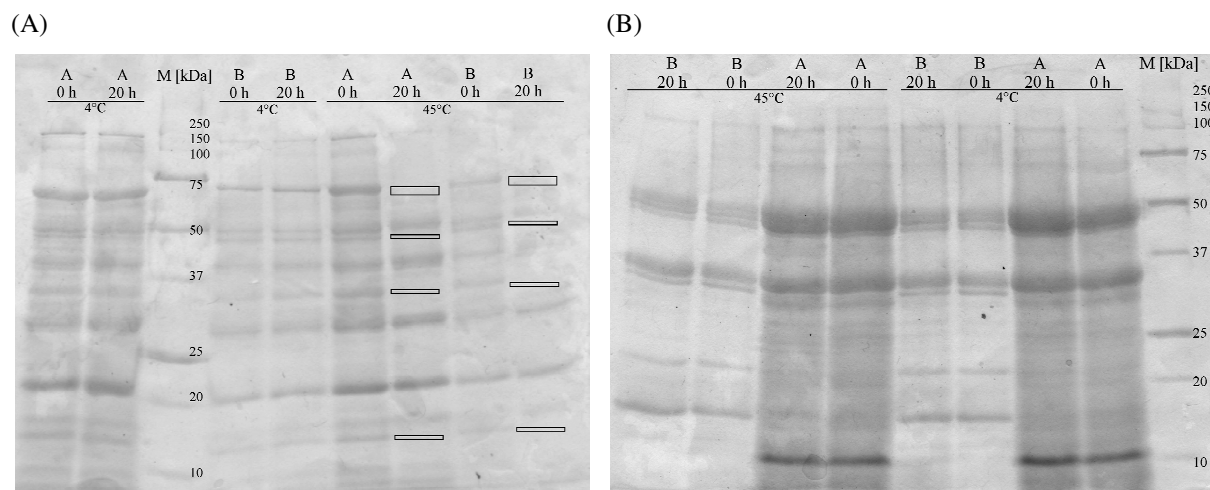


Fig. 5-4 | SDS-PAGE (12 %) to study autopeptidolysis without substrate at 4 °C and 45 °C with two different initial peptidase activities (A: high activity, B: low activity) for *Flammulina velutipes* (A) and Flavourzyme (B), changes in the band pattern after 20 hours were marked with a box. M [kDa] Precision Plus Protein-Standard unstained (BioRad, Germany).

At 45 °C and an initial peptidase activity of 10 kaU/mL, *Flammulina velutipes* released 80 μ M L-amino acids, and Flavourzyme 110 μ M. With increased initial peptidase activity the release of L-amino acids increased as well: *Flammulina velutipes* [80 kaU/mL] gave 0.76 mM, and Flavourzyme [250 kaU/mL] 0.84 mM.

To minimize autopeptidolysis, the peptidase mixtures (1 U/L) were incubated with various presumed protectants (Abraham & Breuil, 1995): glycerol (1.9 M), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0.5 M), MgCl_2 (9 mM), and CaCl_2 in different concentrations. Glycerol (1.9 M), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0.5 M) and MgCl_2 (9 mM) did not protect the peptidases from *Flammulina velutipes* or Flavourzyme, as proven by AAPF peptidase activity assay (Tab. 5-2). Additionally, the effects of the specific serine peptidase inhibitor PMSF and the metallopeptidase inhibitor EDTA on the degradation of *Flammulina velutipes* or Flavourzyme peptidases were studied. The peptidase mixtures were completely inhibited by PMSF (100 μ M) and EDTA (100 μ M). No protection against autopeptidolysis was detected. A similar study reported that the addition of a protease inhibitor did not lead to an increased stability, as the autopeptidolysis is usually not sufficiently suppressed (Fujimura *et al.*, 2000). Only CaCl_2 significantly extended the peptidase activity of both enzyme mixtures. Increasing CaCl_2 concentrations (0.9, 3.9, 9.0, 18.0, 27.0 mM) minimized the loss of initial activity (1 U/L). A 25 % lower inactivation for *Flammulina velutipes* peptidases and 22 % for Flavourzyme compared to the control without supplementation was determined at 27 mM CaCl_2 . A further increase of CaCl_2 up to 36 mM had no better effect (Tab. 5-2). When the peptidases of *Flammulina velutipes* were incubated with 9 mM CaCl_2 , the protein band at 32 kDa in the SDS gel (Fig. 5-4, A) was not degraded

as in the control without CaCl_2 (data not shown). Calcium ions are required by some peptidases for folding of the peptide chain and hence activity (for example, Thermolysin and Proteinase K). *Abraham & Breuil* (1995) showed an improvement of the half-life time of the purified subtilisin-like serine protease secreted by *Ophiostoma piceae* (7.7 min at 40 °C) by adding 27 mM CaCl_2 up to 2 h at 40 °C.

To prevent peptidases against autopeptidolysis, two strategies are available: the identification and removal of the primary cleavage sites and restricting their accessibility. It has been suggested that especially the loop with the peptidolysis site could be stabilized by Ca^{2+} -binding against unfolding (*Abraham & Breuil*, 1995). *Braxton & Wells* (1992) identified two sites of autopeptidolysis of subtilisin BPN'. They also evaluated stabilization by site directed mutagenesis in regions of autolytic susceptibility. The data indicated that the peptidase mixtures of *Flammulina velutipes* and Flavourzyme contained subtilisin-like peptidases which were stabilized by Ca^{2+} ions. It was examined, how CaCl_2 (9 mM) affected the hydrolysis of wheat gluten (10 g/L) with *Flammulina velutipes* or Flavourzyme peptidases (10 kaU/mL). The loss of peptidase activity was minimized in the presence of CaCl_2 (without gluten) by 6 % for *Flammulina velutipes* and by 4 % for Flavourzyme. During the incubation of wheat gluten in the presence of CaCl_2 the autopeptidolysis was lowered by around 4 % for *Flammulina velutipes* and 2 % for Flavourzyme peptidases. However, the DH was not significantly increased (*Flammulina velutipes*: 12.6 ± 1.0 %, Flavourzyme: 14.7 ± 0.4 %) compared to the control without supplementation (*Flammulina velutipes*: 11.3 ± 0.1 %, Flavourzyme: 14.9 ± 0.9 %). Neither autopeptidolysis nor product inhibition were significantly affected by the presence of Ca^{2+} ions. It was concluded that the lack of cleavage sites in wheat gluten was another factor likely to limit hydrolysis.

5.3.3 Cleavage sites

Since no single purified peptidase was used for the hydrolysis of wheat gluten, the incubations were evaluated by adding either substrate or peptidases after three hours of pre-incubation. The initial rate of hydrolysis was affected in a positive way by the additional supplementation of substrate (C2, Fig. 5-5, A and B). Product inhibition increased because of a higher release of L-amino acid compared to the control. This observation was also described by *Ravallec-Plé et al.* (2000) for the hydrolysis of cod (*Gadus morhua*) muscle with Alcalase. They assumed that the substrate cleavage sites were limiting, as the DH did not increase upon another addition of enzyme.

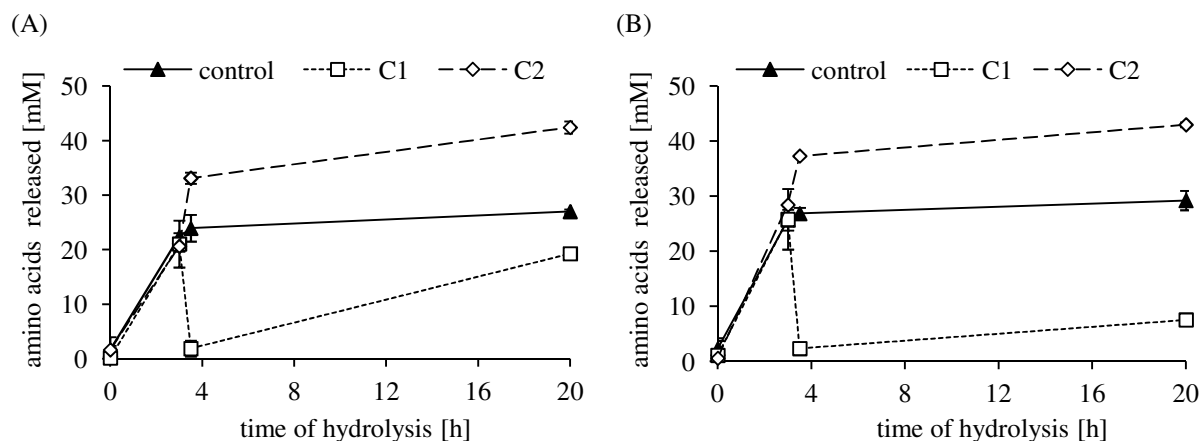


Fig. 5-5 | Cleavage sites study: Release of L-amino acids [mM] using peptidases of *Flammulina velutipes* (A) and Flavourzyme (B) (28 kaU/mL hydrolysate each) for 20 hours, 10 g/L gluten at pH 6, 45 °C. After three hours of prehydrolysis, (C1) addition of fresh peptidases and buffer to the pre-hydrolyzed gluten and (C2) addition of fresh wheat gluten to the already used peptidases and buffer solution compared to the control.

Different observations were made in the present study for the two enzyme preparations after the second addition: In the case of peptidases from *Flammulina velutipes*, the addition of fresh enzyme and buffer after 3 hours of prehydrolysis led to a further increase of the rate of hydrolysis. A similar release of L-amino acids after 20 hours of hydrolysis between the sample C1 (additional enzyme) and the control was observed (Fig. 5-5, A). This is an indication that there were still enough cleavage sites in the substrate for the action of the peptidases from *Flammulina velutipes*. Flavourzyme showed the opposite effect. Despite the elimination of inhibitory L-amino acids and the supply of fresh enzyme, the DH of the control was not reached within another 17 hours of hydrolysis (C1, Fig. 5-5, B). Similar experiments with a higher activity of Flavourzyme (280 kaU/mL) confirmed the results. After nine hours of hydrolysis no further increase of the DH was determined for C1 (data not shown). With a higher initial enzyme activity, it is expected that the lack of cleavage sites appears even earlier. An increased substrate concentration will delay the effect. Overall, the lack of suitable cleavage sites in wheat gluten limited the efficiency of the peptidases in Flavourzyme. A possible explanation could be a lack of prolyl-specific peptidases in the enzyme mixture. L-Glutamine and L-proline (13 to 23 %) together account for half or more of the peptide-bound amino acids in wheat gluten (Woychik *et al.*, 1961). Due to the unique structure of L-proline, peptide bonds involving L-proline are often less susceptible to the action of peptidases. Using Z-Gly-Pro-*para*-nitroanilide as a substrate for prolyl-specific peptidases (Edens *et al.*, 2005), no activity was detected in Flavourzyme, whereas the culture supernatant of *Flammulina velutipes* possessed an activity of 1.8 ± 0.3 U/L. The supernatant of *Flammulina velutipes* contained numerous gelatin-cleaving peptidases that were not purified yet (Grimrath *et al.*, 2011), furthermore a glutaminase (85 kDa with 13 kDa subunits indicating a hexameric

protein) (*N. Eisele et al.*, 2011) and a serine protease (34.5 kDa) with caspase- and legumain-like activities (*Iketani et al.*, 2013). Flavourzyme is a commercial enzyme preparation of *Aspergillus oryzae* with endo- and exopeptidolytic activity. So far, the sequence analysis of peptidases of *Aspergillus oryzae* demonstrated about 18 peptidases, while the genome of *Aspergillus oryzae* was supposed to code for 134 putative peptidases (*Kobayashi et al.*, 2007). Depending on the cultivation conditions, different peptidases were expressed. *Liang et al.* (2009) described extracellular peptidases of *Aspergillus oryzae*, for example oryzin, aspergillus-pepsin O, chain A of deuterolysin, leucine aminopeptidase, glutaminase, metallopeptidase, alanyl dipeptidyl peptidase, and Xaa-Pro aminopeptidase from the culture of a soybean koji. There are no data on which of these peptidases is present in Flavourzyme. The peptidase mixtures used in the past were unable to hydrolyze wheat gluten completely. To compose an ideal peptidase mixture for the total hydrolysis, the peptidases of Flavourzyme or *Flammulina velutipes* (*Grimrath et al.*, 2011) will have to be purified individually and biochemically characterized for substrate specificity. The presence of a prolyl-specific peptidases (*Edens et al.*, 2005) and a glutaminase (*Aaslyng et al.*, 1999) and a balanced ratio of exo- to endopeptidases appears essential to produce taste-active amino acids and peptides (*Kong et al.*, 2007).

Compared to *Flammulina velutipes* peptidases (Tab. 5-1), the experiments showed that Flavourzyme peptidases suffered from a combination of a lack of cleavage sites, pronounced product inhibition, and the lack of prolyl-specific activity. Peptidases of *Flammulina velutipes* were adversely affected by product inhibition only.

The integration of electro dialysis equipped with UF membranes was shown to be an effective means to overcome product inhibition. The autopeptidolytic activity of the peptidase mixtures is a minor issue, because it is easily suppressed by increased dosages of substrate.

Acknowledgements

Cooperation of the Nestlé Product Technology Centre, Singen/Hohentwiel, Germany, is gratefully acknowledged.

6 Vorwort zu “Purification and characterization of an extracellular prolyl endopeptidase isolated from *Flammulina velutipes*”

Prolylspezifische Peptidasen besitzen in Abgrenzung zu allen anderen Peptidasen die einmalige Fähigkeit vor oder nach einem Prolinrest die Peptidkette zu spalten (vgl. Kapitel 1.1.3). Im menschlichen Organismus sind sie an der Entstehung diverser Erkrankungen wie z. B. Depressionen, Parkinson, Alzheimer, Amnesie, Zöliakie, Herz-Kreislauf-Erkrankungen, Anorexie oder Bulimie beteiligt (*Garcia-Horsman et al.*, 2007). In der Industrie finden diese Enzyme u. a. zum Zweck der Minimierung von Trübungen beim Bierbrauen, zur Entbitterung von Caseinhydrolysaten sowie zur rheologischen Teigverbesserungen und Herstellung glutenfreier Backwaren Anwendung (*Lopez & Edens*, 2005; *Gänzle et al.*, 2008; *Caputo et al.*, 2010).

Die wichtigste industrielle Quelle für diese Peptidasen sind Pilze. Im Gegensatz zu den pathogenen Bakterien stellen essbare Pilze während der Produktion kein gesundheitliches Risiko dar. Darüber hinaus ist die Kultivierung eben dieser Pilze unter ethischen Gesichtspunkten nicht in Frage zu stellen. Im Gegensatz zu pflanzlichen Quellen wird zudem eine deutlich größere Ausbeute in kürzerer Zeit mit weniger Aufwand erzielt. Die bislang kommerziell am häufigsten eingesetzte prolylspezifische Endopeptidase (An-Pep) stammt aus dem Ascomyceten *Aspergillus niger*. Dessen ungeachtet wurden auch in verschiedenen Basidiomyceten extrazelluläre prolylspezifische Peptidasen identifiziert (vgl. Kapitel 1.1.3). In Vorarbeiten von *Grimrath* (2011) konnte eine neue prolylspezifische Peptidase aus dem Kulturüberstand von *Flammulina velutipes* identifiziert und aufgereinigt werden (vgl. Kapitel 1.1.2). Das nachfolgende Manuskript zeigt die ausführliche biochemische Charakterisierung einer neuen Peptidase im Vergleich zu der kommerziell verfügbaren An-Pep und Untersuchungen zur Spaltspezifität beider Enzyme für das Substrat Weizengliadin auf.

7 Purification and characterization of an extracellular prolyl endopeptidase isolated from *Flammulina velutipes*

Abstract

A novel prolyl endopeptidase has been purified and characterized from the culture supernatant of the basidiomycete *Flammulina velutipes*. The molecular mass was estimated to be 50 kDa by using SDS-PAGE. The enzyme attained optimal activity at pH 5.0, an optimal temperature of 45 °C and an isoelectric point of 3.8. The residual activity after 20 h incubation at 20 °C was higher than 80 %. Fe²⁺ and Fe³⁺ activated the prolyl endopeptidase, while Cu²⁺, Mn²⁺, Zn²⁺, Ni²⁺ and Co²⁺ decreased the enzyme activity. The enzyme was strongly inhibited by Z-Pro-prolinal, while the incubation with phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) showed only a slight decrease in peptidase activity, and metal chelators had no effect. Furthermore, the enzyme was biochemically compared to the extracellular prolyl endopeptidase from *Aspergillus niger* (An-Pep). This study demonstrated a similar hydrolysis of natural substrates, such as casein, gliadin and gelatin with the prolyl endopeptidase from *Flammulina velutipes*.

Keywords

Prolyl endopeptidase, S28, protein hydrolysate, *Flammulina velutipes*, An-Pep

7.1 Introduction

Among the serine peptidases, prolyl endopeptidases (EC 3.4.21.26, S09 family), have the unique possibility to cleave peptides at the carboxyl side of internal proline residues (Walter *et al.*, 1980). A first microbial prolyl endopeptidase was identified from *Flavobacterium meningosepticum* (Yoshimoto *et al.*, 1980) and afterwards in other pathogenic bacteria, *Xanthomonas* sp. (Szwajcer-Dey *et al.*, 1992), *Aeromonas hydrophila* (Kanatani *et al.*, 1993) and *Pseudomonas* sp. KU-22 (Oyama *et al.*, 1997). Similar peptidases are widely distributed in mammals (Andrews *et al.*, 1980; O'Leary *et al.*, 1996; M.-X. Wang *et al.*, 2012; Goptar *et al.*, 2013), plants (Yoshimoto *et al.*, 1987; Kuwabara, 1992), humans (Mizutani *et al.*, 1984; Kalwant & Porter, 1991) and fungi (Yoshimoto *et al.*, 1988; Sattar *et al.*, 1990; Edens *et al.*, 2005; Riggle & Fisher, 2009; Kang *et al.*, 2014). Human prolyl endopeptidase is involved in variety of neurological disorders, such as depression, Parkinson's disease, Alzheimer's disease (Petit *et al.*, 2000), amnesia, as well as coliac sprue and other diseases (blood pressure regulation, anorexia, bulimia nervosa) (Maes *et al.*, 1994; Garcia-Horsman *et al.*, 2007).

Due to the unique cyclic structure of proline, the most peptidases do not efficiently cleave the peptide bonds of proline-rich proteins, such as gluten, casein, collagen and gelatin. Hence, prolyl endopeptidases are essential for the food processing industries including brewing, debittering of protein hydrolysates and gluten-free bread-making processes (Walter *et al.*; Lopez & Edens, 2005). Research has focused on the screening, purification and characterization of new efficient and food-grade prolyl endopeptidases to overcome these problems. Food-grade microorganism like some fungi, e.g. *Aspergillus* sp., may be considered as safe and attractive candidates for producing prolyl endopeptidases (Stepniak *et al.*, 2006; Mitea *et al.*, 2008). Edens *et al.* (2005) identified a acid prolyl endopeptidase from *Aspergillus niger* (An-Pep) belonging to peptidase family S28.004. Incubation studies with β -casein and An-Pep led to debittered hydrolysates. In addition, these β -casein hydrolysates showed a highly potent ACE inhibitory effect (Norris *et al.*, 2014). It was observed that using low levels of An-Pep in bottled beer could effectively prevent chill-haze formation, but leaving the beer foam almost unaffected (Lopez & Edens, 2005). Several studies confirmed that An-Pep efficiently degraded gluten *in vitro* under the conditions similar to the ones present in the gastrointestinal tract, which indicates that the coadministration of An-Pep with a gluten-containing meal might eliminate gluten toxicity (Stepniak *et al.*, 2006; Mitea *et al.*, 2008). Meanwhile, *Aspergillus oryzae* species, which are widely used in traditional

fermentation processes e.g., soy sauce, sake, miso, shochu, were noted to produce a novel prolyl endopeptidase with a high affinity to larger substrates (Kang *et al.*, 2014). Edible basidiomycetes seem to be a further potent source for the production of prolyl endopeptidases. *Agaricus bisporus* (Sattar *et al.*, 1990) or *Coprinopsis clastophylla* (Chen *et al.*, 2012), secreted also extracellular prolyl endopeptidases in liquid cultures. During the screening of prolyl-specific peptidase-producing organism, *Flammulina velutipes* emerged as very promising candidate (Grimrath, 2011). The aim of this study was to purify and biochemically characterize a novel extracellular prolyl-specific peptidase from a submerged culture of the basidiomycete *Flammulina velutipes* in comparison to the commercially available An-Pep.

7.2 Material and Methods

7.2.1 Materials

All used chemicals and solvents were of analytical grade or HPLC grade and obtained from Carl Roth (Karlsruhe, Germany), Merck (Darmstadt, Germany), Sigma–Aldrich (Taufkirchen, Germany) and VWR International GmbH (Darmstadt, Germany), respectively.

7.2.2 Cultivation of *Flammulina velutipes*

Cultivations were carried out essentially as described by Giesler *et al.* (2013).

7.2.3 Peptidase activity

Detection of proline-specific peptidolytic activity was performed in 96-well microtiter plates in 25 mM sodium acetate buffer pH 5.5, 10 μ L benzyloxycarbonyl-*glycine-proline-p*-nitroanilide (2 mM in dimethyl sulfoxide (Z-Gly-Pro-*p*NA)) from Sigma Aldrich (Taufkirchen, Germany) and 20 μ L enzyme preparation in a total volume of 150 μ L. The molar extinction coefficient of *para*-nitroaniline was determined at $\epsilon^* = 4,567 \mu\text{L}/\mu\text{M}$ at 405 nm in a BioTek Synergy 2™ microtiter plate reader (Bad Friedrichshall, Germany). The absorption was measured at 37 °C and 405 nm over 90 min. One unit of peptidolytic activity was calculated as the amount of enzyme required to produce 1 μM *para*-nitroaniline per minute. For visualization of peptidolytic activity zymography with 0.3 % gelatine in a native

polyacrylamide gel was performed after *Eisele et al.* (2011) with an incubation time of 12 h at 37 °C in 25 mM sodium acetate buffer, pH 5.

7.2.4 Purification of the prolyl endopeptidase

The culture supernatant was concentrated using Vivaspin-15 concentrator MWCO 3 kDa (Sartorius, Göttingen, Germany). The purification was performed using preparative semi-native-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE), model 491 Prep Cell Biorad (Hercules, United States). Three milliliter of the concentrated sample was mixed with 3 mL of sample buffer (0.1 M Tris/HCl (pH 6.8), 4 % SDS, 20 % glycerol, 0.2 % bromophenol blue) and separated on a 12 % gel (8.2 cm² gel surface area), at 12 W constant power and 4 °C with a flow rate of 0.8 mL/min of 25 mM sodium acetate buffer pH 5, as elution buffer. Fractions (7 mL) displaying activity towards the cleavage of Z-Gly-Pro-pNA were collected, concentrated (MWCO 3 kDa) and pooled.

7.2.5 SDS-PAGE

SDS-PAGE analyses were performed using 12 % (w/v) polyacrylamide separation gels after *Giesler et al.* (2014). The isoelectric point (pI) was determined as described by *Eisele et al.* (2011).

7.2.6 pH and temperature optima and thermal stability

Determination of the pH-optimum was carried out using Britton-Robinson buffer (40 mM H₃BO₃; 40 mM H₃PO₄; 40 mM CH₃COOH; 20 mM NaOH to adjust pH; *Britton & Robinson* (1931)) ranging from pH 3.0 to 9.5. Temperature optimum was investigated in 5 °C intervals between 20 °C and 50 °C. Thermal stability was examined by incubating the enzyme preparation for 20 h at 4 °C, 25 °C and 45 °C in 25 mM sodium acetate buffer pH 5.

7.2.7 Effect of additives and inhibitors

Various metal ions (FeCl₃, FeSO₄, KCl, Cu(NO₃)₂, NiSO₄, CoCl₂, ZnSO₄, MnSO₄, LiCl, MgCl₂, NaCl, CaCl₂), solvents (dimethyl sulfoxide, DMSO; methanol, MeOH and ethanol, EtOH), SDS, inhibitors like EDTA, phenyl-methanesulfonylfluoride (PMSF, serine peptidase

inhibitors), Pepstatin and an inhibitor for prolyl-specific peptidases Z-Pro-Prolinal were added to the Fvp27 from *Flammulina velutipes* or commercial An-Pep from *Aspergillus niger* from DSM (Delft, Netherlands), each 0.1 U/mL, incubated for 10 min at 37 °C followed by enzyme assay under standard conditions at pH and thermal optima. Enzyme activities were expressed as relative values (%) and the sample without any metal ion or reagent was used as the control (100 %).

7.2.8 Enzyme kinetics

The Michaelis-Menten constant (K_m), maximal velocity (V_{max}) and k_{cat} of the purified enzyme were determined using Z-Gly-Pro-pNA as substrate in the range of 0.3-1.3 mM under the optimal assay conditions. The kinetic data were calculated using Michaelis-Menten equation using the software SigmaPlot 10.0.

7.2.9 Hydrolysis of chromogenic substrates

The purified enzyme Fvp27 and the commercial An-Pep were tested against different chromogenic peptide substrates (*N*-Succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA, *N*-Succinyl-Gly-Gly-Leu-pNA, Ala-pNA and Leu-pNA purchased from Sigma Aldrich (Taufkirchen, Germany)). All were dissolved in dimethyl sulfoxide to a concentration of 2 mM. The released pNA was detected at 405 nm as described in the activity assay.

7.2.10 Hydrolysis of natural substrates and analysis of the products

Hydrolysis experiments were carried out with short peptides, e.g. Arg-Pro, Pro-Gly-Leu (Bachem, Bubendorf, Switzerland), oxidized insulin chain B and Angiotensin I (Ang I) and dry sterilized (130-135 °C, 8 h) wheat gluten, gliadin, myoglobin or β -casein (10 g/L) over 20 h at 800 rpm, 45 °C and pH 5.0 in 25 mM sodium acetate buffer with two different enzymes either Fvp27 from *Flammulina velutipes* or An-Pep from *Aspergillus niger* from DSM (Delft, Netherlands), using standardized peptidase activities. The enzyme reaction was stopped by the addition of 1 M acetic acid.

The products of hydrolysis of oxidized insulin chain B, Arg-Pro, Pro-Gly-Leu, gliadin and β -casein were measured by reverse high pressure liquid chromatography (RP-HPLC) using a

Nucleodur C18 ec column (250 x 4 mm, 5 μ m, Macherey-Nagel, Dueren, Germany) using the following gradient system at 35 °C with 0.1 % trifluoroacetic acid (A) and 0.1 % trifluoroacetic acid in acetonitril (B): 0-3 min 5 % B, 3-10 min 30 % B, 10-35 min 100 % B, 35-40 min 100 % B, 40-45 min 5 % B and 45-50 min 5 % B at a flow rate of 1 mL/min detection at 220 nm, followed by amino acid analysis to predict the cleavage sites (*Giesler et al.*, 2013).

The hydrolysis of angiotensin I was detected by RP-HPLC coupled with mass spectrometry with a electrospray ionization sources using a Nucleodur Pyramid C18 column (250 x 4 mm, 5 μ m, Macherey-Nagel, Dueren, Germany) under the following conditions: injection volume 10 μ L column temperature 40 °C, flow rate 0.3 mL/min, solvent A was 0.1 % formic acid and B 0.1 % formic acid in acetonitril. The following linear gradient was applied: 0-7 min 4 % B, 7-15 min 20 % B, 20-22 min 100 % B, 22-25 min 4 % B and 25-30 min 4 % B. Absorbance was measured at 220 and 280 nm. Positive mode electrospray ionization was performed using a capillary temperature of 320 °C, a source voltage of 4.5 kV, a capillary voltage of 40 eV, and a maximum injection time of 30 ms. Full-scan mass spectra were acquired in the *m/z* range of 100-1000 Da at a frequency of one spectrum every 1.0 s. Targeted MS/MS analysis was performed using a relative collision energy of 25 eV.

The separation of intact proteins of the α -gliadin, gluten and β -casein hydrolysate was carried out with RP-HPLC using a Aeris Widepore C4 column, 150 x 4.6 mm, 3.6 μ m (Phenomenex, Aschaffenburg, Germany) using the following gradient system at 35 °C with 0.1 % trifluoroacetic acid (A) and 0.1 % trifluoroacetic acid in acetonitril (B): 0-3 min 3 % B, 3-23 min 65 % B, 23-25 min 100 % B, 25-28 min 100 % B, 28-30 min 3 % B and 30-35 min 3 % B at a flow rate of 1.2 mL/min and detection at 220 and 280 nm.

7.2.11 Peptide analysis using LC-MS (QTOF)

Assigned Fvp27 bands were excised from SDS polyacrylamide gels, dried, consecutively incubated with dithiothreitol and iodine acetamide, and finally digested with trypsin (sequencing grade modified trypsin; Promega, Madison, WI, USA). The resulting peptides were extracted and purified according to standard protocols. Peptides, re-dissolved in 20 mL H₂O, 2% acetonitrile, and 0:1% formic acid and the peptides of the gliadin hydrolysate after 20 h were analysed using the nano-liquid chromatography (nLC) system EASY-nLC II

(Bruker Daltronik, Bremen) equipped with a 20 mm pre-column (C18-A1 3PCS, ThermoFisher Scientific, Germany) followed by a CP3-61271-00 0.1 x 150 mm Magic C18AQ 3 μ 200 Å column (Michrom Bioresources, Inc., Auburn, CA) and a linear gradient (300 nL/min) of water and acetonitrile (each with 0.1 % formic acid (v/v) from 95 % water to 95 % acetonitrile within 25 min and hold for 15 min), connected to a maXis impact QTOF mass spectrometer (Bruker Daltronik, Bremen, Germany) equipped with a captive nanospray ion source for electrospray ionisation in the positive mode Scan-mode (m/z 200-2000). For collision-induced dissociation experiments, multiple charged parent ions were automatically transmitted from the quadrupole mass analyser into the collision cell (21-50 eV). The resulting daughter ions were separated by an orthogonal time-of-flight mass analyzer operating with lock mass calibration (1221.9906) and mass resolution > 30,000. Peptide mass analysis was done with ProteinScape 3.0 (Bruker Daltronik, Bremen, Germany) and applied for peptide identification (NCBIInr, current in house releases) using the Mascot software server (Mascot 2.4.0 search engine, Matrix Science, London, GB). Parameters were set as follows: global modification, carbamidomethylation (variable); oxidation (M, variable), up to one missing cleavage allowed; precursor ion mass tolerance, 10 ppm; fragment ion mass tolerance, 0.05 Da; peptide charge, 1+, 2+, 3+; instrument, ESI QUAD TOF; minimum peptide length, 4; Mascot score >30.

7.2.12 Statistical analysis

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

7.3 Results and Discussion

7.3.1 Purification of an extracellular prolyl-specific peptidase from *Flammulina velutipes*

Submerged cultivation of *Flammulina velutipes* in minimal medium with 4 % wheat gluten resulted in a visible increase of the solubility of gluten. Zymography of the supernatant of *Flammulina velutipes* showed peptidase bands at about 27, 32-37 and 50 kDa (Grimrath *et al.*, 2011).

Tab. 7-1 | Purification of the Fvp27 from *Flammulina velutipes*.

Purification step	Volume [mL]	Total activity [U]	Protein concentration [mg/mL]	Specific Activity [U/mg]	Purification	Yield [%]
Supernatant	2.0	1.6	9.2	0.1	1.0	100.0
Supernatant + native PAGE buffer	4.0	2.1	5.2	0.1	1.0	134.1
Fraction Each 56-62	7.0	0.6	0.03	3.1	35.7	40.7
Ultrafiltration (3 kDa)	5.0	1.4	0.1	5.5	63.3	82.9

Peptidases were separated and purified from the concentrated supernatant using a combination of preparative PAGE and ultrafiltration as summarized in Tab. 7-1. First, the proteins in the supernatant were separated by preparative gel electrophoresis over 10 h, fraction 56-62 showed prolyl-specific activity. Secondly, these fractions were pooled and afterwards ultrafiltered using a 3 kDa cut-off by achieving a 63-fold purification. Zymography of the prolyl-specific active fraction showed a single band at 27 kDa (Fig. 7-1, A). The prolyl-specific peptidase, called Fvp27 was purified by 63-fold in 83 % yield from the *Flammulina velutipes* supernatant. According to SDS gel electrophoresis, the purified enzyme showed under denatured conditions a band with mobility corresponding to 50 kDa (Fig. 7-1, A and B) and only 27 kDa band under native conditions. Similar phenomenon of three protein bands in the SDS-PAGE gel with identical mass-to-charge fragments (22, 60, 84 kDa) was observed for the purified extracellular prolyl oligopeptidase from the basidiomycete *Coprinopsis clastophylla* (Chen *et al.*, 2012). Isoelectric focusing of the purified Fvp27 indicated an isoelectric point around pH 3.8, which is similar to the prolyl endopeptidase from *Aspergillus niger* (An-Pep, 66 kDa, pI 4.2) (Edens *et al.*, 2005) or *Aspergillus oryzae* (60 kDa) (Kang *et al.*, 2014).

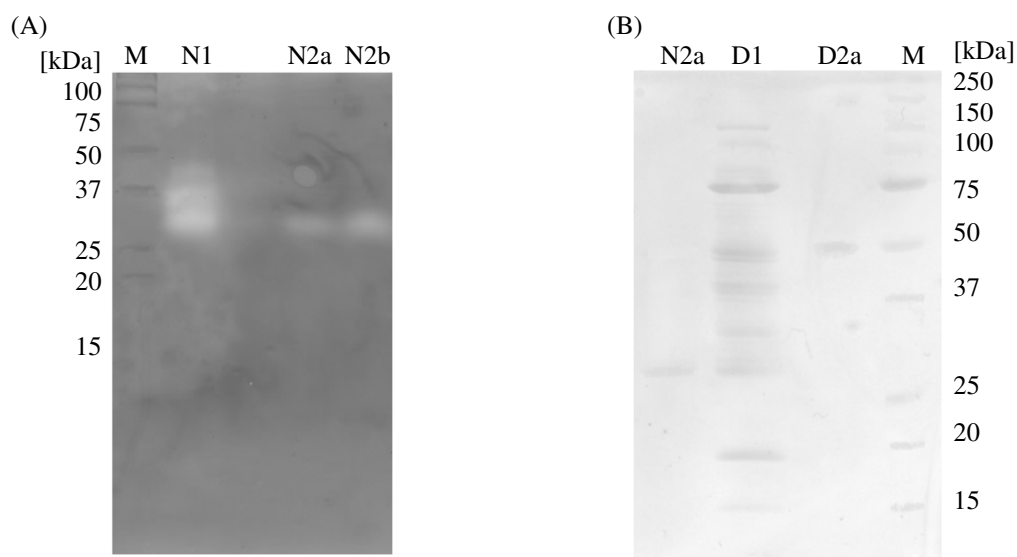


Fig. 7-1 | Zymography (A) and SDS-PAGE (B) of the purified Fvp27 from *Flammulina velutipes*, M [kDa] marker, N native sample, D denatured sample, 1- *Flammulina velutipes* supernatant, 2a- purified ultrafiltered Fvp27 fraction 56, 2b- purified ultrafiltered Fvp27 fraction 62.

By means of electrospray ionization tandem mass spectrometry, three tryptic peptides (KATFGLSDVTHLDDAAGALRN, WILVGGSYSGA and RLVNVETNYDARQ) were sequenced *ab initio* from the protein band excised from the denaturing SDS-PAGE gel (Fig. 7-1). Homology searches against public databases (NCBI Blast, program blastp) identified the enzyme as a member of the S28 peptidase family like An-Pep (S28.004). Most frequent and best ranked hits were the peptidase 28 from *Trametes versicolor* FP-101664 SS1 (gil636607343|, Accession XP_008034806) and from *Gloeophyllum trabeum* ATCC 11539 (gil630345913|, Accession XP_007862257).

7.3.2 Enzymatic characterization of Fvp27 and An-Pep

Fvp27 from *Flammulina velutipes* as well as An-Pep from *Aspergillus niger* showed a pH optimum at pH 5 as shown in Fig. 7-2, A. The peptidase from *Flammulina velutipes* was more stable at higher pH-values than An-Pep, e.g. pH 7 (Fvp27: 40 % of initial activity, An-Pep: 10 %). In contrast, about 60 % of the initial activity of An-Pep remained after incubation at pH 3.0. The temperature optimum for the prolyl-specific peptidase Fvp27 was determined at 45 °C. Prolyl endopeptidase from *Aspergillus niger* and *Pseudomonas* sp. KU-22 showed a temperature optimum of 42 °C (Edens *et al.*, 2005) and 45 °C (Oyama *et al.*, 1997), respectively. The thermal stability of the purified prolyl-specific peptidase from *Flammulina velutipes* and from *Aspergillus niger* were tested at 4, 20 and 45 °C for 20 h (Fig. 6-2, B).

There was no loss of activity at 4 °C for both enzymes and a minimal decrease of the initial activity at 20 °C of less than 10 % for An-Pep and 18 % for Fvp27. A higher decrease in activity was observed when the enzyme was incubated at 45 °C, at least over 95 % of An-Pep and up to 90 % of Fvp27 due to the accelerated rate of hydrolysis. Kang *et al.* (2014) also reported a residual activity of 70 % after 30 min at 50 °C for the prolyl endopeptidases of *Aspergillus oryzae*.

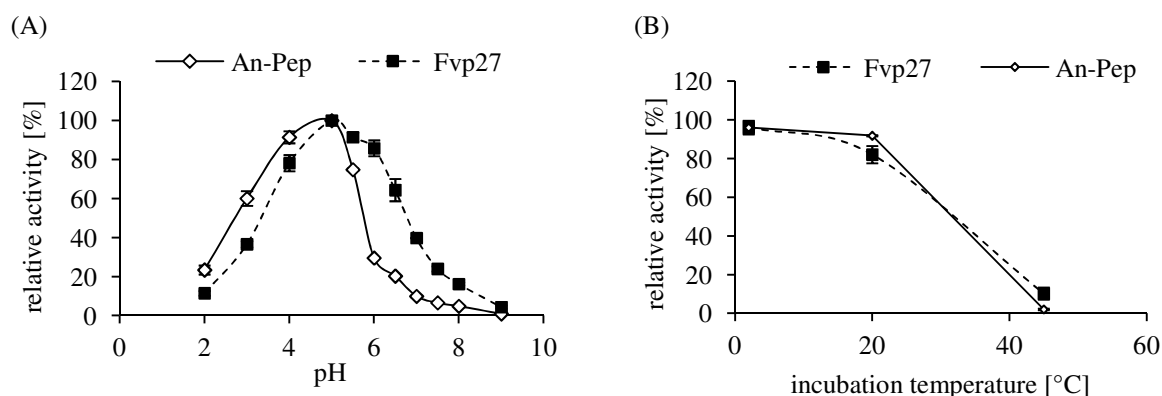


Fig. 7-2 | Effect of pH on An-Pep or Fvp27 activity [0.5 U/mL] (A) and thermal stability (B) of both enzymes after 20 h incubation tested with the substrate Z-Gly-Pro-pNA at pH 5 and 37 °C.

Kinetic data for the purified Fvp27 and the commercial An-Pep were tested by varying the substrate Z-Gly-Pro-pNA concentration on the reaction rate (Fig. 7-3). The results showed that An-Pep exhibited a higher affinity for Z-Gly-Pro-pNA ($K_m = 0.49$ mM, $k_{cat} = 0.109$ s⁻¹, $V_{max} = 99.4$ mU/mg) in comparison to Fvp27 ($K_m = 0.86$ mM, $k_{cat} = 0.119$ s⁻¹, $V_{max} = 115.8$ mU/mg). The $K_m = 0.26$ mM for the prolyl endopeptidase of *Aspergillus oryzae* was even lower (Kang *et al.*, 2014). The enzymatic and physicochemical properties of other prolylspecific peptidases are summarized in Tab. 7-2.

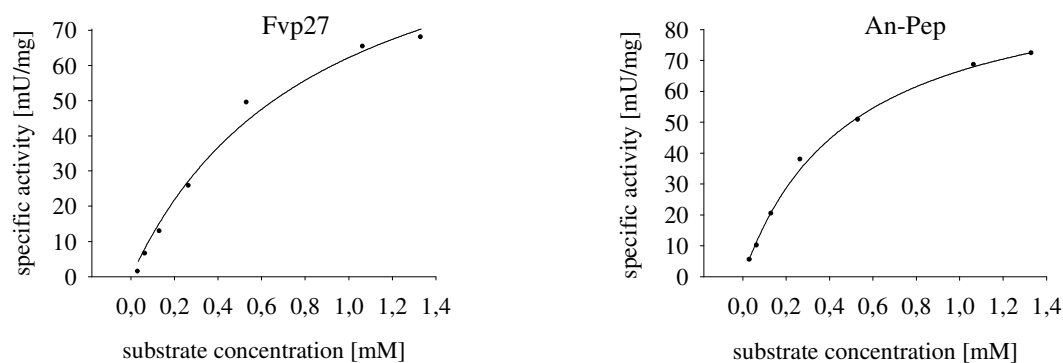


Fig. 7-3 | Michaelis-Menten kinetics for Fvp27 and An-Pep using Z-Gly-Pro-pNA as substrate at 37°C.

Tab. 7-2 | Comparison of enzymatic and physicochemical properties of several prolyl endopeptidases.

Origin	<i>Flammulina Velutipes</i>	<i>Agaricus bisporus</i>	<i>Coprinopsis clastophylla</i>	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Aspergillus oryzae</i>	<i>Flavobacterium meningosepticum</i>	<i>Human brain</i>
pH optimum	5	7.5	8.0	4.2	4.0	7.0	6.8
Temperature optimum	45 °C	37 °C	37 °C	42 °C	30 °C	40 °C	37 °C
pI	3.8	4.8	5.2	4.2	ND	9.6	4.75
Molecular mass	50 kDa	78 kDa	60 kDa	66 kDa	60 kDa	76 kDa	79.6 kDa
K_m	0.86 mM	0.41 mM	3.42 mM	ND	0.26 mM	ND	0.90 mM
K_{cat}	0.12 s ⁻¹	11.8 s ⁻¹	162 s ⁻¹	ND	240 s ⁻¹	ND	ND
Inhibition with	DFP = ND Z-Pro-Prolinal	DFP, Z-Pro-Prolinal	DFP	DFP	EDTA	DFP, Z-Pro-Prolinal	DFP, Z-Pro-Prolinal
Reference	This study	(Sattar <i>et al.</i> , 1990)	(Chen <i>et al.</i> , 2012)	(Edens <i>et al.</i> , 2005)	(Kang <i>et al.</i> , 2014)	(Yoshimoto <i>et al.</i> , 1980)	(Kalwant & Porter, 1991)

ND not determined

DFP diisopropylfluorophosphate

7.3.3 Effect of various metal ions, inhibitors and solvents

The sensitivity of the purified prolyl endopeptidase from *Flammulina velutipes* and the commercial prolyl endopeptidase An-Pep towards various metal ions and inhibitors was tested, and the results are displayed in Tab. 7-3.

Tab. 7-3 | Effect of metal ions, inhibitors and solvents on the activity of Fvp27 and An-Pep [initial activity 0.1 U/mL each], tested with the substrate Z-Gly-Pro-*p*NA at pH 5 and 37 °C.

Concentration [mM or %]	Substance	Relative Fvp27 activity [%]	Relative An-Pep activity [%]
5	FeCl ₃	133 ± 3	127 ± 3
5	FeSO ₄	135 ± 18	153 ± 10
5	KCl	84 ± 1	111 ± 13
5	Cu(NO ₃) ₂	64 ± 1	56 ± 10
5	NiSO ₄	87 ± 6	82 ± 11
5	CoCl ₂	87 ± 8	84 ± 8
5	ZnSO ₄	70 ± 3	84 ± 13
5	MnSO ₄	88 ± 2	85 ± 1
5	LiCl	95 ± 2	113 ± 11
5	MgCl ₂	92 ± 1	86 ± 8
5	SDS	11 ± 2	64 ± 7
0.66	EDTA	96 ± 1	105 ± 4
0.014	EDTA	100 ± 1	98 ± 2
0.66	PMSF	47 ± 2	45 ± 0
0.014	PMSF	94 ± 2	95 ± 4
0.12	Pepstatin A	96 ± 1	40 ± 1
0.012	Pepstatin A	100 ± 1	80 ± 6
50	Z-Pro-Prolinal	7 ± 2	7 ± 1
5	Z-Pro-Prolinal	35 ± 1	20 ± 2
0.5	Z-Pro-Prolinal	42 ± 0	22 ± 1
0.05	Z-Pro-Prolinal	58 ± 2	34 ± 3
0.005	Z-Pro-Prolinal	69 ± 1	40 ± 0
0.5	NaCl	102 ± 2	100 ± 1
1	NaCl	102 ± 3	99 ± 2
5	NaCl	103 ± 4	99 ± 0
15	NaCl	101 ± 1	96 ± 3
25	NaCl	103 ± 1	93 ± 1
0.5	CaCl ₂	89 ± 3	76 ± 2
1	CaCl ₂	94 ± 9	64 ± 2
5	CaCl ₂	94 ± 3	48 ± 2
10	CaCl ₂	100 ± 4	43 ± 4
25	CaCl ₂	67 ± 1	34 ± 1
50	CaCl ₂	39 ± 2	30 ± 1
7 %	EtOH	18 ± 3	34 ± 3
40 %	EtOH	0 ± 0	2 ± 1
67 %	EtOH	0 ± 0	0 ± 0

Concentration [mM or %]	Substance	Relative Fvp27 activity [%]	Relative An-Pep activity [%]
7 %	MeOH	26 ± 4	56 ± 1
40 %	MeOH	0 ± 0	13 ± 1
67 %	MeOH	0 ± 0	0 ± 0
7 %	DMSO	28 ± 1	48 ± 7
40 %	DMSO	7 ± 1	2 ± 1
67 %	DMSO	13 ± 4	5 ± 1

Na⁺, Li⁺ and Mg²⁺ did not show any considerable effect on the peptidase activities, whereas metal ions such as Cu²⁺, Mn²⁺, Zn²⁺, Ni²⁺ and Co²⁺ exhibited different inhibitory effects on the activity of both enzymes. Similar result (strong inhibition by Cu²⁺ and slight by Mn²⁺, Co²⁺, Ni²⁺) were obtained for the extracellular proly oligopeptidase from the basidiomycete *Coprinopsis clastophylla* (Chen *et al.*, 2012). Only K⁺ ions slightly inhibited Fvp27, but did not affect An-Pep activity (Tab. 7-3). In contrast to the increase of prolyl peptidase activity from *Aspergillus oryzae* in presence of 10 mM Ca²⁺ ions (Kang *et al.*, 2014), the peptidase activity of An-Pep significantly decreased. Fvp27 was not affected upon 10 mM CaCl₂. At a higher concentration of 50 mM CaCl₂ both peptidases showed only 30-39 % of the initial activity. Different from most of the reported serine protease, the activity of both peptidases was enhanced by Fe²⁺ and Fe³⁺, indicating that these ions might play an important role in the enzyme. Similarly, effects were found in a serine protease in human erythrocyte membranes (Chao *et al.*, 1984) and a serine peptidases isolated from fresh fruiting bodies of the edible mushroom *Hypsizigus marmoreus* (Zhang *et al.*, 2010), which were stimulated by Fe²⁺. Iron ions may trigger the peptidases to form a more compact structure or help to maintain the activity of the peptidases during the reaction.

The activities of the prolyl endopeptidases An-Pep and Fvp27 were not affected by the metal chelator EDTA (0.7 mM), whereas the over 50 % of activity was inhibited by the serine peptidase inhibitor PMSF (0.7 mM). No influence on enzyme activity of Fvp27 was observed in the presence of Pepstatin A in any tested concentration, an inhibitor of aspartyl peptidases. In contrast, over 60 % of the initial An-Pep activity was lost after incubation with Pepstatin A (0.1 mM) (Tab. 7-3). Similar results concerning EDTA, PMSF and Pepstatin A were observed by Kubota *et al.* (2005) for the same prolyl endopeptidase from *Aspergillus niger* and by Chen *et al.* (2012) and Yoshimoto *et al.* (1988) for the prolyl endopeptidases of basidiomycetes. Z-Pro-Prolinal, known as potent inhibitor of prolyl endopeptidases, caused an activity decrease over 90 % for both peptidases.

Complete inhibition of Fvp27 was achieved with 40 % ethanol (EtOH) or methanol (MeOH), respectively. While, An-Pep showed a residual activity in 13 % at 40 % methanol, DMSO caused a slighter decrease of activity for both peptidases compared to the other tested solvents (Tab. 7-3).

7.3.4 Substrate specificity of Fvp27 and An-Pep

The activity of the purified enzyme Fvp27 and An-Pep (each 0.5 U/mL) were tested towards chromogenic substrates each (0.33 mM) at pH 5 (Z-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA, Z-Gly-Gly-Leu-pNA, Leu-pNA and Ala-pNA). For both peptidases no release of pNA was observed. The enzymes could not hydrolyze substrates lacking a terminal proline residue. For An-Pep it has also been reported by *Edens et al.* (2005) to cleave post Ala residues.

To see if the *Flammulina velutipes*-derived enzyme shows exo- or endo-peptidase activity, it was incubated with different peptides, such as Arg-Pro, Pro-Gly-Leu, oxidized insulin chain B and angiotensin I over 20 h at pH 5. The resulting peptides were detected with RP-HPLC or LC-MS/MS. The lack of analysis of free amino acids after the incubation of Arg-Pro and Pro-Gly-Leu determined no cleavage of the peptide bond neither with Fvp27, nor with An-Pep, which was confirmed by RP-HPLC experiments of the intact peptides after 20 h. Similar to the results from *Kubota et al.* (2005) oxidized insulin chain B (Phe-Val-Asn-Gln-His-Leu-Cys(SO₃H)-Gly-Ser-His-Leu-Val-Glu-Ala-Leu-Tyr-Leu-Val-Cys(SO₃H)-Gly-Glu-Arg-Gly-Phe-Phe-Tyr-Thr-Pro-Lys-Ala) were cleavage between -Pro-Lys- by Fvp27 and An-Pep, which was determined with RP-HPLC analysis. A second known natural substrate for the prolyl endopeptidase from *Aspergillus niger* the decapeptide angiotensin I (Ang I) (Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu, Mw 1296.5 Da) were used to confirm the hypothesis that Fvp27 is an endopeptidase (*Besedin & Rudenskaya*, 2003; *Garcia-Horsman et al.*, 2007). Ang I is a precursor of the vasoconstrictor Ang II, while the cleavage product of Ang I after treatment with prolyl endopeptidases, Angiotensin 1-7 (Ang 1-7) reduces mitogenicity, counteracts angiogenesis and act as vasodilator (*Welches et al.*, 1993; *Garcia-Horsman et al.*, 2007). Ang 1-7 (Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro, Mw 899.0 Da) was detected with LC-MS/MS after 20 h of incubation with Fvp27 (Fig. 7-4). As shown in Fig. 7-4, Ang I (retention time: 23 min) was complete hydrolyzed to Ang 1-7 (retention time: 20 min) with both prolyl endopeptidases. The identification was realized with two MRM transitions, Ang I *m/z*

325.0 [M+4H]⁴⁺ → *m/z* 110.0 and *m/z* 136.0 and for Ang 1-7 *m/z* 450.5 [M+2H]²⁺ → *m/z* 110.3 and *m/z* 116.1.

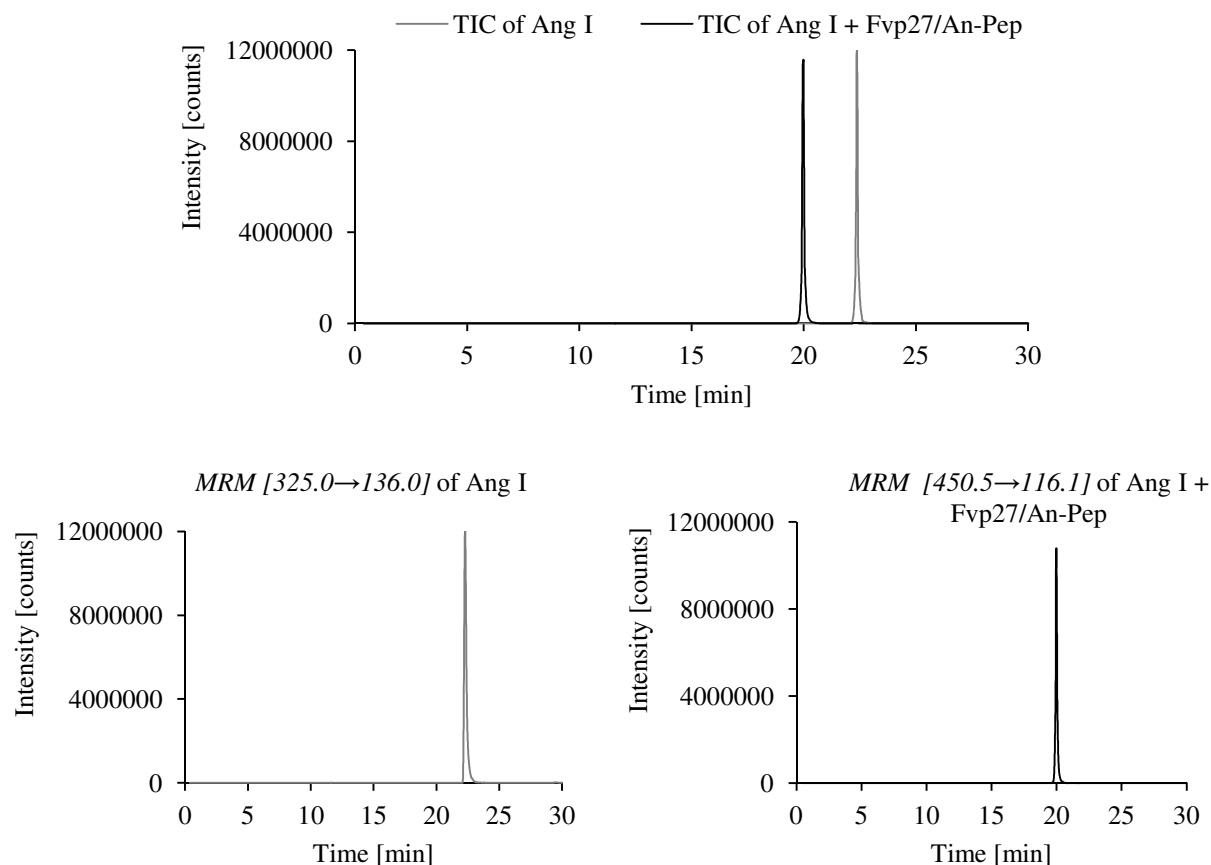


Fig. 7-4 | LC-MS/MS chromatograms of the hydrolysis of Angiotensin I (Ang I) (substrate blank in grey) with Fvp27 or An-Pep (0.5 U/L) after 20 h (black chromatogram), Total ion current (TIC) presented above and specified multiple reaction monitoring for the qualification of Ang I and the cleavage product Ang 1-7.

Hence, the research implied that the purified Fvp27 as well as the An-Pep are endopeptidases preferring larger substrates and internal proline residues. An-Pep (S28.004) and Fvp27 are unique in the serine peptidase family S28, because the enzymes showed endopeptidase activity, but shared more sequence homology with lysosomal Pro-X carboxypeptidase (S28.001) and dipeptidyl peptidase II (DPP-II, S28.002) than with prolyl oligopeptidases of the serine peptidase family S09. Both peptidases families, S09 and S28, have the same active site residues in the order Ser, Asp, His. The exo or endo-acting nature is not conserved in the primary amino acid sequence of the peptidases (*Edens et al.*, 2005), which explains why An-Pep and Fvp27 showed an endo substrate specificity unlike other peptidases of the S28 family with an exo specificity.

The eukaryotic DPP-II (S28.002) plays a role in the degradation of collagen, substance P and neuropeptides (Mentlein & Struckhoff, 1989). Leiting *et al.* (2003) proved with a experimental set using synthetic substrates, that DPP-II is most active on lysine or isoleucin in P2 and proline in P1 with a pH optimum of 5.7. The enzyme showed similarities to the dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) of the peptidase family S09, but DPP-IV (S09.003) had a much broader specificity in P2 and a higher pH optimum 7.8. Generally, a S09 peptidase interacts maximally with six amino acids residues at position P4, P3, P2 and P1 from the N-terminus and P1' and P2' from the C-terminus. Hydrophobic residues at P1' led to the highest reaction rates (Garcia-Horsman *et al.*, 2007). It is also known, that prolyl oligopeptidases cleave -Ala-X bonds. Sattar *et al.* (1990) and Yoshimoto *et al.* (1988) suggested that prolyl endopeptidases of basidiomycete origin have five extended substrate binding sites, S3, S2, S1, S1' and S2', which are involved in the binding and catalytic process, while also S2, S1, and S1' are highly stereospecific (Fig. 1-3). What limits enzyme specificity is the substrate accessibility to the proline-specific endoprotease activity site instead of the chain length specificity (Gass & Khosla, 2007). The prolyl oligopeptidase of the S09 peptidase family contains a peptidase domain and the catalytic triad is covered by the central tunnel of a seven-bladed β -propeller. This oscillating propeller makes the enzyme an oligopeptidase, while excluding large structured proteins from the active site to prevent proteolysis (Fülöp *et al.*, 2000; Szeltner *et al.*, 2004). In contrast, there has been no detailed structural description of S28 family beside the α/β -hydrolase domain (Soisson *et al.*, 2010).

Recently researchers found two similar bacterial prolyl endopeptidases from *Flavobacterium meningosepticum* and *Myxococcus xanthus*, which could degrade a 33-mer LQLQFPQPQLPY PQPQLPYPQPQLPYPQPQPF and PQPQLPYPQPQLP derived from α -gliadin that have been shown to play an immunodominant role, causing T-cell response to gluten in coeliac sprue (Shan *et al.*, 2004; Shan *et al.*, 2005). These epitopes are highly resistant to gastric, pancreatic peptidases and to digestion by intestinal brush border membrane peptidases. Shan *et al.* (2005) also identified analogous peptides from other subfamilies of gliadin proteins such as γ -gliadins and other families of grains such as barley and rye. The results showed that prolyl endopeptidases are able to hydrolyze complex substrates such as gluten and therefore have the possibility for treating coeliac sprue, while a more comprehensive understanding of the specificity of these enzymes may be needed.

In this study it was determined that Fvp27 is a prolyl endopeptidase capable of hydrolyzing not only oligopeptides but also proteins, like gliadin, gelatin (Fig. 7-1, A), myoglobin, casein, as also reported for An-Pep (Edens *et al.*, 2005; Kubota *et al.*, 2005). The RP-HPLC with a column analyzing intact peptides and proteins up to 70 kDa showed a release of small less hydrophobic peptides after 20 h for the α -gliadin hydrolysates with An-Pep and Fvp27 (Fig. 7-5). Gliadin (retention time from 15-20 min) was degraded, while new peaks from 2-15 min appeared in case of both peptidases.

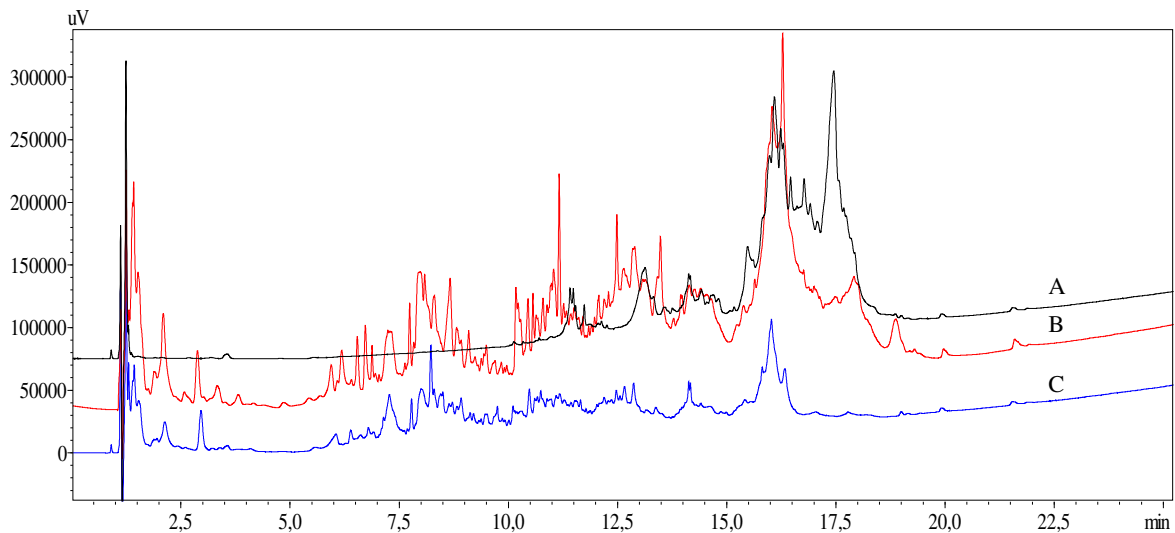


Fig. 7-5 | Chromatogram of α -gliadin hydrolysates analyzed by RP-HPLC using a Aeris C4 Widepore and UV-detection at 220 nm, (A) gliadin blank, (B) hydrolysate with An-Pep and (C) hydrolysate with Fvp27.

The exact cleavage sites were revealed by LC-MS (QTOF) (Fig. 7-6). Fvp27 and An-Pep hydrolyzed according to their specificity most of the $-Pro-X-$ bonds. In addition, a hydrolysis of the peptide bond between $-Ala-Leu-$ was observed for An-Pep. The same cleavage sites for An-Pep were reported by Stepniak *et al.* (2006). In addition, HPLC analysis with the Aeris Widepore column confirmed that An-Pep and Fvp27 also cleave β -casein, myoglobin and gluten into smaller hydrophilic peptides. The same results for An-Pep were obtained by Kang *et al.* (2013). Stepniak *et al.* (2006) postulated that a hydrolysis of gluten with An-Pep only is sufficient for the elimination of the majority of the toxic peptide sequences from gluten.



Fig. 7-6 | Cleavage sites of prolyl endopeptidases An-Pep (red) and Fvp27 (blue) in α -gliadin from *Triticum aestivum*, (gil 21932416) analyzed with LC-MS (QTOF).

Also *Tanner et al.* (2014) confirmed that both the immunoreactivity and ELISA measurements of the key-epitopes were reduced to almost zero by a prolyl endopeptidase treatment of the gluten in beer. Using these peptidases with acidic pH-optimum as food supplement seems to be a potential strategy for celiac disease patients. They also mentioned that the effect cannot be definitively assessed until all epitopes involved have been defined (*Tanner et al.*, 2014; *Toft-Hansen et al.*, 2014).

Beside the unique property of hydrolyzing large proline containing peptides, this study demonstrated high biochemical similarities between the novel purified extracellular peptidase from *Flammulina velutipes* (Fvp27) and *Aspergillus niger* (An-Pep). With its acidic pH optimum, Fvp27 has an essential advantage over the prolyl endopeptidases of the S09 family with a neutral or basic pH optimum and might be a new tool for food processing and for the production of peptides used in biomedical applications or as therapeutic target.

8 **Ausblick**

Die in dieser Arbeit erzielten wissenschaftlichen Erkenntnisse verdeutlichen die Komplexität der enzymatischen Proteinhydrolyse mittels Mischungen aus Exo- und Endopeptidasen und eröffnen neue Möglichkeiten und Perspektiven zur industriellen Anwendung.

Im Zuge der Prozessoptimierung sind weiterführende Arbeiten zum Einsatz der Elektrodialyse für die enzymatische Hydrolyse von Weizengluten denkbar. So könnte beispielsweise ein *Upscaling* vom Labormaßstab auf industrielles Niveau verbunden mit der Erhöhung der Anzahl an Membranen und deren Oberfläche realisiert werden. Außerdem könnte Interesse bestehen, die Elektrodialyse zum Zweck der Minimierung der Produktinhibierung für andere Proteine wie Casein, Sojaprotein oder Lysozym anzuwenden. Hierbei kann zudem als Nebeneffekt die gezielte Gewinnung von geschmacksaktiven oder biofunktionellen Peptiden verfolgt werden.

Auf der Basis der vorliegenden Daten wäre eine Aufreinigung der einzelnen Peptidasen aus dem Überstand einer Submerskultur von *Flammulina velutipes* und eine anschließende heterologe Expression in *Escherichia coli* oder *Pichia pastoris* denkbar. Insbesondere Analysen hinsichtlich der biochemischen Parameter einzelner Peptidasen aus *Flammulina velutipes* und Peptidasen aus Flavourzyme sind von wissenschaftlichem Interesse, um die genaue Funktion und Spaltspezifität der jeweiligen Peptidasen im Weizengluten näher beurteilen und die einzelnen Aktivitäten effizient miteinander kombinieren zu können. Für eine ausführliche Charakterisierung der Weizenglutenhydrolysate, z. B. hinsichtlich der Freisetzung geschmacksaktiver Substanzen sowie hinsichtlich einer gesteigerten Hydrolyseeffizienz, bietet sich die zeitverzögerte und genau terminierte Zugabe einzelner Peptidasen, gegebenenfalls in verschiedenen Kombinationen an.

Neuere Arbeiten zeigen, dass vor allem prolylspezifische Peptidasen wie Fvp27 oder An-Pep eine zentrale Rolle spielen, um prolinreiche Substrate wie Weizengluten effektiv und allergenminimierend zu hydrolysieren. Basidiomyceten zeigen ein überaus großes Potenzial zur extrazellulären Freisetzung derartiger Enzyme, weshalb sich in weiterführenden Arbeiten ein Screening in verschiedenen Kulturmedien anschließen könnte. Letztendlich könnten sich zukünftige Projekte auch mit biotechnologischen oder medizinischen Applikationsstudien dieser Enzymklasse befassen.

9 Literaturverzeichnis

- 27.05.1998. Leitsätzen für Gewürze und andere würzende Zutaten. *Deutschen Lebensmittelbuch*
- 1881/2006, V. E. N., (19. Dezember 2006). Verordnung Festsetzung der Höchstgehalte für bestimmte Kontaminanten in Lebensmitteln. *Europäische Kommission*.
- Aaslyng, M. D., Poll, L., Nielsen, P. M., & Flyge, H., (1999). Sensory, chemical and sensorimetric studies of hydrolyzed vegetable protein produced by various processes. *European Food Research and Technology*, 209(3-4), 227-236.
- Abraham, L. D., & Breuil, C., (1995). Factors affecting autolysis of a subtilisin-like serine proteinase secreted by *Ophiostoma piceae* and identification of the cleavage site. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1245(1), 76-84.
- Adamson, N., & Reynolds, E., (1997). Rules relating electrophoretic mobility, charge and molecular size of peptides and proteins. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 699(1), 133-147.
- Adler-Nissen, J., (1976). Enzymic hydrolysis of proteins for increased solubility. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 24(6), 1090-1093.
- Adler-Nissen, J., (1986). Enzymic hydrolysis of food proteins. *Elsevier Applied Science Publishers, Barking, Essex*.
- Adler-Nissen, J., (1986). Some fundamental aspects of food protein hydrolysis. *Enzymatic Hydrolysis of Food Proteins*, 9-24.
- Adu-Amankwa, B., & Constantinides, A., (1984). Mathematical modeling of diffusion and reaction in the hydrolysis of vegetable protein in an immobilized enzyme recycle reactor. *Biotechnology and Bioengineering*, 26(2), 156-166.
- Alfaro, M., Oguiza, J. A., Ramírez, L., & Pisabarro, A. G., (2014). Comparative analysis of secretomes in basidiomycete fungi. *Journal of Proteomics*, 102(0), 28-43.
- Andrews, P. C., Hines, C. M., & Dixon, J. E., (1980). Characterization of proline endopeptidase from rat brain. *Biochemistry*, 19(24), 5494-5500.
- Apar, D. K., & Ozbek, B., (2010). Corn gluten hydrolysis by alcalase: kinetics of hydrolysis. *Chemical Engineering Communications*, 197(7), 963-973.
- Arai, S., Yamashita, M., & Fujimaki, M., (1972). Glutamyl oligopeptides as factors responsible for tastes of a proteinase-modified soybean protein. *Agricultural and Biological Chemistry*.
- Bacon, F., (1965). On the nature of allosteric transitions: a plausible model. *Journal of Molecular Biology*, 12(1-2), 88-118.
- Bajorath, J., Saenger, W., & Pal, G. P., (1988). Autolysis and inhibition of proteinase K, a subtilisin-related serine proteinase isolated from the fungus *Tritirachium album Limber*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 954(0), 176-182.
- Barrett, A. J., Woessner, J. F., & Rawlings, N. D., (2004). Handbook of proteolytic enzymes (Vol. 1). *Elsevier, London*.
- Baumeister, W., Walz, J., Zühl, F., & Seemüller, E., (1998). The Proteasome: Paradigm of a Self-Compartmentalizing Protease. *Cell*, 92(3), 367-380.

- Bazinet, L., DeGrandpré, Y., & Porter, A., (2005). Electromigration of tobacco polyphenols. *Separation and Purification Technology*, 41(1), 101-107.
- Bazinet, L., Lamarche, F., & Ippersiel, D., (1998). Bipolar-membrane electro dialysis: Applications of electro dialysis in the food industry. *Trends in food science & technology*, 9(3), 107-113.
- Becker, B., & Hölper, I., (1996). Magginalien von A bis Z. *Maggi, Hauptabt. Presse-und Öffentlichkeitsarbeit, Nestlé*.
- Belitz, H.-D., Belitz, H.-D., Grosch, W., & Schieberle, P., (2001). Lehrbuch der Lebensmittelchemie. *Springer, Berlin*.
- Berends, P., Appel, D., Eisele, T., Rabe, S., & Fischer, L., (2014). Performance of enzymatic wheat gluten hydrolysis in batch and continuous processes using Flavourzyme. *LWT-Food Science and Technology*, 58(2), 534-540.
- Besedin, D., & Rudenskaya, G., (2003). Proline-specific endopeptidases. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 29(1), 1-17.
- Bisswanger, H. (2000). Reversible Enzymreaktionen. *Enzymkinetik*, pp. 81-83. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.
- Blundell, T., Sibanda, B., Sternberg, M., & Thornton, J., (1987). Knowledge-based prediction of protein structures. *Nature*, 326, 26.
- Bommarius, A. S., & Riebel-Bommarius, B. R., (2004). Biocatalysis: fundamentals and applications. *Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim*.
- Braxton, S., & Wells, J. A., (1992). Incorporation of a stabilizing calcium-binding loop into subtilisin BPN'. *Biochemistry*, 31(34), 7796-7801.
- Breitling-Utzmann. (2002). 3-MCPD – Untersuchungen in Lebensmitteln. *BLC - Bundesverband der Lebensmittelchemiker/-innen im öffentlichen Dienst e.V., Stuttgart*.
- Britton, H. T. S., & Robinson, R. A., (1931). Universal buffer solutions and the dissociation constant of veronal. *Journal of the Chemical Society (Resumed)*, 1456-1462.
- Cabrera-Padilla, R. Y., Pinto, G. A., Giordano, R. L. C., & Giordano, R. C., (2009). A new conception of enzymatic membrane reactor for the production of whey hydrolysates with low contents of phenylalanine. *Process Biochemistry*, 44(3), 269-276.
- Caputo, I., Lepretti, M., Martucciello, S., & Esposito, C., (2010). Enzymatic strategies to detoxify gluten: implications for celiac disease. *Enzyme research*, 2010.
- Catassi, C., & Fasano, A. (2008). 1 - Celiac disease. E. K. Arendt & F. D. Bello Eds., *Gluten-Free Cereal Products and Beverages*, pp. 1-I. Academic Press, San Diego.
- Changeux, J.-P., (1961). The Feedback Control Mechanism of Biosynthetic L-Threonine Deaminase by L-Isoleucine. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 26, 313-318.
- Chao, J., Chao, L., & Margolius, H. S., (1984). Identification of a kallikrein-like latent serine protease in human erythrocyte membranes. *Biochemical and biophysical research communications*, 121(2), 722-729.
- Cheison, S. C., Wang, Z., & Xu, S.-Y., (2006). Hydrolysis of whey protein isolate in a tangential flow filter membrane reactor: I. Characterisation of permeate flux and product recovery by multivariate data analysis. *Journal of Membrane Science*, 283(1-2), 45-56.

- Chen, J.-T., Chao, M.-L., Wen, C.-Y., & Chu, W.-S., (2012). Screening, purification, and characterization of an extracellular prolyl oligopeptidase from *Coprinopsis clastophylla*. *Journal of Microbiology*, 50(4), 652-659.
- Chigurupati, S. R., Parekh, K. G., & May, W. A., (2001). Method for producing a savory flavor base. *United States Patent, US6251443 B1*.
- Chmiel, H., Friedle, J., Schroeder, T., Schuldt, S., Winkelkemper, T., & Schembecker, G. (2011). Aufarbeitung (Downstream Processing). H. Chmiel Ed., Bioprozesstechnik, pp. 295-372. Spektrum Akademischer Verlag.
- Clemente, A., (2000). Enzymatic protein hydrolysates in human nutrition. *Trends in food science & technology*, 11(7), 254-262.
- Collier, P., Cromie, D., & Davies, A., (1991). Mechanism of formation of chloropropanols present in protein hydrolysates. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 68(10), 785-790.
- Constantinides, A., & Adu-Amankwa, B., (1980). Enzymatic modification of vegetable protein: Mechanism, kinetics, and production of soluble and partially soluble protein in a batch reactor. *Biotechnology and Bioengineering*, 22(8), 1543-1565.
- Cui, J., Kong, X., Hua, Y., Zhou, H., & Liu, Q., (2011). Continuous hydrolysis of modified wheat gluten in an enzymatic membrane reactor. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91(15), 2799-2805.
- Day, L., Augustin, M., Batey, I., & Wrigley, C., (2006). Wheat-gluten uses and industry needs. *Trends in food science & technology*, 17(2), 82-90.
- Doumas, A., van den Broek, P., Affolter, M., & Monod, M., (1998). Characterization of the prolyl dipeptidyl peptidase gene (dppIV) from the koji mold *Aspergillus oryzae*. *Applied and environmental microbiology*, 64(12), 4809-4815.
- Doyen, A., Beaulieu, L., Saucier, L., Pouliot, Y., & Bazinet, L., (2011). Impact of Ultrafiltration Membrane Material on Peptide Separation from a Snow Crab Byproduct Hydrolysate by Electrodialysis with Ultrafiltration Membranes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(5), 1784-1792.
- Doyen, A., Husson, E., & Bazinet, L., (2013). Use of an electro-dialytic reactor for the simultaneous β -lactoglobulin enzymatic hydrolysis and fractionation of generated bioactive peptides. *Food Chemistry*.
- Dunkel, A., Köster, J., & Hofmann, T., (2007). Molecular and sensory characterization of γ -glutamyl peptides as key contributors to the kokumi taste of edible beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(16), 6712-6719.
- Dunn, B. M. (2001). Overview of Pepsin-like Aspartic Peptidases. *Current Protocols in Protein Science*. John Wiley & Sons, Inc.
- Dürschmidt, P., Mansfeld, J., & Ulbrich-Hofmann, R., (2010). Refolding of the non-specific neutral protease from *Bacillus stearothermophilus* proceeds via an autoproteolytically sensitive intermediate. *Biophysical Chemistry*, 147(1-2), 66-73.
- Edens, L., Dekker, P., Van Der Hoeven, R., Deen, F., de Roos, A., & Floris, R., (2005). Extracellular prolyl endoprotease from *Aspergillus niger* and its use in the debittering of protein hydrolysates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(20), 7950-7957.

- Edens, L., Schuurhuizen, P., & Simonetti, A. L. M., (2002). Method for producing a protein hydrolysate. *United States Patent, US6372282 B1*.
- Ehren, J., Morón, B., Martin, E., Bethune, M. T., Gray, G. M., & Khosla, C., (2009). A food-grade enzyme preparation with modest gluten detoxification properties. *PLoS one*, 4(7), e6313.
- Eisele, Linke, Nimtz, & Berger. (2011). Heterologous expression, refolding and characterization of a salt activated subtilase from *Pleurotus ostreatus*. *Process Biochemistry*, 46(9), 1840-1846.
- Eisele, N., Linke, D., Bitzer, K., Na'amnieh, S., Nimtz, M., & Berger, R. G., (2011). The first characterized asparaginase from a basidiomycete, *Flammulina velutipes*. *Bioresour. Technol.*, 102(3), 3316-3321.
- El-Baky, H. A., Linke, D., Nimtz, M., & Berger, R. G. n., (2011). PsoP1, a milk-clotting aspartic peptidase from the Basidiomycete fungus *Piptoporus soloniensis*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(18), 10311-10316.
- Fayle, S. E., & Gerrard, J. A., (2002). The Maillard Reaction (Vol. 5). *Royal Society of Chemistry, Cambridge*.
- Firdaus, L., Dhulster, P., Amiot, J., Doyen, A., Lutin, F., Vézina, L.-P., & Bazinet, L., (2010). Investigation of the large-scale bioseparation of an antihypertensive peptide from alfalfa white protein hydrolysate by an electromembrane process. *Journal of Membrane Science*, 355(1-2), 175-181.
- FitzGerald, R., & O'cuinn, G., (2006). Enzymatic debittering of food protein hydrolysates. *Biotechnology advances*, 24(2), 234-237.
- Flores, M., & Toldrá, F., (2011). Microbial enzymatic activities for improved fermented meats. *Trends in food science & technology*, 22(2), 81-90.
- Fujimura, S., Oshikawa, K., Terada, S., & Kimoto, E., (2000). Primary structure and autolysis of brevilysin H6 from the venom of *Gloydius halys brevicaudus*. *Journal of biochemistry*, 128(2), 167-173.
- Fukushima, M., Ohashi, T., Fujiwara, Y., Sonoyama, K., & Nakano, M., (2001). Cholesterol-lowering effects of maitake (*Grifola frondosa*) fiber, shiitake (*Lentinus edodes*) fiber, and enokitake (*Flammulina velutipes*) fiber in rats. *Experimental Biology and Medicine*, 226(8), 758-765.
- Fülöp, V., Böcskei, Z., & Polgár, L., (1998). Prolyl Oligopeptidase: An Unusual β -Propeller Domain Regulates Proteolysis. *Cell*, 94(2), 161-170.
- Fülöp, V., Szeltner, Z., & Polgár, L., (2000). Catalysis of serine oligopeptidases is controlled by a gating filter mechanism. *EMBO reports*, 1(3), 277-281.
- Gänzle, M. G., Loponen, J., & Gobbetti, M., (2008). Proteolysis in sourdough fermentations: mechanisms and potential for improved bread quality. *Trends in food science & technology*, 19(10), 513-521.
- Garcia-Horsman, J., Männistö, P., & Venäläinen, J., (2007). On the role of prolyl oligopeptidase in health and disease. *Neuropeptides*, 41(1), 1-24.
- Gass, J., & Khosla, C., (2007). Prolyl endopeptidases. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 64(3), 345-355.
- Geha, R. S., Beiser, A., Ren, C., Patterson, R., Greenberger, P. A., Grammer, L. C., Ditto, A. M., Harris, K. E., Shaughnessy, M. A., & Yarnold, P. R., (2000). Review of alleged

- reaction to monosodium glutamate and outcome of a multicenter double-blind placebo-controlled study. *The Journal of nutrition*, 130(4), 1058S-1062S.
- Ghyselbrecht, K., Huygebaert, M., Van der Bruggen, B., Ballet, R., Meesschaert, B., & Pinoy, L., (2013). Desalination of an industrial saline water with conventional and bipolar membrane electrodialysis. *Desalination*, 318, 9-18.
- Giesler, L., Linke, D., & Berger, R. G., (2014). Factors Limiting the Enzymatic Hydrolysis of Wheat Gluten. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(20), 4762-4768.
- Giesler, L., Linke, D., Rabe, S., Appel, D., & Berger, R. G., (2013). Hydrolysis of wheat gluten by combining peptidases of *Flammulina velutipes* and electrodialysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(36), 8641-8649.
- Gonçalves, F., Fernandes, C., Cameira dos Santos, P., & de Pinho, M. N., (2003). Wine tartaric stabilization by electrodialysis and its assessment by the saturation temperature. *Journal of Food Engineering*, 59(2-3), 229-235.
- Goptar, I. A., Shagin, D. A., Shagina, I. A., Mudrik, E. S., Smirnova, Y. A., Zhuzhikov, D. P., Belozersky, M. A., Dunaevsky, Y. E., Oppert, B., Filippova, I. Y., & Elpidina, E. N., (2013). A digestive prolyl carboxypeptidase in *Tenebrio molitor* larvae. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 43(6), 501-509.
- Graveland, A., (1988). Struktur und funktionelle Eigenschaften von Gluteninen. *Getreide Mehl und Brot*, 42.
- Grimrath, Berends, Rabe, Berger, & Linke. (2011). Koji fermentation based on extracellular peptidases of *Flammulina velutipes*. *European Food Research and Technology*, 232(3), 415-424.
- Grimrath, A., (2011). Neue Peptidasen aus Basidiomyceten zur Glutenhydrolyse. *Leibniz Universität Hannover, Dissertation*.
- Guerard, F., Guimas, L., & Binet, A., (2002). Production of tuna waste hydrolysates by a commercial neutral protease preparation. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 19-20(0), 489-498.
- Gupta, R., Beg, Q., & Lorenz, P., (2002). Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 59(1), 15-32.
- Hamlet, C., Sadd, P., Crews, C., Velíšek, J., & Baxter, D., (2002). Occurrence of 3-chloropropane-1, 2-diol (3-MCPD) and related compounds in foods: a review. *Food Additives & Contaminants*, 19(7), 619-631.
- Hansen, H. K., Ottosen, L. M., Kliem, B. K., & Villumsen, A., (1997). Electrodialytic remediation of soils polluted with Cu, Cr, Hg, Pb and Zn. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 70(1), 67-73.
- Haque, T. S., Little, J. C., & Gellman, S. H., (1996). Stereochemical Requirements for β -Hairpin Formation: Model Studies with Four-Residue Peptides and Depsipeptides. *Journal of the American Chemical Society*, 118(29), 6975-6985.
- Hardt, N. A., Janssen, A. E. M., Boom, R. M., & van der Goot, A. J., (2014). Factors impeding enzymatic wheat gluten hydrolysis at high solid concentrations. *Biotechnology and Bioengineering*, 111(7), 1304-1312.
- Hardwick, J. E., & Glatz, C. E., (1989). Enzymic hydrolysis of corn gluten meal. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 37(4), 1188-1192.

- Hiemstra, P., (2002). Novel roles of protease inhibitors in infection and inflammation. *Biochemical Society Transactions*, 30(2), 116-119.
- Hiwatashi, K., Hori, K., Takahashi, K., Kagaya, A., Inoue, S., Sugiyama, T., & Takahashi, S., (2004). Purification and characterization of a novel prolyl aminopeptidase from Maitake (*Grifola frondosa*). *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 68(6), 1395-1397.
- Huang, C., Xu, T., Zhang, Y., Xue, Y., & Chen, G., (2007). Application of electro dialysis to the production of organic acids: state-of-the-art and recent developments. *Journal of Membrane Science*, 288(1), 1-12.
- Hyslop, D. (2003). Enzymatic coagulation of milk. *Advanced Dairy Chemistry—1 Proteins*, pp. 839-878. Springer.
- Ikeda, K., (1908). A production method of seasoning mainly consists of salt of L-glutamic acid. *Japanese patent*, 14805.
- Iketani, A., Nakamura, M., Suzuki, Y., Awai, K., & Shioi, Y., (2013). A novel serine protease with caspase-and legumain-like activities from edible basidiomycete *Flammulina velutipes*. *Fungal biology*, 117(3), 173-181.
- Ishibashi, N., Arita, Y., Kanehisa, H., Kouge, K., OKAI, H., & Fukui, S., (1987). Bitterness of leucine-containing peptides. *Agricultural and Biological Chemistry*, 51(9), 2389-2394.
- Ishibashi, N., Sadamori, K., Yamamoto, O., Kanehisa, H., Kouge, K., Kikuchi, E., Okai, H., & Fukui, S., (1987). Bitterness of Phenylalanine-and Tyrosine-containing Peptides (Food & Nutrition). *Agricultural and Biological Chemistry*, 51(12), 3309-3313.
- Iversen, S. L., & Jørgensen, M. H., (1995). Azocasein assay for alkaline protease in complex fermentation broth. *Biotechnology Techniques*, 9(8), 573-576.
- Jakubke, H.-D., & Jeschkeit, H., (1982). Aminosäuren, Peptide, Proteine. *Verlag Chemie, Weinheim*.
- Jegannathan, K. R., & Nielsen, P. H., (2013). Environmental assessment of enzyme use in industrial production—a literature review. *Journal of Cleaner Production*, 42, 228-240.
- Juárez-Montiel, M., Ibarra, J. A., Chávez-Camarillo, G., Hernández-Rodríguez, C., & Villa-Tanaca, L., (2014). Molecular Cloning and Heterologous Expression in *Pichia pastoris* of X-Prolyl-dipeptidyl Aminopeptidase from Basidiomycete *Ustilago maydis*. *Applied biochemistry and biotechnology*, 1-10.
- Kabay, N., Arar, Ö., Samatya, S., Yüksel, Ü., & Yüksel, M., (2008). Separation of fluoride from aqueous solution by electro dialysis: effect of process parameters and other ionic species. *Journal of hazardous materials*, 153(1), 107-113.
- Kalwant, S., & Porter, A. G., (1991). Purification and characterization of human brain prolyl endopeptidase. *Biochem. J*, 276, 237-244.
- Kanatani, A., Yoshimoto, T., Kitazono, A., Kokubo, T., & Tsaru, D., (1993). Prolyl endopeptidase from *Aeromonas hydrophila*: cloning, sequencing, and expression of the enzyme gene, and characterization of the expressed enzyme. *Journal of biochemistry*, 113(6), 790-796.
- Kaneko, S., Kumazawa, K., & Nishimura, O., (2010). Isolation and identification of the umami enhancing compounds in Japanese soy sauce. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 75(7), 1275-1282.

- Kang, C., Yu, X.-W., & Xu, Y., (2013). Gene cloning and enzymatic characterization of an endoprotease Endo-Pro-*Aspergillus niger*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 1-10.
- Kang, C., Yu, X.-W., & Xu, Y., (2014). Purification and characterization of a prolyl endopeptidase isolated from *Aspergillus oryzae*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 41(1), 49-55.
- KÁŠ, L. F., (1984). The role of active and inactivated papain in beer chillproofing. *Journal of the Institute of Brewing*, 90(4), 247-249.
- Kasarda, D. D., (2013). Can an Increase in Celiac Disease Be Attributed to an Increase in the Gluten Content of Wheat as a Consequence of Wheat Breeding? *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(6), 1155-1159.
- Keller, K.-M., (2003). Klinische Symptomatik:"Zöliakie, ein Eisberg". *Monatsschrift Kinderheilkunde*, 151(7), 706-714.
- Kenny, A. (1999). Introduction: Nomenclature and classes of peptidases. *Proteolytic Enzymes*, pp. 1-8. Springer.
- Khan, A. R., & James, M. N., (1998). Molecular mechanisms for the conversion of zymogens to active proteolytic enzymes. *Protein Science*, 7(4), 815-836.
- Khatkar, B. S., Fido, R. J., Tatham, A. S., & Schofield, J. D., (2002). Functional Properties of Wheat Gliadins. I. Effects on Mixing Characteristics and Bread Making Quality. *Journal of Cereal Science*, 35(3), 299-306.
- Kobayashi, T., Abe, K., Asai, K., Gomi, K., Juvvadi, P. R., Kato, M., Kitamoto, K., Takeuchi, M., & Machida, M., (2007). Genomics of *Aspergillus oryzae*. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*(0), 0702090305.
- Kong, X., Zhou, H., & Qian, H., (2007). Enzymatic hydrolysis of wheat gluten by proteases and properties of the resulting hydrolysates. *Food Chemistry*, 102(3), 759-763.
- Koo, S. H., Bae, I. Y., Lee, S., Lee, D.-H., Hur, B.-S., & Lee, H. G., (2011). Evaluation of wheat gluten hydrolysates as taste-active compounds with antioxidant activity. *Journal of Food Science and Technology*, 1-8.
- Kratzer, W., Kibele, M., Akinli, A., Porzner, M., Boehm, B. O., Koenig, W., Oeztuerk, S., Mason, R. A., Mao, R., & Haenle, M. H., (2013). Prevalence of celiac disease in Germany: A prospective follow-up study. *World journal of gastroenterology: WJG*, 19(17), 2612.
- Kubota, K., Tanokura, M., & Takahashi, K., (2005). Purification and characterization of a novel prolyl endopeptidase from *Aspergillus niger*. *Proceedings of the Japan Academy. Series B Physical and biological sciences*, 81(10), 447-453.
- Kumar, M., Tripathi, B. P., & Shahi, V. K., (2009). Electro-membrane process for the separation of amino acids by iso-electric focusing. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 85(5), 648-657.
- Kuwabara, T., (1992). Characterization of a prolyl endopeptidase from spinach thylakoids. *FEBS letters*, 300(2), 127-130.
- Kwok, R. H. M., (1968). Chinese-restaurant syndrome. *N Engl J Med*, 278(20), 796.
- Labbé, D., Araya-Farias, M., Tremblay, A., & Bazinet, L., (2005). Electromigration feasibility of green tea catechins. *Journal of Membrane Science*, 254(1-2), 101-109.
- Lacey, R., Lang, E., & Huffman, E., (1963). Economics of Demineralization by Electrodialysis. *Advances in Chemistry Series*, 38, 168.

- Laemmli, U. K., (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680-685.
- Lee, S. E., Chung, H., & Kim, Y.-S., (2012). Effects of enzymatic modification of wheat protein on the formation of pyrazines and other volatile components in the Maillard reaction. *Food Chemistry*, 131(4), 1248-1254.
- Leiting, B., Pryor, K. D., Wu, J. K., Marsilio, F., Patel, R. A., Craik, C. S., Ellman, J. A., Cummings, R. T., & Thornberry, N. A., (2003). Catalytic properties and inhibition of proline-specific dipeptidyl peptidases II, IV and VII. *Biochem. J.*, 371(2), 525-532.
- Li, N., Wu, J.-M., Zhang, L.-F., Zhang, Y.-Z., & Feng, H., (2010). Characterization of a unique proline iminopeptidase from white-rot basidiomycetes *Phanerochaete chrysosporium*. *Biochimie*, 92(7), 779-788.
- Li, Q., Yi, L., Marek, P., & Iverson, B. L., (2013). Commercial proteases: Present and future. *FEBS letters*, 587(8), 1155-1163.
- Li, X., Staszewski, L., Xu, H., Durick, K., Zoller, M., & Adler, E., (2002). Human receptors for sweet and umami taste. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(7), 4692-4696.
- Liang, Y., Pan, L., & Lin, Y., (2009). Analysis of extracellular proteins of *Aspergillus oryzae* grown on soy sauce koji. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*(0), 0812271225.
- Liaset, B., Julshamn, K., & Espe, M., (2003). Chemical composition and theoretical nutritional evaluation of the produced fractions from enzymic hydrolysis of salmon frames with Protamex™. *Process Biochemistry*, 38(12), 1747-1759.
- Löliger, J., (2000). Function and importance of glutamate for savory foods. *The Journal of nutrition*, 130(4), 915S-920S.
- Lopez, M., & Edens, L., (2005). Effective prevention of chill-haze in beer using an acid proline-specific endoprotease from *Aspergillus niger*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(20), 7944-7949.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J., (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193(1), 265-275.
- Lüttge, U., Kluge, M., & Thiel, G., (2010). Botanik: die umfassende Biologie der Pflanzen. *Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim*.
- Lütz, S., Wandrey, C., & Rao, N., (2005). Membranen in der Biotechnologie. *Chemie Ingenieur Technik*, 77(11), 1669-1682.
- Machuga, E. J., & Ives, D. H., (1984). Isolation and characterization of an aminopeptidase from *Lactobacillus acidophilus* R-26. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 789(1), 26-36.
- Maes, M., Goossens, F., Scharpé, S., Calabrese, J., Desnyder, R., & Meltzer, H. Y., (1995). Alterations in plasma prolyl endopeptidase activity in depression, mania, and schizophrenia: effects of antidepressants, mood stabilizers, and antipsychotic drugs. *Psychiatry Research*, 58(3), 217-225.
- Maes, M., Goossens, F., Scharpé, S., Meltzer, H. Y., D'Hondt, P., & Cosyns, P., (1994). Lower serum prolyl endopeptidase enzyme activity in major depression: further evidence that peptidases play a role in the pathophysiology of depression. *Biological psychiatry*, 35(8), 545-552.

- Manley, C. H., & Ahmedi, S., (1995). The development of process flavors. *Trends in food science & technology*, 6(2), 46-51.
- Manning, P. D. V., (1950). Protein hydrolysis and recovery of glutamic acid. *United States Patent, US2505129 A*.
- Markland Jr, F. S., & Smith, E. L., (1971). 16 Subtilisins: Primary Structure, Chemical and Physical Properties. *The enzymes*, 3, 561-608.
- Martin, R. G., (1963). The first enzyme in histidine biosynthesis: the nature of feedback inhibition by histidine. *Journal of Biological Chemistry*, 238(1), 257-268.
- Matoba, T., & Hata, T., (1972). Relationship between bitterness of peptides and their chemical structures. *Agricultural and Biological Chemistry*.
- Melin, T., & Rautenbach, R., (2007). Membranverfahren. *Springer, Berlin*.
- Mentlein, R., & Struckhoff, G., (1989). Purification of Two Dipeptidyl Aminopeptidases II from Rat Brain and Their Action on Proline-Containing Neuropeptides. *Journal of neurochemistry*, 52(4), 1284-1293.
- Meyer, K. H., & Straus, W., (1940). La perméabilité des membranes VI. Sur le passage du courant électrique à travers des membranes sélectives. *Helvetica Chimica Acta*, 23(1), 795-800.
- Mitea, C., Havenaar, R., Drijfhout, J. W., Edens, L., Dekking, L., & Koning, F., (2008). Efficient degradation of gluten by a prolyl endoprotease in a gastrointestinal model: implications for coeliac disease. *Gut*, 57(1), 25-32.
- Mizuno, S., Nishimura, S., Matsuura, K., Gotou, T., & Yamamoto, N., (2004). Release of Short and Proline-Rich Antihypertensive Peptides from Casein Hydrolysate with an *Aspergillus oryzae* Protease. *Journal of Dairy science*, 87(10), 3183-3188.
- Mizutani, S., Sumi, S., Suzuki, O., Narita, O., & Tomoda, Y., (1984). Post-proline endopeptidase in human placenta. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 786(1), 113-117.
- Motoi, H., & Kodama, T., (2003). Isolation and characterization of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides from wheat gliadin hydrolysate. *Food/Nahrung*, 47(5), 354-358.
- Mutilangi, W. A. M., Panyam, D., & Kilara, A., (1995). Hydrolysates from Proteolysis of Heat-denatured Whey Proteins. *Journal of Food Science*, 60(5), 1104-1109.
- NÆS, H., Holck, A. L., Axelsson, L., Andersen, H. J., & Blom, H., (1994). Accelerated ripening of dry fermented sausage by addition of a *Lactobacillus* proteinase. *International Journal of Food Science & Technology*, 29(6), 651-659.
- Nchienza, H., Morawicki, R., & Gadang, V., (2010). Enzymatic hydrolysis of poultry meal with endo- and exopeptidases. *Poultry science*, 89(10), 2273-2280.
- Ney, K., (1971). Voraussage der Bitterkeit von Peptiden aus deren Aminosäurezusammensetzung. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung*, 147(2), 64-68.
- Nielsen, P. M., Petersen, D., & Dambmann, C., (2006). Improved method for determining food protein degree of hydrolysis. *Journal of Food Science*, 66(5), 642-646.
- Nijijima, A., (1991). Effects of oral and intestinal stimulation with umami substance on gastric vagus activity. *Physiology & behavior*, 49(5), 1025-1028.

- Noguchi, M., Arai, S., Yamashita, M., Kato, H., & Fujimaki, M., (1975). Isolation and identification of acidic oligopeptides occurring in a flavor potentiating fraction from a fish protein hydrolysate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 23(1), 49-53.
- Norris, R., Poyarkov, A., O'Keefe, M. B., & FitzGerald, R. J., (2014). Characterisation of the hydrolytic specificity of *Aspergillus niger* derived prolyl endoprotease on bovine β -casein and determination of ACE inhibitory activity. *Food Chemistry*, 156(0), 29-36.
- Nunes, S. P., & Peinemann, K.-V., (2006). Membrane technology: in the chemical industry. *Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim*.
- O'Leary, R. M., Gallagher, S. P., & O'Connor, B., (1996). Purification and characterization of a novel membrane-bound form of prolyl endopeptidase from bovine brain. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 28(4), 441-449.
- Oda, K., Kakizono, D., Yamada, O., Iefuji, H., Akita, O., & Iwashita, K., (2006). Proteomic analysis of extracellular proteins from *Aspergillus oryzae* grown under submerged and solid-state culture conditions. *Applied and environmental microbiology*, 72(5), 3448-3457.
- Ohlrogge, K., & Ebert, K., (2012). Membranen: Grundlagen, Verfahren und industrielle Anwendungen. *Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim*.
- Ottesen, M., & Svendsen, I., (1970). [11] The subtilisins. *Methods in enzymology*, 19, 199-215.
- Oyama, H., Aoki, H., Amano, M., Mizuki, E., Yoshimoto, T., Tsuru, D., & Murao, S., (1997). Purification and characterization of a prolyl endopeptidase from *Pseudomonas sp.* KU-22. *Journal of fermentation and bioengineering*, 84(6), 538-542.
- Park, S.-E., Li, M.-H., Kim, J.-S., Sapkota, K., Kim, J.-E., Choi, B.-S., Yoon, Y.-H., Lee, J.-C., Lee, H.-H., & Kim, C.-S., (2007). Purification and characterization of a fibrinolytic protease from a culture supernatant of *Flammulina velutipes* mycelia. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 71(9), 2214-2222.
- Pederson, R. A., White, H. A., Schlenzig, D., Pauly, R. P., McIntosh, C. H. S., & Demuth, H.-U., (1998). Improved Glucose Tolerance in Zucker Fatty Rats by Oral Administration of the Dipeptidyl Peptidase IV Inhibitor Isoleucine Thiazolidide. *Diabetes*, 47(8), 1253-1258.
- Petit, A., Barelli, H., Morain, P., & Checler, F., (2000). Novel proline endopeptidase inhibitors do not modify A β 40/42 formation and degradation by human cells expressing wild-type and Swedish mutated β -amyloid precursor protein. *British journal of pharmacology*, 130(7), 1613-1617.
- Pfleiderer, G., & Zwilling, R., (1972). Die molekulare Evolution proteolytischer Enzyme. *Naturwissenschaften*, 59(9), 396-405.
- Poulin, J.-F., Amiot, J., & Bazinet, L., (2006). Simultaneous separation of acid and basic bioactive peptides by electro dialysis with ultrafiltration membrane. *Journal of Biotechnology*, 123(3), 314-328.
- Poulin, J.-F., Amiot, J., & Bazinet, L., (2007). Improved peptide fractionation by electro dialysis with ultrafiltration membrane: Influence of ultrafiltration membrane stacking and electrical field strength. *Journal of Membrane Science*, 299(1-2), 83-90.
- Poulin, J.-F. o., Amiot, J., & Bazinet, L., (2007). Improved peptide fractionation by electro dialysis with ultrafiltration membrane: Influence of ultrafiltration membrane stacking and electrical field strength. *Journal of Membrane Science*, 299(1-2), 83-90.

- Prendergast, K., (1974). Protein hydrolysate-a review. *Food Trade Rev*, 44(1), 14.
- Quaglia, G., & Orban, E., (1987). Enzymic solubilisation of proteins of sardine (*Sardina pilchardus*) by commercial proteases. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 38(3), 263-269.
- Rao, M. B., Tanksale, A. M., Ghatge, M. S., & Deshpande, V. V., (1998). Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and molecular biology reviews*, 62(3), 597-635.
- Ravallec-Plé, R., Gilmartin, L., Van Wormhoudt, A., & Le Gal, Y., (2000). Influence of the hydrolysis process on the biological activities of protein hydrolysates from cod (*Gadus morhua*) muscle. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(15), 2176-2180.
- Raven, P. H., Evert, R. F., & Eichhorn, S. E., (2000). Biologie der Pflanzen. *Walter de Gruyter, Berlin*.
- Ravindran, V., & Son, J.-H., (2011). Feed enzyme technology: present status and future developments. *Recent patents on food, nutrition & agriculture*, 3(2), 102-109.
- Rawlings, N., Polgar, L., & Barrett, A., (1991). A new family of serine-type peptidases related to prolyl oligopeptidase. *Biochemical Journal*, 279(Pt 3), 907.
- Rawlings, N. D., Barrett, A. J., & Bateman, A., (2010). MEROPS: the peptidase database. *Nucleic acids research*, 38(suppl 1), D227-D233.
- Rawlings, N. D., Barrett, A. J., & Bateman, A., (2012). MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. *Nucleic acids research*, 40(D1), D343-D350.
- Readi, O. M. K., Mengers, H. J., Wiratha, W., Wessling, M., & Nijmeijer, K., (2011). On the isolation of single acidic amino acids for biorefinery applications using electrodialysis. *Journal of Membrane Science*, 384(384), 166-175.
- Riggle, H. M., & Fisher, M. A., (2009). Purification of a prolyl endopeptidase from *Aspergillus oryzae* and evaluation of its ability to digest gluten. In *Abstracts of Papers of the American Chemical Society* vol. 237): American Chemical Society, Washington, DC 20036 USA.
- Rios, G. M., Belleville, M. P., Paolucci, D., & Sanchez, J., (2004). Progress in enzymatic membrane reactors – a review. *Journal of Membrane Science*, 242(1–2), 189-196.
- Rogers, P. J., & Blundell, J. E., (1990). Umami and appetite: effects of monosodium glutamate on hunger and food intake in human subjects. *Physiology & behavior*, 48(6), 801-804.
- Rose, J. R., Salto, R., & Craik, C. S., (1993). Regulation of autoproteolysis of the HIV-1 and HIV-2 proteases with engineered amino acid substitutions. *Journal of Biological Chemistry*, 268(16), 11939-11945.
- Sadrzadeh, M., & Mohammadi, T., (2008). Sea water desalination using electrodialysis. *Desalination*, 221(1), 440-447.
- Saeki, K., Ozaki, K., Kobayashi, T., & Ito, S., (2007). Detergent alkaline proteases: enzymatic properties, genes, and crystal structures. *Journal of bioscience and bioengineering*, 103(6), 501-508.
- Sandeaux, J., Sandeaux, R., Gavach, C., Grib, H., Sadat, T., Belhocine, D., & Mameri, N., (1998). Extraction of amino acids from protein hydrolysates by electrodialysis. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 71(3), 267-273.

- Sattar, A. A., Yamamoto, N., Yoshimoto, T., & Tsuru, D., (1990). Purification and characterization of an extracellular prolyl endopeptidase from *Agaricus bispoms*. *Journal of biochemistry*, 107(2), 256-263.
- Schäfer, T., Borchert, T. W., Nielsen, V., Skagerlind, P., Gibson, K., Wenger, K., Hatzack, F., Nilsson, L., Salmon, S., Pedersen, S., Heldt-Hansen, H., Poulsen, P., Lund, H., Oxenbøll, K., Wu, G., Pedersen, H., & Xu, H. (2007). Industrial Enzymes. R. Ulber & D. Sell Eds., White Biotechnology, vol. 105 pp. 59-131. Springer Berlin Heidelberg.
- Schaumburg, H. H., Byck, R., Gerstl, R., & Mashman, J. H., (1969). Monosodium L-glutamate: its pharmacology and role in the Chinese restaurant syndrome. *Science*, 163(3869), 826-828.
- Schechter, I., & Berger, A., (1967). On the size of the active site in proteases. I. Papain. *Biochemical and biophysical research communications*, 27(2), 157-162.
- Schlichtherle-Cerny, H., & Amadò, R., (2002). Analysis of taste-active compounds in an enzymatic hydrolysate of deamidated wheat gluten. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(6), 1515-1522.
- Schwab, T., Wieser, H., & Koehler, P., (2012). Studies on the gluten-specific peptidase activity of germinated grains from different cereal species and cultivars. *European Food Research and Technology*, 235(6), 1161-1170.
- Shaffer, L., & Mintz, M., (1966). Electrodialysis. *Principles of Desalination, Academic Press, New York, London*, 200-289.
- Shan, L., Marti, T., Sollid, L., GRAY, G., & Khosla, C., (2004). Comparative biochemical analysis of three bacterial prolyl endopeptidases: implications for coeliac sprue. *Biochem. J*, 383, 311-318.
- Shan, L., Qiao, S.-W., Arentz-Hansen, H., Molberg, Ø., Gray, G. M., Sollid, L. M., & Khosla, C., (2005). Identification and analysis of multivalent proteolytically resistant peptides from gluten: implications for celiac sprue. *Journal of proteome research*, 4(5), 1732-1741.
- Soisson, S. M., Patel, S. B., Abeywickrema, P. D., Bryne, N. J., Diehl, R. E., Hall, D. L., Ford, R. E., Reid, J. C., Rickert, K. W., Shipman, J. M., Sharma, S., & Lumb, K. J., (2010). Structural definition and substrate specificity of the S28 protease family: the crystal structure of human prolylcarboxypeptidase. *BMC Struct. Biol.*, 10, No pp. given.
- Souissi, N., Bougatef, A., Triki-Ellouz, Y., & Nasri, M., (2007). Biochemical and functional properties of Sardinella (*Sardinella aurita*) by-product hydrolysates. *Food Technology and Biotechnology*, 45(2), 187.
- Sridhar, S., (1989). Elektrodialyse mit bipolaren Membranen. *Chemie Ingenieur Technik*, 61(5), 428-429.
- Steinhaus, P., & Schieberle, P., (2007). Characterization of the Key Aroma Compounds in Soy Sauce Using Approaches of Molecular Sensory Science. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(15), 6262-6269.
- Stepniak, D., Spaenij-Dekking, L., Mitea, C., Moester, M., de Ru, A., Baak-Pablo, R., van Veelen, P., Edens, L., & Koning, F., (2006). Highly efficient gluten degradation with a newly identified prolyl endoprotease: implications for celiac disease. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 291(4), G621-G629.

- Strathmann, H., & Chmiel, H., (1984). Die Elektrodialyse — ein Membranverfahren mit vielen Anwendungsmöglichkeiten. *Chemie Ingenieur Technik*, 56(3), 214-220.
- Stroud, R. M., Kossiakoff, A. A., & Chambers, J. L., (1977). Mechanisms of zymogen activation. *Annual review of biophysics and bioengineering*, 6(1), 177-193.
- Szeltner, Z., Rea, D., Juhász, T., Renner, V., Fülöp, V., & Polgár, L., (2004). Concerted Structural Changes in the Peptidase and the Propeller Domains of Prolyl Oligopeptidase are Required for Substrate Binding. *Journal of Molecular Biology*, 340(3), 627-637.
- Szwajcer-Dey, E., Rasmussen, J., Meldal, M., & Breddam, K., (1992). Proline-specific endopeptidases from microbial sources: isolation of an enzyme from a *Xanthomonas sp.* *Journal of bacteriology*, 174(8), 2454-2459.
- Tahaikt, M., Achary, I., Menkouchi Sahli, M., Amor, Z., Taky, M., Alami, A., Boughriba, A., Hafsi, M., & Elmidaoui, A., (2006). Defluoridation of Moroccan groundwater by electrodialysis: continuous operation. *Desalination*, 189(1), 215-220.
- Tanner, G. J., Colgrave, M. L., & Howitt, C. A., (2014). Gluten, celiac disease, and gluten intolerance and the impact of gluten minimization treatments with prolylendopeptidase on the measurement of gluten in beer. *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, 72(Copyright (C) 2014 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.), 36-50.
- Tatsumi, H., Ikegaya, K., Murakami, S., Kawabe, H., Nakano, E., & Motai, H., (1994). Elucidation of the thermal stability of the neutral proteinase II from *Aspergillus oryzae*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1208(1), 179-185.
- Thomas, D. W., MacAllister, R. V., & Niemann, C., (1951). The Kinetics of the α -Chymotrypsin Catalyzed Hydrolysis of Acetyl-L-tyrosinamide in Aqueous Solutions at 25°C and pH 7.8-8.01. *Journal of the American Chemical Society*, 73(4), 1548-1552.
- Toft-Hansen, H., Rasmussen, K. S., Staal, A., Roggen, E. L., Sollid, L. M., Lillevang, S. T., Barington, T., & Husby, S., (2014). Treatment of both native and deamidated gluten peptides with an endo-peptidase from *Aspergillus niger* prevents stimulation of gut-derived gluten-reactive T cells from either children or adults with celiac disease. *Clinical Immunology*.
- Tronc, J. S., Lamarche, F., & Makhlof, J., (1998). Effect of pH variation by electrodialysis on the inhibition of enzymatic browning in cloudy apple juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(3), 829-833.
- Tsugita, A., & Scheffler, J.-J., (1982). A rapid method for acid hydrolysis of protein with a mixture of trifluoroacetic acid and hydrochloric acid. *European Journal of Biochemistry*, 124(3), 585-588.
- Van Den Burg, B., & Eijssink, V., (2004). Thermolysin and related *Bacillus* metallopeptidases. *Handbook of proteolytic enzymes*, 2, 374-387.
- Van den Oord, A. H., & Van Wassenaar, P. D., (1997). Umami peptides: assessment of their alleged taste properties. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und-Forschung A*, 205(2), 125-130.
- Van Der Borgh, A., Goesart, H., Veraverbeke, W. S., & Delcour, J. A., (2005). Fractionation of wheat and wheat flour into starch and gluten: overview of the main processes and the factors involved. *Journal of Cereal Science*, 41(3), 221-237.

- Vera, E., Ruales, J., Dornier, M., Sandeaux, J., Sandeaux, R., & Pourcelly, G., (2003). Deacidification of clarified passion fruit juice using different configurations of electro dialysis. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 78(8), 918-925.
- Volckman, O., (1963). Operating Experience on a Large Scale Electro dialysis Water-Demineralization Plant. *Advances in Chemistry Series*, 38, 133.
- Von Berg, A., Filipiak-Pittroff, B., Krämer, U., Link, E., Heinrich, J., Koletzko, S., Grübl, A., Hoffmann, U., Beckmann, C., & Reinhardt, D., (2012). Die German Infant Nutritional Intervention Study (GINI) zur präventiven Wirkung von Hydrolysatnahrungen bei Kindern mit Allergierisiko. Design und ausgewählte Ergebnisse. *Allergologie*, 35(1), 32-43.
- Walter, R., Shlank, H., Glass, J., Schwartz, I., & Kerenyi, T., (1971). Leucylglycinamide released from oxytocin by human uterine enzyme. *Science*, 173(3999), 827-829.
- Walter, R., Simmons, W. H., & Yoshimoto, T., (1980). Proline specific endo-and exopeptidases. *Molecular and cellular biochemistry*, 30(2), 111-127.
- Walter, T., Wieser, H., & Koehler, P., (2013). 4.7 Studies on the degradation of gluten with peptidases from different sources. *WORKING GROUP on PROLAMIN ANALYSIS and TOXICITY*, 59.
- Walter, T., Wieser, H., & Köhler, P., Enzymatischer Abbau von Gluten in Weizenstärke. *Hans-Dieter-Belitz-Institut für Mehl- und Eiweißforschung*, <http://www.hdbi.de/Dzoeliakie.html>.
- Walz, F., Wieser, H., & Stern, M., (1996). *In vitro* Hydrolysis of Gliadin and Casein Peptides: Secondary Defect in Coeliac Disease Shown by Organ Culture. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 31(3), 240-246.
- Wang, J.-s., Wei, Z.-y., Li, L., Bian, K., & Zhao, M.-m., (2009). Characteristics of enzymatic hydrolysis of thermal-treated wheat gluten. *Journal of Cereal Science*, 50(2), 205-209.
- Wang, J.-s., Zhao, M.-m., Zhao, Q.-z., & Jiang, Y.-m., (2007). Antioxidant properties of papain hydrolysates of wheat gluten in different oxidation systems. *Food Chemistry*, 101(4), 1658-1663.
- Wang, M.-X., Zhong, C., Cai, Q.-F., Liu, G.-M., Zhang, L., Hara, K., Su, W.-J., & Cao, M.-J., (2012). Study on a prolyl endopeptidase from the skeletal muscle of common carp (*Cyprinus carpio*). *Process Biochemistry*, 47(12), 2211-2218.
- Wang, X., Wang, Y., Zhang, X., & Xu, T., (2012). In situ combination of fermentation and electro dialysis with bipolar membranes for the production of lactic acid: Operational compatibility and uniformity. *Bioresour. Technol.*, 125(0), 165-171.
- Webb, E. C., (1992). Enzyme nomenclature 1992. Recommendations of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology on the Nomenclature and Classification of Enzymes. *Academic Press, San Diego*.
- Welches, W. R., Bridget Brosnihan, K., & Ferrario, C. M., (1993). A comparison of the properties and enzymatic activities of three angiotensin processing enzymes: angiotensin converting enzyme, prolyl endopeptidase and neutral endopeptidase 24.11. *Life sciences*, 52(18), 1461-1480.
- Wieser, H., (2007). Chemistry of gluten proteins. *Food microbiology*, 24(2), 115-119.

- Woychik, J., Boundy, J. A., & Dimler, R., (1961). Wheat gluten proteins, amino acid composition of proteins in wheat gluten. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 9(4), 307-310.
- Yamaguchi, S., (1967). The Synergistic Taste Effect of Monosodium Glutamate and Disodium 5'-Inosinate. *Journal of Food Science*, 32(4), 473-478.
- Yoshimoto, T., Abdus Sattar, A. K. M., Hirose, W., & Tsuru, D., (1987). Studies on prolyl endopeptidase from carrot (*Daucus carota*): purification and enzymatic properties. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 916(1), 29-37.
- Yoshimoto, T., Sattar, A. A., Hirose, W., & Tsuru, D., (1988). Studies on prolyl endopeptidase from shakashimeji (*Lyophyllum cinerascens*): purification and enzymatic properties. *Journal of biochemistry*, 104(4), 622-627.
- Yoshimoto, T., Walter, R., & Tsuru, D., (1980). Proline-specific endopeptidase from *Flavobacterium*. Purification and properties. *Journal of Biological Chemistry*, 255(10), 4786-4792.
- Zhang, X., Liu, Q., Zhang, G., Wang, H., & Ng, T., (2010). Purification and molecular cloning of a serine protease from the mushroom *Hypsizigus marmoreus*. *Process Biochemistry*, 45(5), 724-730.
- Zhang, X., Lu, W., Ren, H., & Cong, W., (2007). Recovery of glutamic acid from isoelectric supernatant using electrodialysis. *Separation and Purification Technology*, 55(2), 274-280.
- Zusatzstoffzulassungs-Verordnung. (29. Januar 1998). Verordnung über die Zulassung von Zusatzstoffen zu Lebensmitteln zu technologischen Zwecken. *Bundesrepublik Deutschland, zuletzt geändert am 21.5.2012.*

Lebenslauf

PERSÖNLICHE DATEN

Lucienne Giesler

18.03.1988 in Werdau

SCHULBILDUNG

1994 – 1996 Grundschule Wildetaube

1996 – 1998 Grundschule Hohenleuben

1998 – 2006 Staatliches Gymnasium Greiz

06/2006 Abitur; Prüfungsfächer: Mathematik, Deutsch, Biologie,
Wirtschaft/Recht

STUDIUM

10/2006 – 09/2008 Grundstudium (1. Prüfungsabschnitt) der Lebensmittelchemie an der
Technischen Universität Dresden

10/2008 – 06/2011 Hauptstudium (2. Prüfungsabschnitt) der Lebensmittelchemie an der
Technischen Universität Dresden, 1. Staatsexamen

10/2010 – 06/2011 Wissenschaftliche Abschlussarbeit (Diplomarbeit) „*Einfluss
tryptophanhaltiger Dipeptide auf das Renin-Angiotensin-Aldosteron-
System und das Endothelinsystem*“
Kooperation der Uniklinik Dresden und des Instituts für
Lebensmittelchemie der Technischen Universität Dresden
Akademischer Grad: Diplom-Lebensmittelchemikerin

STUDIENBEGLEITENDE TÄTIGKEITEN

10/2008 – 10/2010 Wissenschaftliche Hilfskraft und Tutorentätigkeit am Institut für
Bioanalytische Chemie der Technischen Universität Dresden

07/2011 – 09/2011 Wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Lebensmittelchemie der
Technischen Universität Dresden;
Fortführen und abschließende Untersuchungen in Anlehnung an die
Diplomarbeit

PROMOTION

Seit 10/2011 Wissenschaftliche Mitarbeiterin des Institut für Lebensmittelchemie
der Leibniz Universität Hannover; Promotion im Bereich der
Biotechnologie und Lebensmittelchemie