

**Strukturbildung in fermentierten Milchprodukten durch  
Laccasen aus Basidiomyceten**

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

**Doktorin der Naturwissenschaften**

Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

von

M.Sc.

**Marlene Struch**

geboren am 24.04.1987 in Halle/Saale

Hannover 2016

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

Korreferent: Prof. Dr. A. Hahn

Tag der Promotion: 21.01.2016

## **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 allzeit 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 bezüglich analytischer Methoden stets hilfreich 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. Jutta Papenbrock (Institut für Botanik, Leibniz Universität Hannover) für die Bereitschaft, den Vorsitz meiner Disputation zu übernehmen.

Dem Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI) danke ich für die finanzielle Unterstützung der Arbeit durch das Projekt „Strukturbildung und -regenerierung in fermentierten Milchprodukten durch Laccasen aus Speisepilzen“ (AiF 17475 N).

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. Ein besonders herzlicher Dank geht an meine Sitznachbarn Robin, Lucienne und Marion sowie Florian für allzeit gute Laune.

Ich danke allen Korrekturlesern für ihre Zeit und Mühen sowie die Bereitschaft zur wissenschaftlichen Diskussion.

Nicht zuletzt danke ich meiner Familie, die mich nicht nur jederzeit unterstützt und gefördert, sondern auch immer Interesse an meinen Fortschritten gezeigt hat. Auch meinen Freunden und Stefan gilt mein Dank für ihre Hilfe, Verständnis und manchmal einfach nur Ablenkung in dieser nicht immer einfachen Zeit.

## Vorbemerkung und Veröffentlichungen

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum vom Februar 2012 bis September 2015 am Institut für Lebensmittelchemie der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Dr. Ralf G. Berger angefertigt.

Diese Arbeit wurden im Rahmen des Forschungsvorhabens „Strukturbildung und –regenerierung in fermentierten Milchprodukten durch Laccasen aus Speisepilzen“ (AiF 17475 N), Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI), durchgeführt.

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

- Struch, M.; Linke, D.; Mokoonlall, A.; Hinrichs, J.; Berger, R. G. (2015). Laccase-catalysed cross-linking of a yoghurt-like model system made from skimmed milk with added food-grade mediators. *International Dairy Journal* 49, 89-94.
- Struch, M.; Linke, D.; Mokoonlall, A.; Hinrichs, J.; Berger, R. G. (2016) Dose dependent effects of a milk ion tolerant laccase on yoghurt gel structure. *LWT - Food Science and Technology* 65C, 1144-1152.

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

### Veröffentlichungen

- Struch, M.; Linke, D.; Berger, R.G. (2013). Strukturbildung in Joghurt durch Laccase-katalysierte Quervernetzung. *Lebensmittelchemie* 67, 76.
- Mokoonlall, A.; Hippich, M.; Struch, M.; Jochen W.; Berger, R. G.; Hinrichs, J. (2015). Structure modification of stirred fermented milk gel due to laccase-catalysed protein crosslinking in a post-processing step. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* (in press; DOI: 10.1016/j.ifset.2015.10.006).
- Mokoonlall, A.; Hippich, M.; Struch, M.; Jochen W.; Berger, R. G.; Hinrichs, J. Antioxidant activity of milk suppresses laccase induced radicals and the subsequent modification of acidified milk protein gels (*accepted for publication in International Dairy Journal*).
- Esparan, V.; Krings, U.; Struch, M.; Berger, R. G. (2015). A Three-Enzyme-System to Degrade Curcumin to Natural Vanillin. *Molecules* 20, 6640-6653.

## Vorträge

- Struch, M.; Linke, D.; Berger, R.G.: Strukturbildung in Joghurt durch Laccase-katalysierte Quervernetzung. Arbeitstagung des Regionalverbandes Nord, Lebensmittelchemische Gesellschaft, Hamburg School of Food Science, Hamburg, 18. – 19. Februar 2013
- Mookoonlall, A.; Struch, M.; Nöbel, S.; Linke, D.; Berger, R. G.; Hinrichs, J.: Laccases from Edible Fungi for the Formation and Regeneration of the Structure of Fermented Milk Products. Dairy Conference, Universität Hohenheim, 2013
- Mookoonlall, A.; Struch, M.; Nöbel, S.; Linke, D.; Berger, R. G.; Hinrichs, J.: Structure regeneration of a fermented milk gel by laccases in a post fermentation step. Food Structure and Functionality Forum Symposium, Amsterdam, 2014

## Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	<b>I</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>IV</b>
<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>VI</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>VII</b>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 <i>Cross-linking</i> von Proteinen.....	1
1.1.1 Proteinvernetzung <i>in vivo</i> .....	2
1.1.2 Chemisches <i>cross-linking</i> .....	5
1.1.3 Enzymatisches <i>cross-linking</i> .....	6
1.1.4 Enzyme zur Quervernetzung aus Basidiomyceten.....	7
1.2 Quervernetzung in Lebensmitteln.....	9
1.2.1 Quervernetzung bei der Lebensmittelverarbeitung.....	9
1.2.2 Enzyme in der Lebensmittelindustrie.....	10
1.3 Quervernetzung in Milchprodukten.....	12
1.3.1 Proteinfractionen der Milch.....	12
1.3.2 Organisation des Caseins und Struktur von Micellen.....	13
1.3.3 Milchproteingele.....	17
1.3.4 Transglutaminasen.....	18
1.3.5 Laccasen.....	21
1.4 Zielsetzung.....	27
<b>2 Vorwort zur Publikation „Laccase-catalysed cross-linking of a yoghurt-like model system made from skimmed milk with added food-grade mediators“</b> .....	<b>28</b>
<b>3 Laccase-catalysed cross-linking of a yoghurt-like model system made from skimmed milk with added food-grade mediators</b> .....	<b>30</b>
3.1 Introduction.....	30
3.2 Materials and methods.....	32
3.2.1 Materials.....	32
3.2.2 Enzyme.....	32
3.2.3 Preparation of skimmed milk yoghurt samples.....	33
3.2.4 Rheology.....	33
3.2.5 Sodium dodecylsulphate polyacrylamide gel electrophoresis.....	34
3.3 Results and discussion.....	34
3.3.1 Laccase and mediators.....	34
3.3.2 Laccase activity.....	35
3.3.3 Effect of mediator concentration.....	38

---

3.3.4 Time-course of the cross-linking reaction .....	38
3.3.5 Analysis of cross-linking by SDS-PAGE.....	40
3.4 Conclusions .....	41
<b>4 Vorwort zur Publikation „Dose dependent effects of a milk ion tolerant laccase on yoghurt gel structure” .....</b>	<b>42</b>
<b>5 Dose dependent effects of a milk ion tolerant laccase on yoghurt gel structure .....</b>	<b>43</b>
5.1 Introduction .....	44
5.2 Methods and materials.....	45
5.2.1 Chemicals and reference laccase .....	45
5.2.2 Applied strains.....	45
5.2.3 Cultivation and laccase production .....	45
5.2.4 Assays.....	45
5.2.5 Inhibition test.....	46
5.2.6 Cross-linking of casein.....	47
5.2.7 SDS-PAGE analysis .....	47
5.2.8 Laccase treatment of skimmed milk yoghurt samples.....	48
5.2.9 Rheology .....	48
5.3 Results and discussion.....	49
5.3.1 Screening for Ca <sup>2+</sup> and Cl <sup>-</sup> insensitive laccases.....	49
5.3.1.1 Effect of calcium on laccase activity.....	49
5.3.1.2 Effect of chloride on laccase activity .....	50
5.3.2 Inhibition tests with potassium, phosphate, magnesium and citrate.....	52
5.3.3 Cross-linking of casein.....	53
5.3.4 Cross-linking of skimmed milk yoghurt.....	54
5.4 Conclusion.....	55
<b>6 Vorwort zu “Evaluation of the suitability of laccases for the application in skimmed milk yoghurt” .....</b>	<b>57</b>
<b>7 Evaluation of the suitability of laccases for the application in skimmed milk yoghurt .....</b>	<b>58</b>
7.1 Introduction .....	58
7.2 Materials and methods.....	60
7.2.1 Materials .....	60
7.2.2 Enzymes .....	60
7.2.3 Cross-linking of yoghurt samples.....	60
7.2.4 Preparation of skimmed milk yoghurt samples with different protein concentrations.....	61
7.2.5 Rheology .....	61
7.2.6 Quantification of amino acids .....	61
7.2.7 Enzymatic incubation of amino acids.....	61
7.2.8 Mass spectrometry.....	62
7.2.9 Analysis of fatty acids .....	62

7.2.10 Tasting of cross-linked yoghurt samples .....	63
7.2.11 SDS-PAGE.....	63
7.2.12 Simulated digestion of cross-linked yoghurt samples .....	63
7.3 Results and discussion.....	64
7.3.1 Evaluation of oxidative modification of amino acids and fatty acids .....	64
7.3.1.1 Amino acids.....	64
7.3.1.2 Fatty acids.....	68
7.3.1.3 Tasting of cross-linked yoghurt samples .....	69
7.3.2 Comparison of an enhanced viscosity by the addition of milk protein and by laccase-catalysed cross-linking .....	72
7.3.3 Influence of the redox potential of laccases on cross-linking and fragmentation .....	74
7.3.4 Simulated digestion .....	78
7.4 Conclusion.....	79
<b>8 Ausblick.....</b>	<b>80</b>
<b>9 Literaturverzeichnis.....</b>	<b>81</b>
<b>Lebenslauf .....</b>	<b>91</b>



---

## Abkürzungsverzeichnis

ABTS	2,2'-Azino-bis-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure)
AGE	<i>Advanced glycosylation endproduct</i>
CA	<i>Caffeic acid</i> (Kaffeensäure)
CBS	Centraalbureau voor Schimmelcultures
Da	Dalton
DSMZ	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen
EC	Enzyme Commission
ESI	Elektronenspray-Ionisation
FPLC	<i>Fast protein liquid chromatography</i>
HBT	1-Hydroxybenzotriazol
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i>
ITS	<i>Internal transcribed spacer</i>
Lcc	Laccase
M	Mediator
MS	Massenspektrometrie
mTG	Mikrobielle Transglutaminase
n. s.	<i>Not specified</i>
<i>o</i> PA	<i>ortho</i> -Phthaldialdehyd
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Per	<i>Pleurotus eryngii</i>
RP	<i>Reversed phase</i> (Umkehrphase)
rpm	<i>Revolutions per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
SDS	<i>Sodium dodecyl sulphate</i> (Natriumdodecylsulfat)
SNL	Standardnährlösung

## Abkürzungsverzeichnis

---

sp.	<i>Species</i>
U	Unit ( $\mu\text{mol}/\text{min}$ )
U/g	Unit Laccaseaktivität pro Gramm Joghurt
V	Vanillin
VA	<i>Vanillic acid</i> (Vanillinsäure)
w/v	<i>Weight by volume</i>
Y	<i>Yoghurt</i> (Joghurt)

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

## Zusammenfassung

Ein prozessbedingter, irreversibler Strukturabbau fermentierter Milchprodukte infolge von Scherbelastung wird bis *dato* durch den Einsatz von Verdickungsmitteln oder durch Erhöhung des Feststoffgehalts kompensiert. Bisherige Studien zur Strukturregenerierung in Joghurt konzentrierten sich auf Quervernetzung mit mikrobieller Transglutaminase vor dem Fermentationsschritt. Eine enzymatische Alternative stellt das *cross-linking* mittels Laccasen aus Basidiomyceten im sauren Milchproteingel dar, was bislang nur anhand von Modellsubstraten erforscht wurde.

Die vorliegende Arbeit beschäftigte sich mit der Laccase-katalysierten Quervernetzung von Milchproteinen in Magermilchjoghurt und wurde anhand verschiedener Aspekte untersucht.

1. Die Veränderung physikalischer Eigenschaften von Magermilchjoghurt nach Inkubation mit Laccase C in Kombination mit *food grade*-Mediatoren wurde durch dynamische rheologische Messungen charakterisiert. Enzymaktivität, Mediatorverbindung und -konzentration wurden variiert. Die höchsten Werte der viskoelastischen Parameter des untersuchten Magermilchjoghurts resultierten aus der Kombination von 3 U Laccase pro Gramm Joghurt mit 5 mmol/L Kaffeesäure. Der Verlustfaktor  $\tan \delta$  bestätigte erhöhte elastische Anteile der Proben. Mittels SDS-PAGE wurden Veränderungen auf molekularer Ebene nachgewiesen.
2. Des Weiteren wurde ein Screening durchgeführt um eine Pilzlaccase zu finden, welche von den Ionen der Milch (Calcium, Chlorid, Magnesium, Kalium, Phosphat und Citrat) nicht bzw. nur geringfügig inhibiert wurde und somit eine effektivere Vernetzung als das kommerzielle Referenzenzym Laccase C ermöglichte. Aus 20 untersuchten Basidiomyceten-Stämmen wurde eine Laccase aus *Pleurotus eryngii* (Lcc Per) identifiziert, welche sowohl in Inhibierungstests als auch in Vernetzungsversuchen mit Casein überzeugen konnte. Die Quervernetzung von Magermilchjoghurt und anschließende rheologische Messungen zeigten, dass ein *cross-linking* mit Lcc Per nur bei einer Aktivität von 0,1 U pro Gramm Joghurt und 5 mmol/L Vanillin als Mediator realisiert werden konnte. Höhere Enzymdosierungen (1 U/g) führten zu Proteinabbau und Viskositätsverlusten.
3. Der dritte Teil der Arbeit umfasste die Untersuchung des oxidativen Einflusses von Laccasen auf die Bestandteile (u. a. Aminosäuren und Fettsäuren) von Joghurt. Mittels verschiedener analytischer Methoden wurde festgestellt, dass das Referenzenzym Laccase C keine Veränderungen an den Aminosäuren des untersuchten Joghurts hervorrief. Allerdings konnten die typischen, durch Laccase katalysierten *cross-links* (Disulfidbrücken, Dityrosinbindungen) in geringen Mengen nachgewiesen werden. Die Untersuchung des Fettsäurespektrums zeigte geringfügige Veränderungen, die in Verkostungen des vernetzten Joghurts auf Lipidoxidation zurückgeführt werden konnten. Die Quervernetzung in Magermilchjoghurt beeinflusste die Verdaubarkeit der Proteine nicht negativ. Auch wurde die Laccase-induzierte Proteinfragmentierung weiter untersucht und die Viskositätssteigerung durch Proteinquervernetzung mit Laccasen im Vergleich zu Joghurtproben mit erhöhter Proteinkonzentration bewertet.

**Schlagwörter:** *cross-linking*, Laccase, Mediator, viskoelastische Eigenschaften, Rheologie, Magermilchjoghurt, Basidiomycota, *Pleurotus eryngii*, Viskosität

## Abstract

Lactic acid fermented foods suffer from irreversible structural losses in post-processing steps due to shear stress. Hitherto, these losses are compensated by the addition of thickening agents or increasing the solid content. Previous studies concerning the structure regeneration of dairy products focussed on cross-linking with a microbial transglutaminase prior to the fermentation step. Laccases from basidiomycetes represent an enzymatic alternative for the cross-linking in acidic milk protein gels. This topic has so far been investigated only based on model substrates.

The present work examined the laccase-catalysed cross-linking of milk proteins in skimmed milk yoghurt regarding several aspects.

1. Physical properties of skimmed milk yoghurt changed upon incubation with Laccase C in combination with food-grade mediators and were characterised using dynamic oscillation rheology. Applied enzyme activity, type of mediator and mediator concentration were varied. The viscoelastic properties of the examined yoghurt samples were strongly increased by a combination of 3 U laccase per gram of yoghurt and 5 mmol/L caffeic acid. The loss factor  $\tan \delta$  confirmed increased elastic parts in the laccase-treated samples. SDS-PAGE revealed an altered pattern of proteins after the treatments.
2. A screening was conducted in order to find a fungal laccase which is not or solely slightly inhibited by ions of the milk (calcium, chloride, magnesium, potassium, phosphate and citrate), thus enabling a more effective cross-linking than the reference enzyme Laccase C. Out of 20 basidiomycete species, a laccase from *Pleurotus eryngii* (Lcc Per) revealed the most suitable over-all profile of attributes in inhibition tests and cross-linking experiments with casein. Rheological measurements of laccase-treated yoghurt proved that cross-linking was possible with a combination of 0.1 U/g Lcc Per and 5 mmol/L vanillin. Higher enzyme dosages (1 U/g) resulted in fragmentation of protein and weakening of the gel.
3. The third part of the study focussed on examining the oxidative impact of laccases on constituents of the yoghurt, such as amino acids and fatty acids. Employing various analytical methods, it was found that the reference enzyme Laccase C did not alter amino acids of skimmed milk yoghurt samples oxidatively. However, the characteristic laccase-catalysed cross-links, such as dityrosine and disulphide, were detected in small quantities. The examination of the fatty acids of the yoghurt samples revealed minor changes of the composition. These were attributed to lipid oxidation which was confirmed in tasting of the laccase-treated samples. The digestibility of cross-linked yoghurt samples was not affected negatively. Furthermore, the laccase-induced protein fragmentation was investigated. The increase of viscosity upon protein cross-linking and by raising the protein concentration of yoghurt samples was compared and rated.

**Key words:** cross-linking, laccase, mediator, viscoelastic properties, rheology, viscosity, skimmed milk yoghurt, Basidiomycota, *Pleurotus eryngii*



# 1 Einleitung

## 1.1 *Cross-linking* von Proteinen

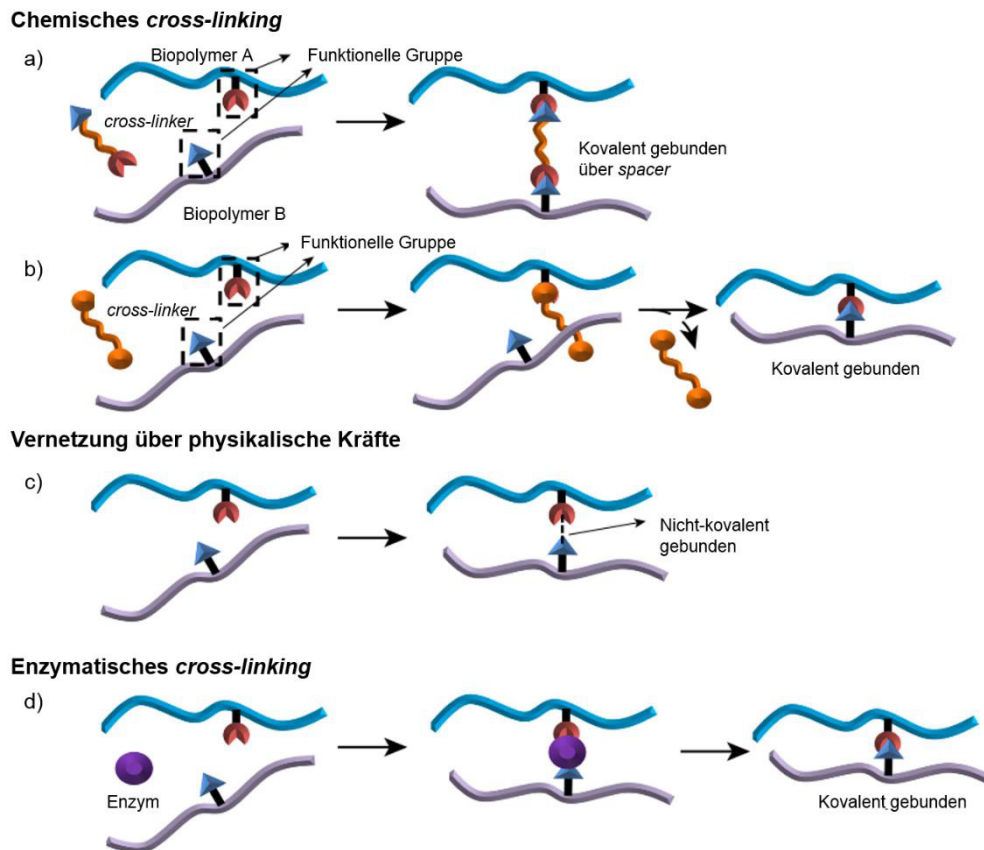
Das große Spektrum der Enzyme spiegelt sich in einer vielfältigen Funktionalisierung durch die Lebensmittelindustrie wider. Enzyme wie die mikrobielle Transglutaminase (mTG) stehen stellvertretend für die weitreichenden Möglichkeiten, welche Biokatalysatoren bieten. In keinem anderen Verfahren sticht ein Enzym so hervor wie bei der Quervernetzung von Proteinen. Eine scheinbar endlose Liste zählt Lebensmittel auf, in deren Herstellungsprozess mTG involviert ist (Gerrard, 2002). Dennoch beruht der Weg, mit Hilfe dieses Enzyms die Eigenschaften von Lebensmitteln zu verbessern und aus eher minderwertigen Rohstoffen qualitativ hochwertige Nahrungsmittel herzustellen, immer auf der Vernetzung der im Lebensmittel enthaltenen Proteine.

Als Vernetzung bzw. *cross-linking* wird der Prozess der Ausbildung kovalenter Bindungen zwischen Proteinen bezeichnet (Heck *et al.*, 2013; Wong, 1991). Das *cross-linking* von Proteinen umfasst physikalische, chemische, enzymatische sowie chemoenzymatische Methoden der Ausbildung neuer kovalenter Bindungen (*cross-links*) zwischen Polypeptiden. Dabei wird unterschieden zwischen intramolekularen *cross-links*, d. h. der Bildung von kovalenten Bindungen innerhalb der Polypeptidkette eines Proteins und intermolekularen *cross-links*, die zwischen individuellen Proteinen ausgebildet werden. Die intermolekulare Vernetzung von Proteinen kann sowohl durch Bildung einer spezifischen Verknüpfung zwischen zwei Proteinen stattfinden als auch durch Ausbildung von Proteinnetzwerken. Die neu gebildeten makromolekularen Verbindungen unterscheiden sich dabei in physikochemischen Eigenschaften und Funktionalitäten von ihren einzelnen Ausgangsverbindungen (Dickinson, 1997; Heck *et al.*, 2013).

Das Zusammenspiel von starken und schwachen Wechselwirkungen innerhalb eines Proteinnetzwerks bestimmt dessen Eigenschaften. So wirken neben den kovalenten Bindungen (150-500 kJ/mol) in Abhängigkeit von den vorherrschenden Aminosäuren und den gegebenen äußeren Bedingungen auch physikalische Kräfte wie elektrostatische Wechselwirkungen (25-80 kJ/mol), Wasserstoffbrückenbindungen (10-40 kJ/mol) sowie hydrophobe Wechselwirkungen (5-10 kJ/mol). Die Ausbildung permanenter *cross-links* ist dabei entscheidend für das Protein-*cross-linking*. Auch über die wesentlich schwächeren, reversiblen physikalischen Kräfte können Proteinnetzwerke erzeugt werden. Dies wird zur besseren Differenzierung hier als Protein-*conjugation* bezeichnet und in der vorliegenden Arbeit nicht weiter behandelt (Dickinson, 1997; Heck *et al.*, 2013). Einen Überblick bietet Fig. 1-1.

Die reaktiven Seitenketten von Aminosäuren der jeweiligen Proteine dienen als Reaktionsorte bei der Vernetzung dieser Proteine. Die Fig. 1-2 fasst die entsprechenden funktionellen Gruppen der Aminosäureseitenketten zusammen, die in Folge bestimmter Reaktionsbedingungen

Vernetzungsreaktionen eingehen oder durch Enzyme funktionalisiert werden (vgl. Kapitel 1.1.1) (Gerrard, 2002; Walsh *et al.*, 2005).

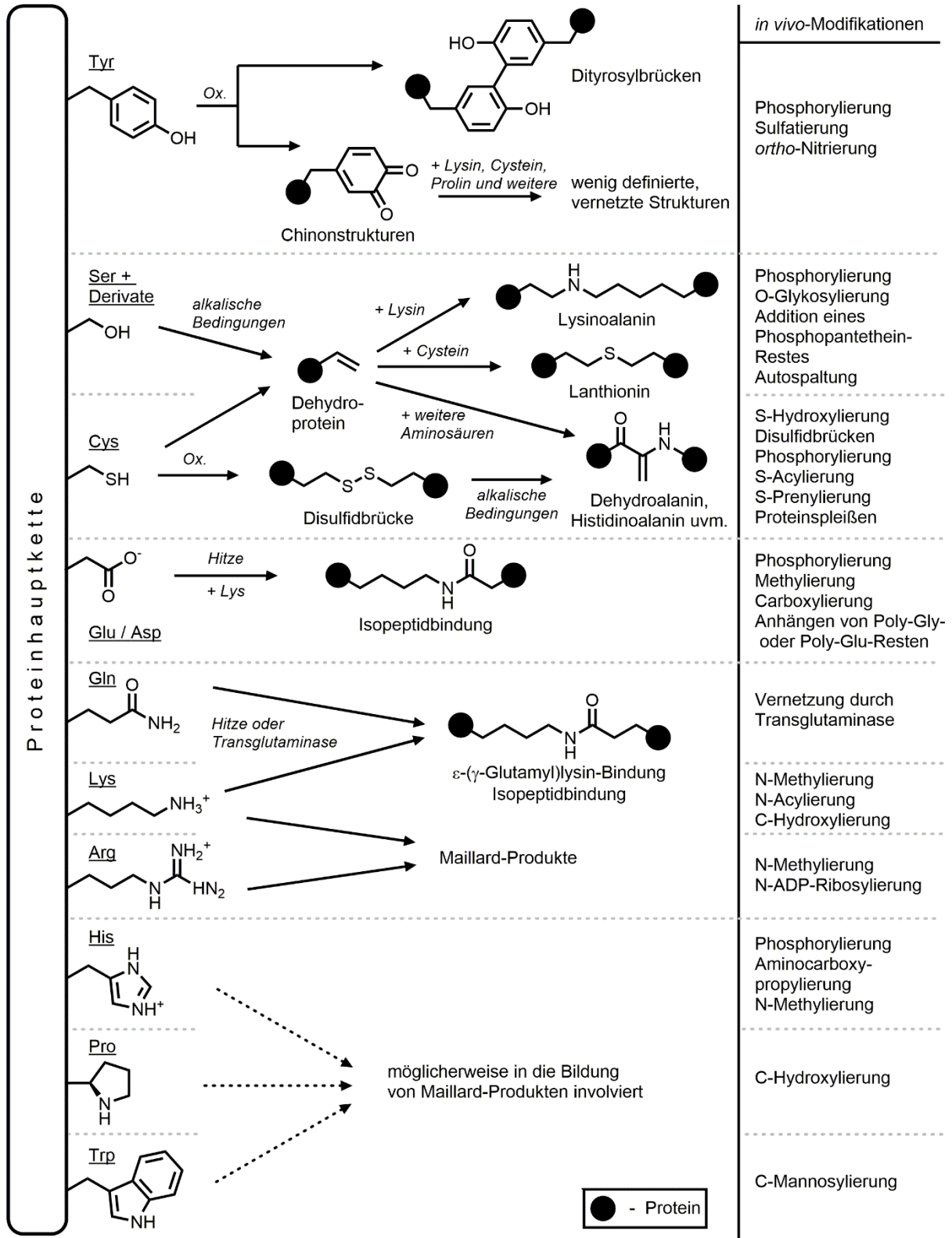


**Fig. 1-1** Schematische Übersicht über Möglichkeiten der Vernetzung von Biopolymeren: a) Chemisches *cross-linking* mittels heterobifunktionellem *cross-linker*, der als *spacer*-Gruppe in das Produkt eingebaut wird, b) Chemische Vernetzung mittels homobifunktionellem *cross-linker* durch Aktivierung von funktionellen Gruppen, c) Ausbildung von reversiblen physikalischen Kräften über funktionelle Gruppen verschiedener Biopolymere, d) Enzym-katalysiertes *cross-linking* unter Ausbildung kovalenter Bindungen (modifiziert nach Reddy *et al.* (2015))

### 1.1.1 Proteinvernetzung *in vivo*

Das Protein-*cross-linking* als Methode zur Netzwerkbildung ist dem Vorbild grundlegender Stoffwechselfvorgänge nachempfunden. Das *in vivo-cross-linking* wird von spezifischen Enzymen an den funktionellen Gruppen von Aminosäuren katalysiert und umfasst drei Bereiche der posttranslationalen Modifikation von Proteinen. Dazu zählt zum einen die kovalente Addition niedermolekularer Moleküle in Form von Phosphorylierungen, Acylierungen, Alkylierungen sowie Glykosylierungen (Fig. 1-2) (Walsh *et al.*, 2005). Dies ist notwendig, um die strukturelle und funktionale Diversität des Proteoms zu erhöhen. Über diese Modifikationen besteht die Möglichkeit, Enzymaktivitäten zu variieren, Proteine in Membranen zu integrieren und deren subzelluläre Lokalisierung zu kontrollieren, Hydrophobizitäten zu erhöhen oder Signalwege über essentielle Erkennungsmerkmale zu ermöglichen. So ist z. B. die Ubiquitinierung von Proteinen notwendig für

zelluläre Signaltransduktion und regulatorische Prozesse, vor allem als Signal für den Abbau fehlgefalteter Proteine (Hershko *et al.*, 1998).



**Fig. 1-2** Chemische, chemoenzymatische und physikalisch induzierte Vernetzungsreaktionen ausgewählter Aminosäuren und enzymatischer *in vivo*-Modifikationen der entsprechenden funktionellen Gruppen (modifiziert nach Gerrard (2002); H. Singh (1991); Walsh *et al.* (2005))



Ein weiterer Bereich umfasst intramolekulare Transformationen. Dazu zählen einerseits peptidolytische Modifikationen, in denen die Aminosäurehauptkette eines Proteins prozessiert wird. Die Bindungsspaltung, z. B. zur Aktivierung von Enzympräkursoren des Verdauungssystems, wird von Peptidasen katalysiert (Khan *et al.*, 1998). Selten tritt auch autokatalytische Bindungsspaltung auf. Auch die Peptidolyse dient der Kontrolle von Lokalisierung, Aktivität und Lebensdauer von Proteinen und reguliert so die Funktion des Proteoms. Zu den intramolekularen Transformationen gehören auch die intramolekularen *cross-links*, welche während der Faltung eines Proteins ausgebildet werden. Disulfidbrücken, welche durch oxidative Kopplung von zwei Cysteinresten gebildet werden (Fig. 1-2), stabilisieren die dreidimensionale Proteinstruktur durch Verknüpfung von Polypeptidsträngen und verleihen Strukturproteinen Flexibilität. Enzyme verschiedener Enzymklassen, u. a. Thiol-Oxidasen und Proteindisulfid-Isomerasen, katalysieren die Ausbildung von Disulfidbrücken. Die Anzahl dieser Verknüpfungen ist entscheidend für die Stabilität eines Proteins und seine Widerstandskraft gegen peptidolytischen Abbau. Das Strukturprotein Keratin, ein Hauptbestandteil von u. a. Haaren und Federn, profitiert von einer Vielzahl an Disulfidbrücken, welche die Fibrillen verbinden und das Protein wasserunlöslich machen (Heck *et al.*, 2013; H. Singh, 1991).

Der letzte Bereich umfasst das intermolekulare *cross-linking* einzelner Proteine bzw. die Ausbildung von Proteinnetzwerken. Native Strukturproteine in Pflanzenzellwänden profitieren von der Bildung von Di- und Tryptosin durch Peroxidasen, was sowohl zur Unlöslichkeit als auch zur Flexibilität dieser Proteine beiträgt. Für viele physiologisch bedeutende Vernetzungsreaktionen höherer Eukaryoten sind Transglutaminasen verantwortlich, welche die Einführung von Isopeptidbindungen zwischen Glutamyl- und Lysylseitenketten katalysieren (vgl. Kapitel 1.3.4) und so zur Ausbildung von Proteinnetzwerken beitragen. Einer der bekanntesten Vertreter, eine als Faktor XIII bezeichnete Transglutaminase, ist durch Quervernetzung von Fibrin an der Blutgerinnung beteiligt. Auch im Keratin von Haaren und Wolle wurden Transglutaminase-katalysierte Isopeptidbindungen nachgewiesen (Heck *et al.*, 2013; H. Singh, 1991; Walsh *et al.*, 2005).

Den lebensnotwendigen Aspekten des enzymatisch gesteuerten Protein-*cross-linking in vivo* stehen unkontrollierte, nicht-enzymatische Verknüpfungsreaktionen gegenüber, die mit zunehmendem Alter eines Organismus unerwünschte Begleiterscheinungen und Altersbeschwerden bedingen. Viele chronische Krankheiten wie Diabetes mellitus, Adipositas, Grauer Star oder Morbus Alzheimer werden assoziiert mit altersbedingter Veränderung von Biomolekülen. Ursächlich dafür ist im Wesentlichen die Anreicherung sogenannter *advanced glycation endproducts* (AGEs), die durch Maillard-Reaktionen gebildet werden (Hellwig *et al.*, 2014). Durch Glykierung veränderte Proteinstrukturen sind widerstandsfähig gegenüber enzymatischen Abbauprozessen und reichern sich so langsam im Gewebe an. Die Bildung dieser heterogenen und stabilen Verbindungen umfasst zunächst die Kondensation eines reduzierenden Zuckers mit einer freien Aminogruppe eines Proteins zur Schiff-Base. Diese lagern sich zu stabileren Amadori-Produkten um. Nach diesen beiden reversiblen Reaktionen erfolgt die Bildung

von AGEs über verschiedene Reaktionswege, die oxidative oder hydrolytische Schritte beinhalten können. Diese Gruppe von heterogenen und stabilen Verbindungen ist in der Lage, Proteine irreversibel zu vernetzen.

Problematisch wird dies bei langlebigen Proteinen wie Collagen und Hämoglobin, da pathophysiologische Veränderungen zu erwarten sind. Durch AGEs vernetztes Collagen verliert an Dehnbarkeit und Stärke, das Gewebe versteift zunehmend. Davon betroffen sind vor allem Sehnen, Muskeln und Bänder, aber auch arterielle Zellwände. Zudem werden die Proteine der Augenlinse durch AGEs quervernetzt, was sich in der Trübung der Augenlinse (Grauer Star) widerspiegelt. Des Weiteren sind AGEs in Zellsignalwege involviert und induzieren Entzündungsreaktionen durch Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B. (Hellwig *et al.*, 2014; Kandarakis *et al.*, 2014; Monnier *et al.*, 1992; C. Ott *et al.*, 2014).

Die vielfältigen Möglichkeiten der Vernetzung von Proteinen werden nicht nur *in vivo* beobachtet, sondern überall dort, wo mit Proteinen gearbeitet wird (Kapitel 1.2.1). Polymere Netzwerke aus vernetzten Proteinen mit materialartigen Strukturen und Eigenschaften sind für Medizintechnik, Lebensmittelverpackungen und viele weitere Anwendungsgebiete erstrebenswert. Durch Steuerung der Vernetzungsreaktionen auf chemischem und enzymatischem Wege werden so neue Materialien und Texturen mit gewünschten Eigenschaften entwickelt (Heck *et al.*, 2013; Teixeira *et al.*, 2012).

### 1.1.2 Chemisches *cross-linking*

Eine enorme Bandbreite an verfügbaren Vernetzungsreagenzien (*cross-linker*), die sich in Funktionalität, Reaktivität und Größe unterscheiden, ergeben vielfältige Möglichkeiten, Proteine auf chemischem Wege zu vernetzen (Wong *et al.*, 1992; Wong *et al.*, 2012). Durch Vernetzungsreagenzien mit homo- bzw. heterofunktionellen Gruppen können Proteine gezielt über Aminosäureseitenketten mit bestimmten Funktionalitäten verknüpft werden (Gerrard, 2002; H. Singh, 1991; Wong, 1991). Die Proteinvernetzung mit bi- oder multifunktionalen *cross-linkern* ermöglicht das Einführen von Abstandsgruppen (*spacer*) mit definierter Länge und Zusammensetzung zwischen den Reaktionspartnern (Fig. 1-1a). Glutaraldehyd ist die mit Abstand meist genutzte Verbindung. Funktionelle Gruppen von Proteinen und Zuckern dienen als Reaktionspartner. Obwohl die Handhabung schwierig ist, zeigt es eine gute Wirksamkeit bei der Verbesserung von mechanischen Eigenschaften (Wong *et al.*, 2012). Auch einige andere Reagenzien wie Carbodiimid, Epichlorhydrin oder Natriummetaphosphat wurden für das *cross-linking* von Biopolymeren eingesetzt. Die geringe Vernetzungseffizienz dieser Verbindungen verbesserte mechanische Eigenschaften jedoch nur unwesentlich (Reddy *et al.*, 2015). Mit monofunktionalen Vernetzungsreagenzien wie Formaldehyd oder durch Aktivierung funktioneller Gruppen mit dem bereits erwähnten Carbodiimid besteht zudem

die Möglichkeit, ohne Einführung eines *spacer* ein vernetztes Produkt zu erzeugen (Fig. 1-1b) (Wong *et al.*, 2012). So können die physikochemischen Eigenschaften des Produktes durch Auswahl eines geeigneten Reagenz angepasst werden. Doch trotz der vielfältigen Möglichkeiten des chemischen *cross-linking* wird diese Methode für die Erzeugung von neuartigen Lebensmittelmatrices oder für medizinische Anwendungen wie das *tissue engineering* (Reddy *et al.*, 2015; Teixeira *et al.*, 2012) nicht genutzt, da viele der chemischen Vernetzungsreagenzien giftig sind bzw. giftige Nebenprodukte bilden oder die funktionellen Eigenschaften eines Biopolymers verändern. Im Gegensatz zu den katalytisch wirksamen Enzymen müssen mindestens stöchiometrische Mengen eingesetzt werden, damit die Reaktion vollständig abläuft. Außerdem sind die eingesetzten Reagenzien nach jedem Reaktionszyklus verbraucht, wohingegen Enzyme bestenfalls zurückgewonnen werden können (Heck *et al.*, 2013; Wong *et al.*, 2012). Dennoch werden in der Forschung Lebensmittelproteine, z. B. Weizengliadin, auf chemischem Wege verknüpft, um Auswirkungen der Vernetzung auf die Stabilität und Verdaubarkeit der Proteine untersuchen zu können (Gerrard *et al.*, 2003a, 2003b). Des Weiteren wird die chemische Quervernetzung zur Immobilisierung technischer Enzyme angewandt (Grunwald, 2015; Sheldon, 2011).

### 1.1.3 Enzymatisches *cross-linking*

Enzyme stellen eine attraktive Alternative für die Vernetzung von Proteinen dar, da eine Bindungsbildung zwischen zwei oder mehreren Molekülen ohne den Einbau eines extrinsischen Atoms katalysiert wird (Fig. 1-1d). Dennoch wird nur eine geringe Anzahl an Enzymen regelmäßig für das *cross-linking* eingesetzt, obwohl die Vorteile gegenüber chemischen Reagenzien, insbesondere im Lebensmittelbereich, deutlich überwiegen. Die enzymatische Vernetzung läuft unter milden Bedingungen in wässrigen Systemen ab, wobei nur katalytische Mengen eines Enzyms benötigt werden. Die Vernetzungsreaktion kann dabei durch Kontrolle von Temperatur, Wasseraktivität, Ionenstärke und pH-Wert gesteuert werden. Zudem bieten enzymatische Vernetzungsreaktionen den Vorteil der Selektivität in Abhängigkeit von der Spezifität des jeweiligen Enzyms. Im Gegensatz zur chemischen Vernetzung ist das Entstehen toxischer Nebenprodukte nahezu ausgeschlossen. Des Weiteren akzeptieren Verbraucher Enzyme als natürliche Hilfsstoffe (Gerrard, 2002; Simpson *et al.*, 2012; Søndergaard *et al.*, 2007; Wong *et al.*, 2012).

Über verschiedene reaktive funktionelle Gruppen von Aminosäuren wie zum Beispiel Glutamin, Lysin, Tyrosin oder Cystein können Enzyme direkt oder indirekt *cross-links* zwischen Proteinen einführen. Die direkte Bildung von kovalenten Bindungen wird katalysiert von Transferasen (EC 2) und Hydrolasen (EC 3). Dazu zählen u. a. die bereits erwähnten Transglutaminasen (vgl. Kapitel 1.1.1 und 1.3.4) und Peptidasen (EC 3.4.-.-). Letztere katalysieren zwar überwiegend die Hydrolyse von Peptidbindungen, können unter bestimmten Bedingungen aber auch die Bildung von Peptidbindungen katalysieren (Popp *et al.*, 2011). Im Gegensatz dazu vermitteln Oxidoreduktasen (EC 1) wie Tyrosinasen, Laccasen,

Peroxidasen und Lysyl-Oxidasen die Bindungsbildung indirekt. Diese Enzyme erzeugen reaktive Spezies, die in nicht-enzymatischen Reaktionen spontan weiterreagieren und so kovalente Bindungen ausbilden.

Von limitiertem praktischen Nutzen sind Enzymreaktionen, die ATP-abhängig sind oder ein komplexes Zusammenspiel mehrerer Enzyme aufweisen. Somit beschränkt sich das enzymatische *cross-linking* auf wenige Enzymsubklassen (Heck *et al.*, 2013) (vgl. Kapitel 1.2.2).

Der Erfolg der Quervernetzung von Proteinen hängt im Wesentlichen davon ab, ob das Enzym unter optimalen Bedingungen hinsichtlich Aktivität und Stabilität arbeiten kann und ob die Reaktionsorte am Protein, d. h. reaktive Aminosäureseitenketten, unter den jeweiligen Prozessbedingungen für das Enzym zugänglich sind. So sind Proteine ohne ausgeprägte Tertiärstruktur, wie z. B. Caseine, bessere Substrate für die meisten Enzyme als globuläre Proteine, wie z. B. Molkenproteine (Dickinson, 1997; Saricay *et al.*, 2012; Steffensen *et al.*, 2008). Demzufolge entscheiden Sekundär- und Tertiärstruktur sowie die Größe eines globulären Proteins, ob eine enzymatische Modifikation stattfindet. Die teilweise oder gar vollständige Denaturierung eines Proteins durch pH-Wert, chemische Verbindungen, Temperatur oder Druck kann ein Enzym-katalysiertes *cross-linking* ermöglichen. Des Weiteren besteht die Möglichkeit, dass das Enzym selbst als Substrat dient und so in ein Proteinnetzwerk eingebaut wird.

### 1.1.4 Enzyme zur Quervernetzung aus Basidiomyceten

Ob bei der Brotherstellung, der Veredlung von Milchprodukten sowie dem Brauen von Bier, Enzyme aus Pilzen nehmen eine zunehmende wirtschaftliche Bedeutung ein (Erjavec *et al.*, 2012; Fuchs *et al.*, 2014). Vor allem im medizinischen und biotechnologischen Bereich gelten Pilze durch ihre einzigartigen metabolischen Aktivitäten als interessante Quelle von Enzymen und Sekundärmetaboliten. Zudem ist eine Vielzahl der Spezies noch unbekannt und birgt somit großes Potential an bioaktiven Verbindungen (Erjavec *et al.*, 2012; Stadler *et al.*, 2015). Etwa 60 % von 260 kommerziell verfügbaren Enzymen stammen aus dem Reich der Pilze, doch nur fünf dieser Enzyme werden von Pilzen des Unterreiches Dikarya produziert (Erjavec *et al.*, 2012).

Eine Abteilung der Dikarya bilden die Ständerpilze (Basidiomycota). Diese Klasse wird auf weit über 100.000 Arten geschätzt (Hibbett *et al.*, 2007; Lindequist *et al.*, 2005) und ist gekennzeichnet von großer Artenvielfalt der zum Teil Fruchtkörper-bildenden Spezies (Dörfelt *et al.*, 2014). Das namensgebende Merkmal der Basidiomyceten sind die Sporenständer, welche als Basidien bezeichnet werden. Die Basidiosporen sind in der Regel einzellig, haploid und reifen meist einzeln in den Sterigmata der Basidien. In vielen Fällen werden die Basidiosporen aktiv abgeschleudert. Das Mycel der Basidiomyceten besteht aus septierten Hyphen. Veränderungen in Licht- und Temperaturverhältnissen

können die Bildung eines Fruchtkörpers (Basidiocarp) auslösen (Dörfelt *et al.*, 2014; Fuchs *et al.*, 2014; Kavanagh, 2011; Kirk, 2008; Müller *et al.*, 1992).

Die Basidiomyceten sind mit ihren vielgestaltigen morphologischen, physiologischen und ökologischen Eigenschaften angepasst an unterschiedlichste Lebensweisen (Müller *et al.*, 1992). Es sind saprophytisch, parasitisch oder symbiontisch lebende Spezies bekannt (Fuchs *et al.*, 2014). Dies bedingt auch ihre wirtschaftliche Bedeutung. So beheimatet die Unterabteilung Agaricomycotina ca. 2.000 essbare Kultur- und Speisepilze wie Champignons, Seitlinge und Röhrlinge (Erjavec *et al.*, 2012), aber auch etliche Giftpilze. Vertreter der Rost- (Pucciniomycotina) und Brandpilze (Ustilaginomycotina) schädigen durch parasitäre Lebensweise Nutz- und Kulturpflanzen (Fuchs *et al.*, 2014; Kirk, 2008).

Vor allem die filamentösen Vertreter der ca. 30.000 bereits beschriebenen Spezies der Basidiomyceten (Kirk, 2008) zeichnen sich durch die Fähigkeit aus, mit einer einzigartigen Komplexität an extrazellulären Enzymen, dem sogenannten Sekretom, alle Hauptkomponenten des Holzes effizient abzubauen zu können. Speziell Weißfäulepilze nehmen durch Zersetzung von Cellulose, Hemicellulose und Lignin eine entscheidende Rolle in den Abbauprozessen von organischem Material und damit der Wiederverwertung von Kohlenstoff ein (Baldrian, 2006; A. P. Singh *et al.*, 2014). Die Mehrheit der an diesen Abbauprozessen beteiligten Enzymklassen wurde bereits beschrieben und sind im Falle von Laccasen, Peroxidasen, Wasserstoffperoxid-produzierenden sowie hydrolytischen Enzymen gut untersucht (A. P. Singh *et al.*, 2014). Durch eine Vielzahl an Isoenzymen sind Basidiomyceten in der Lage, ihren Metabolismus an sich verändernde Kohlenstoff- bzw. Stickstoffquellen anzupassen, um einen möglichst effizienten Abbau von Biopolymeren zu gewährleisten und in ihrer Aktivität bezüglich verschiedener Substrate zu variieren (Dwivedi *et al.*, 2011; Rivera-Hoyos *et al.*, 2013; van den Brink *et al.*, 2011).

Basidiomyceten-Enzyme werden zunehmend in biotechnologischen Prozessen angewandt (Grunwald, 2015; Kavanagh, 2011; A. P. Singh *et al.*, 2014). Dabei profitiert der Anwender von der guten Temperatur- und pH-Stabilität vieler Enzyme sowie ihrer großen Variabilität auf Proteinebene. Zudem wird versucht, diese Enzyme in Vernetzungsreaktionen sowohl im Lebensmittelbereich als auch zur Erzeugung biomimetischer Ersatzgewebe und textiler Materialien zu funktionalisieren (Heck *et al.*, 2013; A. P. Singh *et al.*, 2014).

## 1.2 Quervernetzung in Lebensmitteln

### 1.2.1 Quervernetzung bei der Lebensmittelverarbeitung

Eine der bedeutendsten Aufgaben der modernen Lebensmitteltechnologie ist neben der Entwicklung von neuartigen Lebensmitteln die Verbesserung der Eigenschaften von traditionellen Lebensmitteln (Dickinson, 1997; Gerrard, 2002; Simpson *et al.*, 2012; Zeeb *et al.*, 2014). Lebensmittel können als Materialien mit komplexen Strukturen, bestehend aus verschiedenen Komponenten, betrachtet werden. Die Struktur eines Lebensmittels beeinflusst sowohl dessen Stabilität als auch Textur und da letztere eine der wichtigsten sensorischen Eigenschaften darstellt, somit auch die Wahl des Konsumenten. Die Lebensmittelstruktur kann auf vielfältige Weise verändert werden, z. B. durch Erhöhung des Feststoffgehalts oder Zusatz von Verdickungsmitteln (Guzmán-González *et al.*, 1999; Guzmán-González *et al.*, 2000; Krzeminski *et al.*, 2014; Pereira *et al.*, 2006; Sandoval-Castilla *et al.*, 2004). Die Vernetzung von Biopolymeren in Lebensmitteln, d. h. von Proteinen und Kohlenhydraten, stellt einen alternativen Weg dar, neue Lebensmittelstrukturen zu entwickeln. Dieses Potential wird bis heute bei weitem noch nicht ausgeschöpft. Da Proteine die wichtigste Klasse zur Veränderung von Texturattributen darstellen, ist die Vernetzung bzw. Aggregation von Proteinen ein wichtiges Werkzeug, um neue Lebensmittelstrukturen zu erzeugen (Dickinson, 1997). Dieser Weg erfordert sowohl Kenntnisse in Proteinbiochemie als auch in Polymerchemie. Oft werden Lebensmittelproteine bereits während der Verarbeitung eines Rohstoffes verändert bzw. denaturiert, da diese häufig hohen Temperaturen, extremen pH-Werten, oxidativen Bedingungen oder unkontrollierter Enzymchemie ausgesetzt werden. So verändert allein die Lebensmittelverarbeitung Art und Zahl der Proteinvernetzungen einhergehend mit ihren funktionellen Eigenschaften, teilweise begleitet durch die Reduktion des Nährwerts.

**Tab. 1-1** Prozessbedingte Vernetzungsreaktionen von Proteinen, die während der Lebensmittelverarbeitung auftreten können (Gerrard, 2002; H. Singh, 1991)

Einfluss durch	Bildung von	Beteiligte Aminosäuren
Alkalische Bedingungen und Hitze	hoch reaktives Dehydroprotein: Neigung zur Weiterreaktion mit $\varepsilon$ -Amino- oder Sulfhydrylgruppen von Aminosäuren, z. B. zu Lysinoalanin, Lanthionin, Dehydroalanin, Histidinoalanin	Cystein, Lysin, Serin und Serinderivate, Disulfidstrukturen
Starkes Erhitzen	Isopeptidbindungen: $\varepsilon$ -N-( $\gamma$ -Glutamyl)lysin, $\varepsilon$ -N-( $\gamma$ -Aspartyl)lysin Disulfidbindungen	Aspartat, Glutamat, Glutamin, Lysin Cystein
Oxidation	Disulfidbindungen	Cystein
Zucker und Aldehyde	Quervernetzungsreaktionen durch Maillard-Reaktionen	Arginin, Lysin
Lipide	Quervernetzungsreaktionen durch freie Radikale, Malondialdehyd uvm.	Cystein, Methionin, Tryptophan, Histidin

Es existieren verschiedene Möglichkeiten, Proteine zu vernetzen und so Lebensmittelstrukturen zu beeinflussen. Quervernetzungen können auf chemischem, physikalischem oder enzymatischem Weg erzeugt werden. Diese finden, unabhängig von der Art des Protein-*cross-linking*, meist über die in Tab. 1-1 aufgelisteten Aminosäuren statt. Am häufigsten treten Disulfidbrücken auf, welche durch oxidative Kopplung oder infolge von Hitzeeinwirkung aus zwei Cysteinresten entstehen (vgl. Fig. 1-2). Disulfidbrücken sind durch die Ausbildung eines dreidimensionalen Netzwerks entscheidend bei der Gelierung vieler Lebensmittelproteine, einschließlich Milchproteine, Surimi, Sojabohnen, Eier, Fleisch und verschiedener Gemüseproteine, beteiligt (Dickinson, 1997).

Das *cross-linking* von Proteinen in Lebensmitteln hat Einfluss auf Textur, Viskosität, Löslichkeit, Emulgierfähigkeit sowie Gelierungseigenschaften. Viele traditionelle Lebensmittel wie Joghurt, Käse, Tofu, Surimi und Wurst basieren auf Proteingelen. Derartige Gelstrukturen können aus Proteinlösungen und -dispersionen sowie kolloidalen Systemen durch Ansäuerung, Erhitzen, Druckbehandlung oder enzymatischer Behandlung erzeugt werden (Dickinson, 1997; Simpson *et al.*, 2012; Zeeb *et al.*, 2014). Die viskoelastischen Eigenschaften eines Lebensmittels mit gelartiger Struktur beeinflussen dessen Textur und werden definiert durch das Verhältnis von starken und schwachen reversiblen physikalischen Wechselwirkungen zu den permanenten kovalenten *cross-links* (s. Kapitel 1.1). Durch enzymatische Quervernetzung können Gele aus wesentlich geringer konzentrierten Proteinlösungen erzeugt werden als durch Hitzebehandlung. Elastische Moduli und Bruchfestigkeit enzymatisch vernetzter Gele übertreffen die Hitze-induzierter Gele unter gleichen Bedingungen (Dickinson, 1997, 2012).

### 1.2.2 Enzyme in der Lebensmittelindustrie

Zum heutigen Zeitpunkt finden Enzyme aus Mikroorganismen bzw. tierischer oder pflanzlicher Herkunft häufig Anwendung in der Aromaentwicklung von Lebensmitteln, zur Stabilisierung der Farbe, zur Hemmung des Bakterienwachstums oder zum Abbau von reaktiven Sauerstoffspezies (Zeeb *et al.*, 2014). Weitere erstrebenswerte Verbesserungen werden hinsichtlich Erscheinungsbild, Konsistenz, Geschmack, Löslichkeit, Textur und Ausbeute erzielt. Enzymatische Modifikationen erleichtern zudem die Verarbeitung von Lebensmitteln.

Enzymatische Proteinspaltung stellt einen allgemein bekannten Weg zur Lebensmittelherstellung dar (Panyam *et al.*, 1996). So erfolgt das Dicklegen von Milch für die Käseherstellung mit Hilfe der Peptidase Chymosin. Neben Lipasen begünstigen Peptidasen zudem die Aromaentwicklung bei der Käsereifung. Auch die traditionelle Herstellung von Sojasauce basiert auf Peptidaseaktivität. Die Enzyme spalten während der Fermentation das Sojaprotein in Aminosäuren auf und bestimmen so Geschmack und Farbe des Produkts. Verschiedene Hitze-stabile Peptidasen pflanzlichen Ursprungs wie Papain werden zum Zartmachen von Fleisch eingesetzt. Der enzymatische Strukturabbau von weiteren

Biopolymeren, z. B. Kohlenhydraten, wird ebenfalls bei der Lebensmittelherstellung genutzt. Durch Einsatz von Lactasen zur Spaltung von Lactose wird die Produktion lactosefreier Milchprodukte ermöglicht (Lösche, 2000; Simpson *et al.*, 2012).

Bei der Brotteigerherstellung werden hydrolytisch arbeitende Enzyme (Peptidasen, Amylasen, Xylanasen), welche Polysaccharide oder Gluten im Mehl abbauen, kombiniert mit Oxidasen, die wiederum eine Quervernetzung katalysieren, wodurch Handhabung des Teiges, Brotkrume und Teigvolumen verbessert werden (vgl. Tab. 1-2). Oxidoreduktasen konnten chemische Oxidantien wie Ascorbat oder Kaliumbromat substituieren, die früher in Backprozessen eingesetzt wurden. Der Einsatz von Asparaginasen bei der Backwarenherstellung vermindert durch Abbau der Aminosäure Asparagin im Mehl die Bildung von giftigem Acrylamid beim Backvorgang. Die Klärung von Bier, Wein und Säften kann mit Hilfe verschiedener Enzyme gewährleistet werden, indem kolloidale Biopolymere abgebaut oder aggregiert werden (Aehle, 2007; Grunwald, 2015; Simpson *et al.*, 2012; Zeeb *et al.*, 2014).

Darüber hinaus bieten Enzyme die Möglichkeit, über die Einführung von intra- und intermolekularen *cross-links* einerseits die Lagerstabilität von Lebensmitteln und andererseits die sensorischen Eigenschaften wie Textur, Aussehen und Aroma zu verbessern. Für die Protein- bzw. Texturmodifizierung in Lebensmitteln eignen sich vor allem jene Enzyme, welche auch bei der Stärkung von lebendem Gewebe durch Protein-*cross-linking* eine wichtige Rolle einnehmen (vgl. Kapitel 1.1.1) (Dickinson, 1997). Die wichtigsten Enzymklassen, die für die Vernetzung von Proteinen in Lebensmitteln in Frage kommen, sind in Tab. 1-2 aufgelistet. Das große Potential von Enzymen, durch Vernetzung von Lebensmittelproteinen neue Strukturen zu entwickeln, wird zum heutigen Zeitpunkt nicht vollständig ausgeschöpft.

Für den Einsatz im Lebensmittel müssen Enzyme bestimmte Vorgaben und gesetzliche Vorlagen erfüllen. Sie sollten Cofaktor-frei arbeiten, über einen weiten pH-Bereich aktiv sein und Temperaturen bis 50 °C vertragen. Des Weiteren sollte das entsprechende Enzym kommerziell in großen Mengen verfügbar sein. Wird ein Enzym von der *Food and Drug Administration* (FDA) als nicht toxisch und nicht immunogen bewertet, erhält es GRAS (*generally recognised as safe*)-Status und kann im Lebensmittelbereich eingesetzt werden (Aehle, 2007; Olempska-Beer *et al.*, 2006). In der Europäischen Union werden Zulassung und Inverkehrbringen solcher Enzyme von der *European Food Safety Authority* (EFSA) geregelt.

Je besser die Vernetzungsreaktionen der verschiedenen Enzyme untersucht und verstanden werden, desto größer wird ihr potentiell Einsatzgebiet, wie das Beispiel der Transglutaminase zeigt (vgl. Kapitel 1.3.4 und Tab. 1-2). Zukünftig können Enzyme durch Proteinvernetzung eine Herstellung von salz- und fettarmen Lebensmitteln, z. B. Fleischprodukten, gewährleisten (Buchert *et al.*, 2007; Gerrard, 2002). Es besteht die Möglichkeit der Erzeugung neuartiger Lebensmittelprodukte durch Vernetzung verschiedener Biopolymere aus Milch, Fleisch und Getreide. Die Herstellung von Makromolekülen mit



einzigartigen Eigenschaften durch *cross-linking* von Proteinen mit Polysacchariden ist vorstellbar (Buchert *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2012; Flanagan *et al.*, 2006; Selinheimo *et al.*, 2008). Auch Veränderungen einzelner Inhaltsstoffe oder die Erhöhung des Nährwerts von Lebensmittelproteinen durch Vernetzung mit essentiellen Aminosäuren wie Lysin oder Methionin sind möglich (Matheis *et al.*, 1985; Seguro *et al.*, 1996b; Yokoyama *et al.*, 2004).

Entscheidend bei Vernetzungen von Proteinen in Lebensmitteln ist der Erhalt des Nährwerts. So sind durch Transglutaminase quervernetzte Lysylseitenketten weiterhin für die Verdauung zugänglich (Roos *et al.*, 2004; Seguro *et al.*, 1996a), während *cross-links*, die aus Maillard-Reaktionen bzw. Reaktionen von Dehydroproteinen resultieren, nur geringfügig durch biologische Abbauprozesse umgewandelt werden können. Sind vorrangig essentielle Aminosäuren in das *cross-linking* involviert, so mindert dies den Nährwert der vernetzten Proteine, falls die neugebildeten Bindungen durch chemische und enzymatische Abbauprozesse des Verdauungstraktes nicht aufgebrochen werden können. Aus Tab. 1-1 und Fig. 1-2 wird ersichtlich, dass diese Tatsache hauptsächlich ein Problem der unkontrolliert ablaufenden Reaktionen unter alkalischen Bedingungen (Dehydroproteine) bzw. zwischen reduzierenden Zuckern und Aminogruppen der Aminosäuren (Maillard-Reaktionen) darstellt. Dennoch muss die Verwertbarkeit der Aminosäuren *in vivo* auch für enzymatisches *cross-linking* abgesichert sein. Weitere Studien belegen positive Effekte durch das enzymatische Vernetzen von Lebensmittelproteinen. So konnte das allergene Potential von  $\beta$ -Casein durch Vernetzung mit einer Laccase aus *Trametes hirsuta* und einer Tyrosinase aus *Agaricus bisporus* in Verbindung mit Kaffeesäure als Mediator gesenkt werden (Stanic *et al.*, 2010). Vergleichbare Ergebnisse wurden durch Behandlung von  $\beta$ -Lactoglobulin mit einer Laccase aus *Trametes versicolor* und phenolischen Verbindungen erzielt (Tantoush *et al.*, 2011).

### 1.3 Quervernetzung in Milchprodukten

#### 1.3.1 Proteinfractionen der Milch

Milch ist ein polydisperses System, welches sich aus einer wässrigen Phase, emulgierten Fettkügelchen und kolloidal dispergierten Proteinen, in Form von Caseinmicellen und globulären Serumproteinen, zusammensetzt. Durch Lichtstreuung an den Fettkügelchen und Caseinmicellen erscheint die Milch weiß. Im Folgenden wird Kuhmilch vereinfacht als Milch bezeichnet, da Milchprodukte in Deutschland zum Großteil aus Kuhmilch hergestellt werden. Diese Milch setzt sich zusammen aus 87,4 % Wasser, 4,7 % Lactose, 3,8 % Fett, 3,3 % Protein und 0,7 % Mineralstoffen. Die für diese Arbeit wichtigste Fraktion der Milchbestandteile bilden die Proteine. Die Proteine der Milch weisen neben ausgezeichneten funktionellen Eigenschaften auch eine hohe biologische Wertigkeit auf und werden anhand ihrer Fällung bei pH 4,6 in zwei Hauptgruppen unterschieden. Die mit 80 % größte Gruppe der

Milchproteine, die Caseine, fallen bei pH 4,6 aus. Sie können so von den Molkenproteinen, welche die restlichen 20 % der Milchproteine ausmachen, abgetrennt werden. Die Caseine werden weiterhin unterteilt in  $\alpha_{s1}$ -,  $\alpha_{s2}$ -,  $\beta$ - und  $\kappa$ -Casein, die in verschiedenen Mengenanteilen vorliegen, sowie geringe Mengen an  $\gamma$ - und  $\lambda$ -Casein, die durch enzymatischen Abbau aus  $\alpha_s$ -Casein hervorgehen.

Allgemein weisen die Caseine einen hohen Anteil der Aminosäure Prolin auf, welche gleichmäßig über die Moleküle verteilt sind und so die Ausbildung geordneter Strukturen wie  $\alpha$ -Helices oder  $\beta$ -Faltblätter verhindern. Zusätzlich dazu resultieren das Fehlen von Disulfidbrücken, eine ungleiche Verteilung von Ladungen und hydrophoben Bereichen in einer offenen und flexiblen Struktur der Caseine. Strukturell bedingt sind diese Proteine nicht denaturierbar sowie hitze- und druckstabil, jedoch leicht zugänglich für peptidolytischen Abbau. Die einzelnen Caseine weisen unterschiedliche Mengen an Phosphoserinresten auf, an denen bevorzugt Calciumionen binden, die zur Löslichkeit der Caseine beitragen.

Zu den Molkenproteinen werden  $\alpha$ -Lactalbumin,  $\beta$ -Lactoglobulin, Serumalbumin, Immunglobuline und Lactoferrin gezählt. Im Gegensatz zu den Caseinen handelt es sich um globuläre Proteine, welche durch Druck oder Hitze denaturierbar, aber schlechter von peptidolytisch wirkenden Enzymen angreifbar sind (Belitz *et al.*, 2009; Dalgleish, 2011; Simpson *et al.*, 2012).

### 1.3.2 Organisation des Caseins und Struktur von Micellen

In der Milch liegen 90-95 % der Caseine aggregiert vor. Über elektrostatische Wechselwirkungen (vorwiegend Calciumphosphatbindungen), hydrophobe Interaktionen und Wasserstoffbrückenbindungen kommt es zur Zusammenlagerung der Caseinmonomere zu kolloidal dispergierten Partikeln, die als Micellen bezeichnet werden (Belitz *et al.*, 2009). Der genaue Aufbau von Caseinmicellen ist bis heute nicht vollständig geklärt und Objekt wissenschaftlicher Diskussionen (Dalgleish, 2011; de Kruif *et al.*, 2012; Holt *et al.*, 2013; Horne, 2006; Walstra, 1999). Bekannt ist, dass Micellen bis zu 250.000 Caseinmoleküle umfassen und mit Durchmessern von 50 bis 300 nm eine relativ breite Größenverteilung aufweisen.

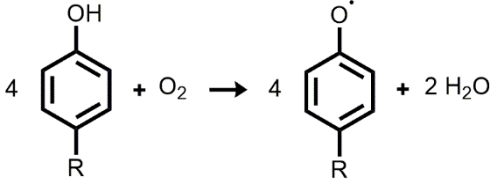
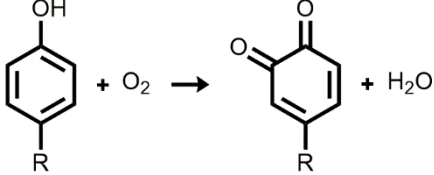
Verschiedene Modelle für die Micellstruktur wurden entwickelt, doch der Aufbau des Micellinneren bleibt bis heute gemeinhin ungeklärt. Weitgehend akzeptiert sind das Submicell-Modell und das Nanocluster-Modell. Das Submicell-Modell nach Walstra (1999) stützt sich auf elektronenmikroskopische Untersuchungen und beschreibt die Micelle als sphärischen Körper ohne glatte Oberfläche, aufgebaut aus kleineren Untereinheiten (Submicellen). Diese bestehen hauptsächlich aus Caseinen in unterschiedlicher Zusammensetzung. Durch Calciumphosphatcluster sind die Submicellen untereinander verbrückt (Fig. 1-3a).

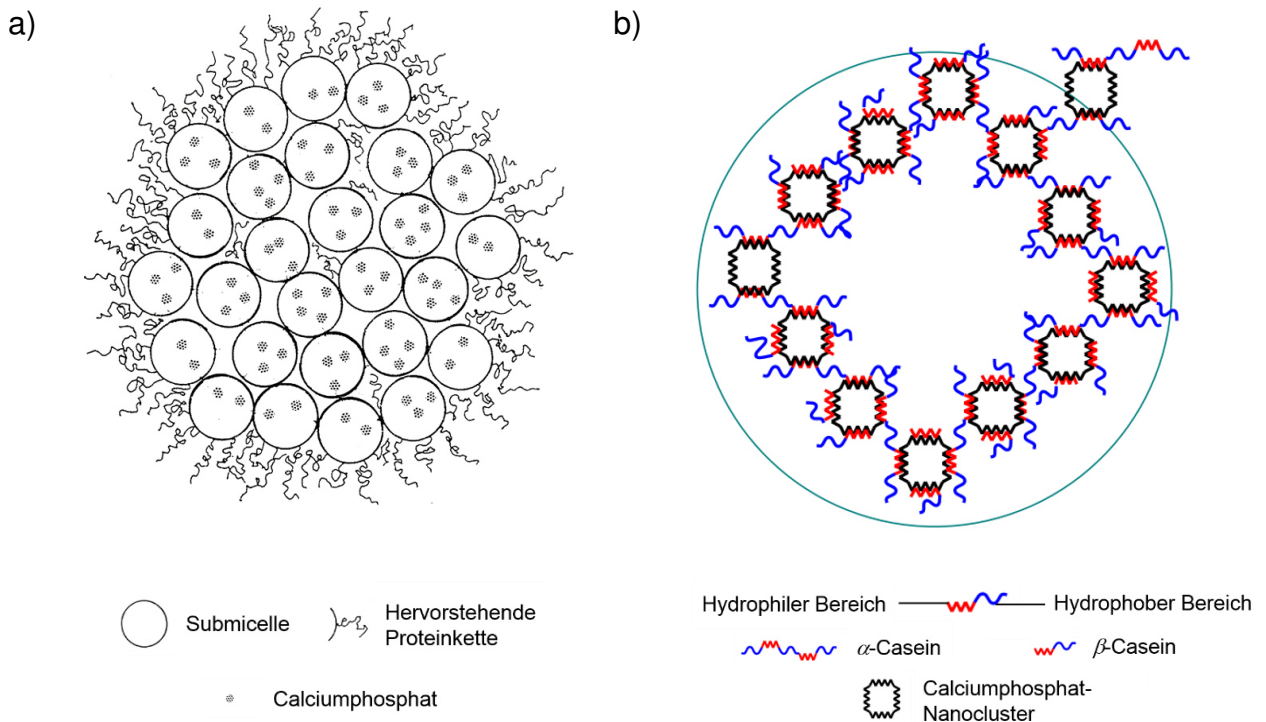
**Tab. 1-2** Kommerzielle und potentielle Enzyme zur Quervernetzung in der Lebensmittelindustrie (Aehle, 2007; Belitz *et al.*, 2009; Buchert *et al.*, 2010; Gerrard, 2002; Leonhardt *et al.*, 2013; Lösche, 2000; Lucero *et al.*, 2006; Matheis *et al.*, 1984; Olempska-Beer *et al.*, 2006; Shewry *et al.*, 1997; Simpson *et al.*, 2012; H. Singh, 1991; Zeeb *et al.*, 2014)

Enzym (EC)	Reaktion Vernetzungsmechanismus	Zielsubstrat	Anwendung im Lebensmittel	Biologische Herkunft*
Transglutaminase (2.3.2.13)	$\text{Gln}-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{NH}_2 + \text{H}_2\text{N}-\text{R} \rightarrow \text{Gln}-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{N}-\text{R} + \text{NH}_3$ <p>Bildung von Isopeptidbindung mit Lysylseitenketten</p>	Glutamylseitenketten von Proteinen	Quervernetzung in Proteinreichen Lebensmitteln wie Fisch, Schinken, Würsten und Milchprodukten sowie Teigen	<i>Streptomyces mobaraensis</i>
Peroxidase (1.11.1.-)	$2 \text{AH}_2 + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2 \text{AH}^\cdot + 2 \text{H}_2\text{O}$ <p>Oxidation aromatischer Gruppen: Radikalbildung, anschließend spontane Radikalkopplungen</p>	Tyrosylseitenketten von Proteinen; phenolische Verbindungen	Entfernen von H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> aus Lebensmitteln Entfernen von O <sub>2</sub> im Kopfraum von Flaschen Teigverbesserung	Meerrettich
Glucose-Oxidase (1.1.3.4)	$\beta\text{-D-Glucose} + \text{O}_2 \rightarrow \text{D-Glucono-1,5-lacton} + \text{H}_2\text{O}_2$ <p>Oxidation von Glucose in Verbindung mit Erzeugen von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, welches u. a. mit freien Thiolgruppen zu Disulfidbrücken reagiert</p>	$\beta$ -D-Glucose	Verbesserung Brotteigtextur Entfernen von Glucose aus Hühnereiweiß	<i>Aspergillus</i> spp., <i>Penicillium</i> spp.
Hexose-Oxidase (1.1.3.5)		$\beta$ -D-Glucose, D-Galactose, Cellobiose, Maltose	Vermeidung von nicht-enzymatischen Bräunungsreaktionen (Maillard) und <i>off-flavor</i> -Entwicklung	<i>Chondrus crispus</i>
Lipoxygenase (1.13.11.12)	$\text{Fettsäure} + \text{O}_2 \rightarrow \text{Fettsäurehydroperoxid}$ <p>Hydroperoxide zerfallen in Säuren, Ketone und Aldehyde und reagieren weiter: a) mit verschiedenen Seitenketten in Proteinen (Cystein, Methionin, Tryptophan, Histidin), b) Oxidation von Thiolgruppen zu Disulfidbrücken, c) Protein-<i>cross-linking</i> durch freie Hydroperoxidradikale, d) <i>cross-linking</i> von Fettsäuren mit Proteinen, e) Quervernetzung durch reaktives Malondialdehyd</p>	mehrfach ungesättigte Fettsäuren, z. B. Linolsäure, Linolensäure, Arachidonsäure	Vernetzung von Gluten im Teig: Verbesserung der viskoelastischen Teigeigenschaften Teigbleichung	Sojamehl, <i>Pleurotus</i> spp.

\* Einschließlich heterologer Enzyme

Fortsetzung Tab. 1-2

Laccase (1.10.3.2)	 $4 \text{ Ar-OH} + \text{O}_2 \rightarrow 4 \text{ Ar-O}^\bullet + 2 \text{H}_2\text{O}$	Tyrosylseitenketten von Proteinen; phenolische Verbindungen, Cystein	Verbesserung der viskoelastischen Teigeigenschaften durch Vernetzung von Gluten im Teig	<i>Pleurotus ostreatus</i> , <i>Aspergillus oryzae</i>
Oxidation aromatischer Gruppen: Radikalbildung, anschließend spontane Radikalkopplungen				
Tyrosinase (1.14.18.1)	 $\text{Ar-OH} + \text{O}_2 \rightarrow \text{Ar=O} + \text{H}_2\text{O}$	Tyrosylseitenketten von Proteinen; phenolische Verbindungen	Farb- und Geschmacksverstärkung in Kaffee, Tee, Kakao Verbesserung der viskoelastischen Teigeigenschaften durch Vernetzung von Gluten im Teig	<i>Agaricus bisporus</i> , <i>Neurospora crassa</i> , <i>Trichoderma reesei</i> , <i>Pycnoporus sp.</i> , <i>Trametes sp.</i>
Thiol-Oxidase (1.8.3.2)				
Glutathion-Oxidase (1.8.3.3)	$2 \text{ R-SH} + \text{O}_2 \rightarrow \text{R-S-S-R} + \text{H}_2\text{O}_2$	Cysteinylseitenketten von Proteinen	Aromakontrolle in ultrahoch erhitzter Milch Verbesserung der viskoelastischen Teigeigenschaften durch Vernetzung von Gluten im Teig	Kuhmilch Hühnereiweiß, Mikroorganismen ( <i>Aspergillus</i> , <i>Penicillum</i> , <i>Saccharomyces</i> )
Lysyl-Oxidase (1.4.3.13)	Oxidative Desaminierung von Lysin, resultierende Aldehyde reagieren anschließend mit weiteren Aldehyden, Lysin, $\delta$ -Hydroxylysin oder Histidin	Lysylseitenketten von Proteinen	noch nicht erforscht, da kein kommerzielles Präparat verfügbar	
Proteindisulfid-Isomerase (5.3.4.1)	Bildung und Abbau von Disulfidbrücken zwischen Cysteinresten im Protein	Disulfidbrückenbindungen, Cysteinylseitenketten	Vernetzung von Gluten	in Geweben von Wirbeltieren, Erbsen, Kohl, Weizen



**Fig. 1-3** Strukturmodelle von Caseinmicellen: a) Querschnitt durch das Submicell-Modell nach Walstra, b) Wachstum einer Caseinmicelle nach dem Nanocluster-Modell von Holt (1992) (Horne, 2006; Walstra, 1999)

Das  $\kappa$ -Casein befindet sich an der Außenseite der Micelle, wobei das C-terminale, hydrophile Ende (Caseinomakropeptid) des  $\kappa$ -Caseins aus der Micelle herausragt und eine Art haarige Schicht (*hairy layer*) ausbildet (Fig. 1-3a). Diese ist für die starke Hydratisierung der Caseinmicelle verantwortlich und verhindert bei physiologischem pH-Wert der Milch zu starke Micell-Micell-Wechselwirkungen durch sterische und elektrostatische Abstoßung (Lucey, 2002). Das Nanocluster-Modell nach Holt (1992) unterstützt die Annahme des *hairy layer*, nicht jedoch die Existenz von Submicellen. Holt (1992) beschreibt die Caseinmicellen als thermodynamisch stabile Komplexe in Verbindungen mit Nanoclustern aus Calciumphosphat, auch bedingt durch die ungefaltete Struktur der Caseine (Fig. 1-3b). Berechnungen aus Studien mit Kleinwinkel-Neutronenstreuung und -Röntgenstreuung unterstützen das Modell nach Holt (de Kruif *et al.*, 2012). Im Gegensatz zu diesen zwei klassischen Konzepten liefert das *dual-binding*-Modell nach Horne (1998) Erklärungen für eine Vielzahl beobachteter Phänomene, insbesondere das rheologische Verhalten von Milchproteingelen (Lucey, 2002). Horne (1998) schlägt ein Polykondensationsmodell vor, bestehend aus zwei Prozessen. Es wirken einerseits hydrophobe Anziehungskräfte zwischen den Caseinen und andererseits elektrostatische Interaktionen durch kolloidales Calciumphosphat. Die Bildung der Micelle wird dabei als Gleichgewicht anziehender und repulsiver Kräfte angesehen, welche letztendlich auch das Micellwachstum begrenzen. Neuere mikroskopische Untersuchungen haben wiederum gezeigt, dass die Micelloberfläche über Poren und Eingänge verfügt, die den Zugang zum Micellinneren ermöglichen. Im Inneren der Micelle befinden

sich die Calcium-sensitiven Caseine in poröser Struktur, welche von Domänen und Wasserkanälen durchzogen sind (Dalglish, 2011; Knudsen *et al.*, 2010; Marchin *et al.*, 2007).

### 1.3.3 Milchproteingele

Die Herstellung von fermentierten Milchprodukten basiert auf Säure-induzierter Gelierung der Milchproteine. Mittels thermophiler Milchsäurebakterien wie *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* oder *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* wird Lactose zu Milchsäure umgesetzt, was ein Absinken des pH-Werts zur Folge hat. Die Struktur des Proteinnetzwerks, welches während der Gelierung ausgebildet wird, sowie die innerhalb des Netzwerks bestehenden intermolekularen Wechselwirkungen bestimmen die Textureigenschaften und das Wasserhaltevermögen eines sauren Milchgeles (Lucey, 2002, 2008).

Der Fermentationsschritt während der Joghurtherstellung bewirkt das Absinken des pH-Werts in der Milch. Dies wirkt sich durch die Abnahme elektrostatischer Abstoßungskräfte und weiterer physikalischer Wechselwirkungen sowohl auf die physikochemischen Eigenschaften der Caseinmicellen als auch auf die Micell-Micell-Interaktionen aus. Gelbildungsprozesse finden statt, während der sich Caseinpartikel zu Strängen und Clustern verbinden und letztendlich ein dreidimensionales Gelnetzwerk bilden. Schließlich führen alle diese Mechanismen zum Ausfällen der Caseine (Lucey, 2002, 2008).

Milchproteingele wie Joghurt weisen sowohl Eigenschaften von Partikel- als auch von Polymergelen auf und verfügen über viskoelastische Eigenschaften. Die rheologischen Charakteristika saurer Milchgele werden durch Anzahl und Art bzw. Stärke der Bindungen und Wechselwirkungen zwischen bzw. innerhalb der Caseinmicellen sowie ihrer räumlichen Verteilung beeinflusst. Im Gegensatz zu vielen anderen Lebensmittelgelen weisen Milchproteingele eine unechte Strukturviskosität auf, was sich in einem irreversiblen Strukturabbau infolge von Scherbelastung äußert (Figura *et al.*, 2007; Lucey, 2002). Eine Quantifizierung der physikalischen Eigenschaften kann über dynamische rheologische Messungen erfolgen und wird ausgedrückt durch die komplexe Scherviskosität  $\eta^*$ , das Speichermodul  $G'$ , das Verlustmodul  $G''$  sowie den Verlustfaktor  $\tan \delta$ . Die mathematischen Zusammenhänge zwischen den Messgrößen sind in Tab. 1-3 zusammengefasst.

Die Eigenschaften der Milchproteine und die Prozesse der Organisation in Proteinnetzwerken beeinflussen eine potentielle enzymatische Quervernetzung. So sind Molkenproteine aufgrund ihrer globulären Struktur weniger für das *cross-linking* geeignet als die Caseine mit einer offenen Tertiärstruktur, da der Zugang zu den reaktiven Aminosäureseitenketten für die meisten Enzyme erschwert ist (Dickinson, 1997; Steffensen *et al.*, 2008). Zudem muss eine Enzymaktivität bei einem

Joghurt-pH-Wert von etwa 4,5 gewährleistet und eine Inhibierung durch Milch eigene Inhaltsstoffe ausgeschlossen sein (vgl. Kapitel 1.1.3).

Der Einsatz von vernetzenden Enzymen in fermentierten Milchprodukten ermöglicht die Verbesserung von sensorischen und Textureigenschaften. Bereits die Einführung einer geringen Zahl an kovalenten *cross-links* durch Enzyme führt zu Milchproteingelen mit erhöhter Gelstärke, verbesserter Elastizität und geringerer Synäreseneigung (Lauber *et al.*, 2000; Lorenzen *et al.*, 2002). Konventionell wird dies durch den Zusatz von Polysacchariden oder Hydrokolloiden realisiert, was Joghurtattribute wie Textur, Geschmack und Wasserkapazität auf negative Weise verändern kann. Der Zusatz von Milchprotein (z. B. Molkenproteinkonzentrat oder Magermilchpulver) zur Erhöhung des Feststoffanteils im Joghurt ist mit hohen Kosten verbunden (Loveday *et al.*, 2013; Simpson *et al.*, 2012).

**Tab. 1-3** Übersicht über rheologische Messgrößen zur Quantifizierung viskoelastischer Eigenschaften (Figura *et al.*, 2007; Mezger, 2012; Tunick, 2000)

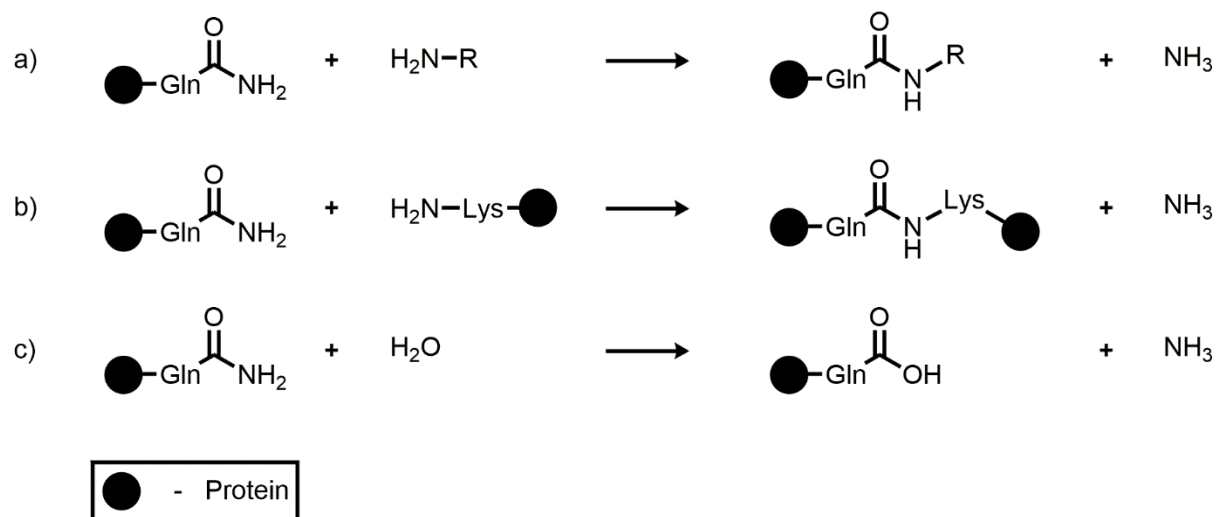
Messgröße	Formelzeichen	Mathematischer Zusammenhang	abgeleitete Information
Komplexe Scherviskosität	$\eta^*$	$\eta^* = G^* / \omega$	viskoelastische Fließeigenschaften $\omega$ - Kreisfrequenz
Komplexer Schermodul	$G^*$	$G^* = G' + i \cdot G''$	Frequenz-abhängige viskoelastische Eigenschaften i – komplexe Zahl
Speichermodul	$G'$	$G' = G^* \cdot \cos \delta$	gespeicherte Energie im Deformationszyklus elastisches bzw. Feststoff-artiges Verhalten
Verlustmodul	$G''$	$G'' = G^* \cdot \sin \delta$	verbrauchte Energie im Deformationszyklus viskoses bzw. Flüssigkeits-ähnliches Verhalten
Verlustfaktor	$\tan \delta$	$\tan \delta = G'' / G'$	Verhältnis der viskosen und elastischen Anteile einer Probe

Das Konzept des enzymatischen *cross-linking* wurde sowohl in der Backwarenherstellung als auch in der Fleischproduktion erfolgreich zur Verbesserung von Produkteigenschaften angewandt (vgl. Tab. 1-2 und Kapitel 1.2.2) (Buchert *et al.*, 2007; Buchert *et al.*, 2010; Simpson *et al.*, 2012). Bei der Vernetzung von fermentierten Milchprodukten gibt es erste vielversprechende Studien mit Transglutaminase, aber noch keine marktreife Anwendung (Færgemand *et al.*, 1999b; Ozer *et al.*, 2007).

### 1.3.4 Transglutaminasen

Mit der Entdeckung der mikrobiellen Transglutaminase (mTG) aus *Streptomyces mobaraensis* im Jahr 1989 begann die kommerzielle Nutzung der enzymatischen Quervernetzung im Lebensmittelbereich

(Jaros *et al.*, 2006). Allgemein werden Transglutaminasen (EC 2.3.2.13, Protein-Glutamin- $\gamma$ -Glutamyltransferasen) der Enzymklasse der Transferasen zugeordnet. Sie katalysieren die Acyltransferreaktion zwischen der  $\gamma$ -Carboxyamidgruppe von Peptid-gebundenen Glutaminresten als Acyldonor und einer Vielzahl von primären Aminen als Acylakzeptor (Fig. 1-4). Mit Hilfe von Transglutaminase-katalysierten *cross-linking*-Reaktionen können Aminosäuren oder Peptide an Proteine gebunden werden, z. B. um den Nährwert eines Lebensmittels zu erhöhen (Matheis *et al.*, 1985; Seguro *et al.*, 1996b; Yokoyama *et al.*, 2004). Handelt es sich bei dem Acylakzeptor um die  $\epsilon$ -Aminogruppe eines Protein-gebundenen Lysins, so kommt es zur intra- bzw. intermolekularen Quervernetzung von Proteinen (Fig. 1-4b). Diese Verknüpfungen, auch als Isopeptidbindungen bezeichnet, können zur Ausbildung eines Proteinnetzwerks führen. Die Transglutaminase ist auf Glutamin als Acyldonor limitiert, weist aber eine geringe Spezifität bezüglich der Acylakzeptoren auf. In Abwesenheit von Acylakzeptoren kommt es in Gegenwart von Wasser zur Desamidierung von Glutamin (Fig. 1-4c). In jeder dieser Reaktionen wird ein Molekül Ammoniak freigesetzt (Jaros *et al.*, 2006; Motoki *et al.*, 1998).



**Fig. 1-4** Reaktionen der Transglutaminasen (Motoki *et al.*, 1998): a) Acyltransferreaktion, b) Vernetzungsreaktion zwischen Protein-gebundenem Glutamin und Lysin, c) Desamidierung in Gegenwart von Wasser

Transglutaminasen sind in der Natur weit verbreitet und übernehmen eine Vielzahl wichtiger biologischer Funktionen. Unter anderem nimmt dieses Enzym eine Schlüsselrolle in der Wundheilung und Blutgerinnung ein (vgl. Kapitel 1.1.1). Die meisten dieser Transglutaminasen weisen jedoch eine Calciumabhängigkeit auf und eignen sich nicht für den Einsatz im Lebensmittelbereich, da die Anwesenheit von Calciumionen in einigen Lebensmittelsystemen zur unerwünschten Präzipitation von Proteinen führt (Motoki *et al.*, 1998). Erst die Entdeckung der Calcium-unabhängigen mTG ermöglichte die Proteinvernetzung in der Lebensmittelproduktion. Das Enzym weist eine geringe Substratspezifität auf und wird vom produzierenden Organismus in das Kulturmedium sekretiert, wodurch die Aufreinigung erleichtert wird. Die mTG ist ein monomeres Enzym von etwa 38 kDa mit einem pH-



Optimum von 6,0 bis 7,0. Im Bereich von pH 4,0 bis 9,0 zeigt es eine Restaktivität und eine gute Stabilität über einen weiten pH-Bereich. Das Temperaturoptimum liegt bei 50 °C. Inhibiert wird das Enzym durch Cystamin, Monoiodessigsäure, *para*-Chlormercuribenzoessäure und einigen Schwermetallionen ( $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ), die mit der freien Thiolgruppe im aktiven Zentrum des Enzyms reagieren. Daneben existieren kaum natürliche Inhibitoren für mTG, abgesehen von einigen spezifischen Peptiden, Cerulenin und einem Temperatur-sensitiven Inhibitor des Milchserums (Bönisch *et al.*, 2004; De Jong *et al.*, 2003; Jaros *et al.*, 2006; Motoki *et al.*, 1998).

Der kommerzielle Erfolg der mTG begründet sich auch auf die gute Verfügbarkeit und den damit einhergehenden geringen Preis. Das kommerzielle Präparat ACTIVA® (Ajinomoto, Japan) erhielt den Beinamen „Fleischkleber“, da Fleischstücke minderer Qualität mit diesem Enzym zusammengefügt werden können unter gleichzeitigem Erhalt der Fleischstruktur. In einer Vielzahl von Lebensmitteln (Fleisch- und Fischprodukte, Backwaren, Pasta) wird mTG eingesetzt, um Eigenschaften wie Festigkeit, Elastizität, Wasserkapazität und Hitzestabilität zu verbessern. Zudem zeigte eine Studie, dass mTG das allergene Potential von Weizenmehlen senken konnte (Watanabe *et al.*, 1994).

Der Einsatz von mTG in Milchprodukten wurde bereits intensiv beforscht. Alle Caseine wurden von mTG gut vernetzt, jedoch eignete sich Caseinat besser als intakte Caseinmicellen in Milch (Bönisch *et al.*, 2004; Jaros *et al.*, 2006; Lorenzen *et al.*, 1998). In nicht erhitzter Milch wurde  $\kappa$ -Casein besser vernetzt als  $\beta$ -Casein,  $\alpha$ -Casein wurde nur geringfügig umgesetzt. Bereits eine kleine Anzahl an reaktiven Vernetzungsstellen reichte aus, um eine vollständige Oligomerisierung zu erreichen (Lauber *et al.*, 2000; Lorenzen *et al.*, 1998). Studien zeigten aber auch, dass Caseine nach einer Hitzebehandlung von mTG stärker vernetzt wurden (Bönisch *et al.*, 2004; R. Sharma *et al.*, 2001). Die nativen Molkenproteine waren ohne vorherigen Denaturierungsschritt schlechte Substrate für mTG, wobei natives  $\beta$ -Lactoglobulin gar nicht vernetzt wurde. Eine Erhöhung der Proteinkonzentration oder eine Behandlung mit Glutathion bewirkten höhere Vernetzungsgrade (Jaros *et al.*, 2006).

Weitere Studien befassten sich mit der Gelbildung von fermentierten Milchprodukten. Hier zeigte mTG jedoch eine nicht zufriedenstellende Vernetzungseffizienz, da die katalytische Wirkung auf für das Enzym zugängliche Glutanyl- und Lysylseitenketten beschränkt ist. Da das pH-Optimum des Enzyms im neutralen pH-Bereich liegt, wurde es bereits vor dem Fermentationsprozess zugesetzt. Die Transglutaminase-Behandlung vor dem Zusatz der Starterkultur hatte jedoch einen verlängerten Fermentationsprozess zur Folge (Færgemand *et al.*, 1999b; Ozer *et al.*, 2007). Auch wurden negative Auswirkungen auf das Aromaprofil des Joghurts und dessen Säure festgestellt (Færgemand *et al.*, 1999a; Lorenzen *et al.*, 2002).

Dennoch konnte durch den Einsatz von mTG ein Magermilchjoghurt entwickelt werden, welcher ohne zusätzliche Stabilisatoren oder Proteine auskommt und gleichzeitig vergleichbare physikalische und sensorische Eigenschaften aufwies (Iličić *et al.*, 2014; Lorenzen *et al.*, 2002). Auch zeigten saure

Milchgele aus mTG-behandelter Milch oder Caseinat eine homogene Mikrostruktur in Form eines feinen Netzwerks mit kleinen Poren und eine verringerte Synerese im Vergleich zu Gelen aus unbehandelten Proteinen (Færgemand *et al.*, 1997; Færgemand *et al.*, 1999b; Lorenzen *et al.*, 2002; Schorsch *et al.*, 2000). Des Weiteren wurde mit mTG die Festigkeit von Käse verbessert (Di Pierro *et al.*, 2010). Mit mTG behandelte Caseinmicellen zeigten eine höhere Stabilität gegenüber Erhitzen und hohem Druck, ohne dass die Milch ausflockte (O'Sullivan *et al.*, 2002; Smiddy *et al.*, 2006). Eine zu starke Vernetzung wirkte sich allerdings negativ auf die Gelbildung aus, sodass eine verringerte Gelfestigkeit resultierte (Færgemand *et al.*, 1999b; Jaros *et al.*, 2010).

Oxidativ wirkende Enzyme aus Basidiomyceten stellen eine interessante Alternative für die Vernetzung der verschiedenen Milchproteine dar, da sowohl Tyrosinasen, Laccasen als auch Peroxidasen zumindest eine teilweise Vernetzung von Caseinen und Molkenproteinen zeigten (Buchert *et al.*, 2007).

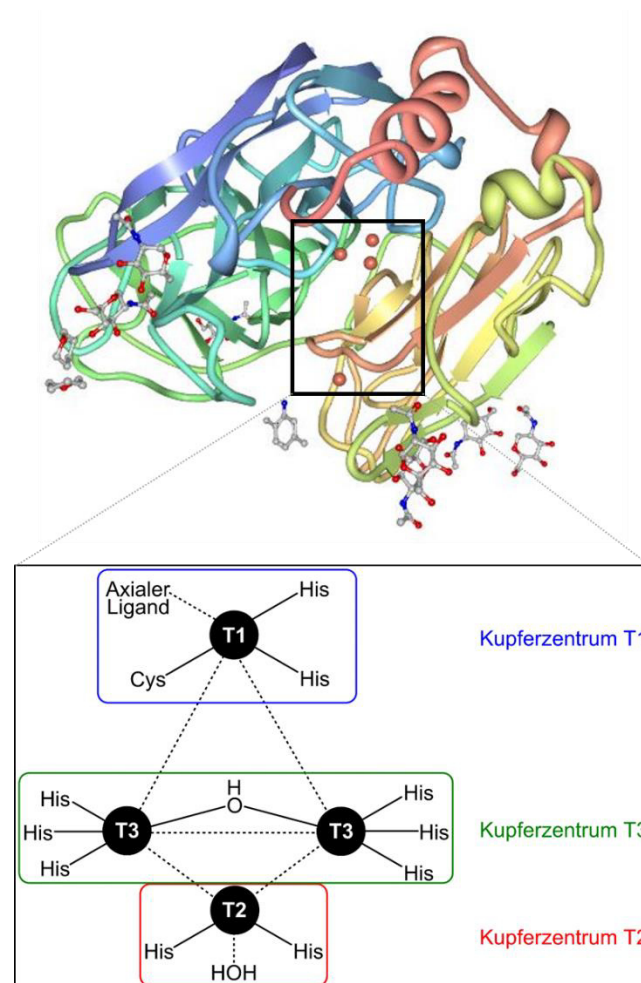
### 1.3.5 Laccasen

Innerhalb der Enzymklasse der Oxidoreduktasen (EC 1) gehören Laccasen (*p*-Benzendiol:Sauerstoff-Oxidoreduktasen; EC 1.10.3.2) zur Familie der Multikupferoxidasen. Laccasen oxidieren unspezifisch ein sehr breites Spektrum an Substratmolekülen, während gleichzeitig molekularer Sauerstoff zu Wasser reduziert wird (vgl. Tab. 1-2). Somit nehmen Laccasen eine wichtige Rolle in vielen biologischen Prozessen wie der Aktivierung und dem Binden von molekularem Sauerstoff sowie der Oxidation von Substratmolekülen ein.

Laccasen gehören zu den wenigen Enzymen, welche bereits seit Ende des 19. Jahrhunderts untersucht werden. Die erste Laccase wurde 1883 aus *Rhus vernicifera* isoliert und beschrieben (Yoshida, 1883). Diese Enzyme sind in der Natur weit verbreitet und wurden in Pflanzen, Pilzen, einigen Bakterien und Insekten nachgewiesen. Pflanzenlaccasen sind an der Ligninsynthese und der Wundheilung des Zellgerüsts beteiligt. Im Gegensatz dazu dienen pilzliche Laccasen hauptsächlich dem Abbau von Biopolymeren wie dem Lignin. Vor allem Weißfäulepilze sind potente Laccaseproduzenten. Des Weiteren sind sie an Pigmentierungsprozessen, Fruchtkörper- und Sporenbildung sowie der Entgiftung von toxischen Komponenten des Pflanzenabwehrsystems beteiligt (Baldrian, 2006; Claus, 2004; Giardina *et al.*, 2010; Mate *et al.*, 2015). Insektenlaccasen sind vermutlich in die Ausbildung des Exoskeletts involviert (Sakurai *et al.*, 2007; Sugumaran *et al.*, 1992). Bakterienlaccasen übernehmen Prozesse der Sporenbildung, der Morphologie und der zellulären Entgiftung von Kupfer (Claus, 2003; G. Singh *et al.*, 2011; Strong *et al.*, 2011).

Bei Laccasen handelt es sich um Glykoproteine. Die Glykosylierungen befinden sich hauptsächlich am Ende der Polypeptidkette, wo sie die Stabilität der Proteinkonformation garantieren und als Schutz vor

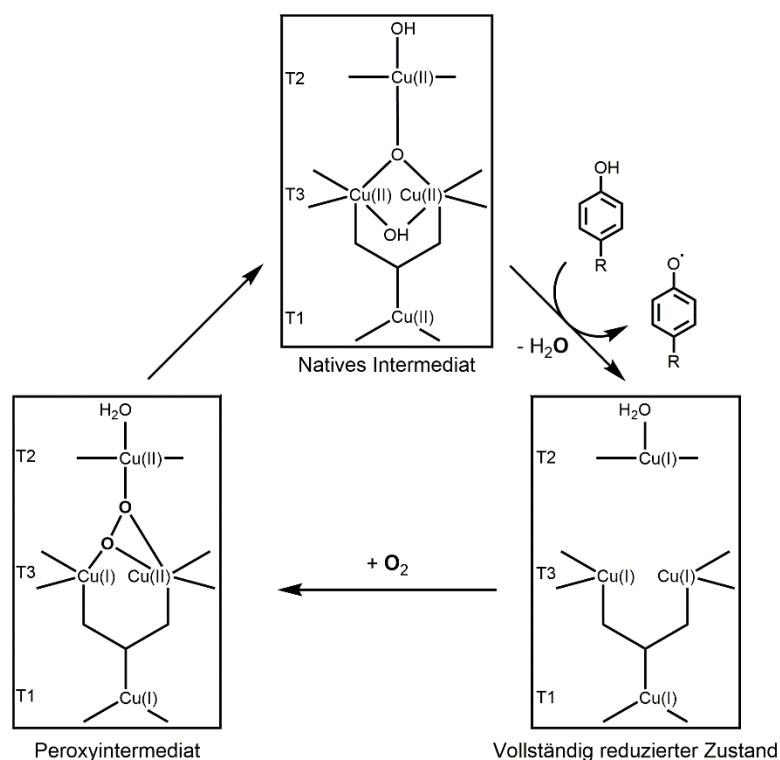
peptidolytischen Abbau dienen (Yoshitake *et al.*, 1993). Pilzlaccasen weisen einen Glykosylierungsgrad von 5 bis 30 % auf (Baldrian, 2006; Claus, 2004; Kunamneni *et al.*, 2008; Mot *et al.*, 2012). Laccasen sind meist monomere Enzyme, die ein Temperaturoptimum zwischen 50 und 70 °C und ein pH-Optimum zwischen 4 und 7 aufweisen. Die Laccaseaktivität wird bei zunehmend alkalischem pH-Wert durch die steigende Konzentration von Hydroxidionen inhibiert (Xu, 1997). Die Aktivität des Enzyms wird auch in Gegenwart verschiedener Anionen, Komplexbildner und Schwermetallionen gehemmt (vgl. Kapitel 5).



**Fig. 1-5** Struktur und katalytisches Zentrum von Laccasen: a) Kristallstruktur einer Laccase (1KYA, Protein Data Bank) von *Trametes versicolor* (Bertrand *et al.*, 2002), b) Schematischer Aufbau und Koordination der drei Kupferzentren T1, T2 und T3 (modifiziert nach Enguita *et al.* (2003))

Aufgebaut sind Laccasen aus drei Cupredoxin-ähnlichen Domänen (Fig. 1-5a), welche gleich groß und bedeutend für die katalytische Aktivität des Enzyms sind. Das aktive Zentrum von Laccasen ist ein hoch konservierter Bereich mit vier unterschiedlich koordinierten Kupferionen, welche in drei Zentren organisiert sind. Diese werden anhand ihrer spektroskopischen Eigenschaften unterteilt, wobei jedes Zentrum einer katalytischen Einheit der Laccase entspricht. Im Kupferzentrum T1 sind zwei Histidine und ein Cystein annähernd trigonal-planar um ein Kupferion (T1-Cu) orientiert. Zwei weitere nicht oder

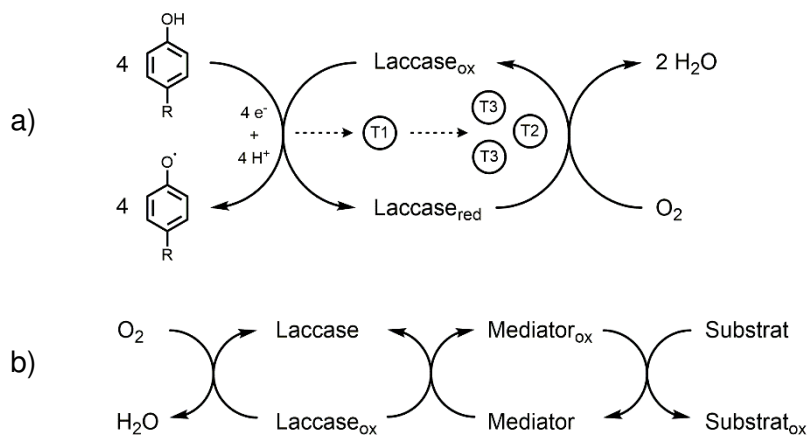
schwach koordinierende Aminosäurereste befinden sich in unmittelbarer Umgebung zu T1-Cu: ein hochkonserviertes Isoleucin (nicht dargestellt) und ein weiterer Ligand, bei dem es sich je nach Organismus um Phenylalanin, Leucin oder Methionin handeln kann und dem großer Einfluss auf das Redoxpotential der Laccase zugeschrieben wird (Tab. 1-4). Das T1-Cu ist der Ort der Einelektronenübertragung vom Substrat auf die Kupferzentren der Laccase. Im Kupferzentrum T2 wird ein weiteres Kupferion (T2-Cu) von zwei Histidinen und einem Molekül Wasser koordiniert. Im Zentrum T3 befinden sich zwei Kupferionen, die von jeweils drei Histidinresten koordiniert werden und über ein gemeinsames Hydroxidion verbrückt sind. Zwischen diesen zwei Kupferionen des T3-Zentrum wird der molekulare Sauerstoff gebunden und zu Wasser reduziert. Das T2- und T3-Zentrum sind als trinucleares Kupfercluster angeordnet (Giardina *et al.*, 2010; Rivera-Hoyos *et al.*, 2013).



**Fig. 1-6** Elektronenübertragungswege der Substratoxidation und Sauerstoffreduktion im katalytischen Zyklus von Laccasen (adaptiert nach Solomon *et al.* (2008))

Der Ort der Substratoxidation ist das T1-Kupferzentrum. Hier werden stufenweise einzelne Elektronen von vier Substratmolekülen abstrahiert und auf die Laccase übertragen, wodurch die Cu(II) im aktiven Zentrum des Enzyms vollständig zu Cu(I) reduziert werden (Fig. 1-6, Vollständig reduzierter Zustand). Die primär entstehenden Oxidationsprodukte sind hoch reaktive Substratradikale, welche in Folgereaktionen durch oxidative Kopplung neue C-C-, C-O- und C-N-Bindungen ausbilden können, woraus Dimere, Oligomere und Polymere resultieren. Die am T1-Cu aufgenommenen Elektronen werden über ein hoch konserviertes His-Cys-His-Motiv auf das T2/T3-Cluster übertragen, wo der Elektronenakzeptor Sauerstoff gebunden ist. In einer zweistufigen Übertragung der vier Elektronen wird

Sauerstoff zu zwei Molekülen Wasser reduziert; die Laccase geht in ihren Ausgangszustand (vgl. Fig. 1-6, Natives Intermediat) über. Die zur Bildung von Wasser benötigten Protonen stammen aus der Radikalbildung der Substratmoleküle (Jones *et al.*, 2015; Mot *et al.*, 2012; Rivera-Hoyos *et al.*, 2013). Zusammengefasst wird die Laccasereaktion in Fig. 1-6 und Fig. 1-7a.



**Fig. 1-7** Schematische Darstellung der Laccasereaktion: a) Katalytischer Zyklus und Elektronenübertragungswege zwischen den Kupferzentren (nach Baldrian (2006)), b) Erweiterung des Substratspektrums von Laccasen in Gegenwart eines Mediators (Mogharabi *et al.*, 2014)

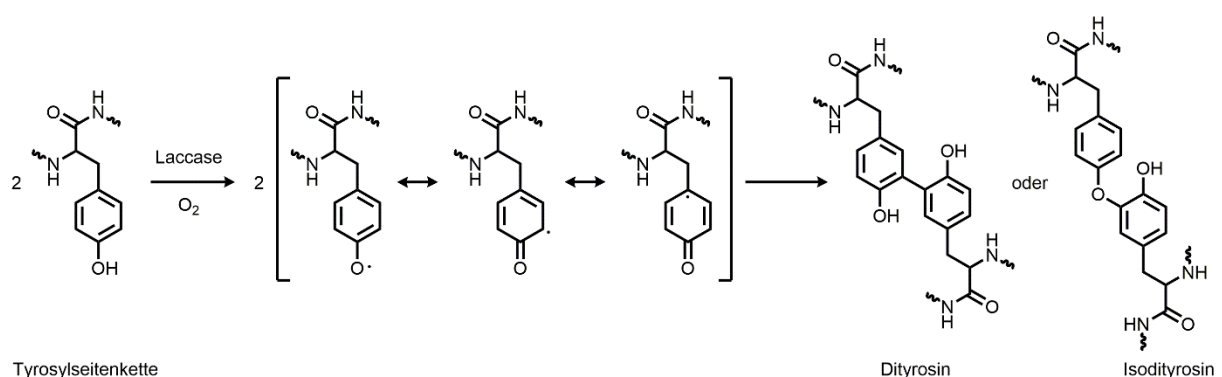
Die treibende Kraft der Laccasereaktion ist dabei die Differenz des Redoxpotentials von Substrat und Laccase. Je größer diese Differenz ausfällt, desto größer sind Reaktionsrate und Substratumsatz. Da das Redoxpotential des T1-Cu mit dem Redoxpotential der Laccase korreliert, wird eine Einteilung aus elektrochemischer Sicht und anhand struktureller Merkmale in drei Gruppen vorgenommen: *low*, *middle* und *high redox potential*. Das Redoxpotential  $E^0_{\text{T1-Cu}}$  wird hauptsächlich von der Koordinationsumgebung des T1-Cu bestimmt, aber auch von intermolekularen elektrostatischen Wechselwirkungen sowie Einschränkungen bei der Proteinfaltung einer Laccase (Li *et al.*, 2004; Mate *et al.*, 2015; Piontek *et al.*, 2002). Die Höhe des Redoxpotentials ist größtenteils bedingt durch die Art des variablen axialen und vom Organismus-abhängigen Liganden des T1-Cu (Bertrand *et al.*, 2002; Piontek *et al.*, 2002; Xu *et al.*, 1998). Eine Übersicht dazu bietet Tab. 1-4. Darüber hinaus wird auch Aminosäureresten in der Substratbindungstasche ein Einfluss auf das Redoxpotential der Laccasen zugeschrieben (Mate *et al.*, 2015).

**Tab. 1-4** Einfluss des axial koordinierenden Liganden des T1-Kupferions auf das Redoxpotential von Laccasen (Mate *et al.*, 2015; Morozova *et al.*, 2007a; Mot *et al.*, 2012)

Axialer Ligand des T1-Cu	Redoxpotential $E^0_{\text{T1-Cu}}$	Organismus/Herkunft
Methionin	< + 460 mV	<i>low</i> Bakterien, Pflanzen
Leucin	+ 460 bis + 710 mV	<i>middle</i> Ascomyceten, Basidiomyceten
Phenylalanin	+ 730 bis + 805 mV	<i>high</i> Basidiomyceten

Laccasen weisen eine geringe Substratspezifität auf und sind daher in der Lage, ein großes Spektrum an Verbindungen umzusetzen. Dazu zählen aromatische Verbindungen (*ortho*- und *para*-Diphenole, methoxy-substituierte Phenole, Diaminobenzole, Thiophenole), Metallionen ( $Mn^{2+}$ ), organometallische Verbindungen, organische Redoxverbindungen (ABTS, HBT) sowie Iodid. Durch den Einsatz sogenannter Mediatoren ist es möglich, das Substratspektrum der Enzyme noch zu erweitern. Mediatoren sind kleine, gute Laccasesubstrate, welche schnell umgesetzt werden und anschließend das eigentliche Substrat oxidieren (Fig. 1-7b). Im Idealfall gehen Mediatoren dabei in ihren Ausgangszustand zurück. Verbindungen, die sich als Mediatoren eignen, sind gute Elektronenüberträger, weisen ein niedriges Redoxpotential im Ausgangszustand und ein möglichst hohes im oxidierten Zustand auf und dürfen dabei die Laccaseaktivität nicht verringern. Sie werden eingesetzt, wenn eine Umsetzung mit Laccasen aufgrund von Größe, sterischer Hinderung oder aber aufgrund eines zu hohen Redoxpotentials des Substrats nicht möglich ist (Bourbonnais *et al.*, 1990; Kunamneni *et al.*, 2008; Morozova *et al.*, 2007b; Riva, 2006).

Bedingt durch ihre Vielfalt und das große Substratspektrum sind Laccasen für den industriellen Einsatz von Interesse. Laccasen werden bereits eingesetzt für das Bleichen von Indigo-gefärbten Denimstoffen sowie in der Papierherstellung (Tab. 1-5). Vielfältige weitere Anwendungen ergeben sich auf den Gebieten der Abwasserbehandlung, der Bodensanierung, als Biosensoren, der kosmetischen Industrie, der synthetischen Chemie, der Entfernung von pharmazeutischen Rückständen und in der Lebensmittelindustrie (Grunwald, 2015). Diese Anwendungen und Prozesse befinden sich zurzeit noch in der Erprobung. Bisher gibt es nur wenige kommerzielle Laccasen für den Einsatz im Lebensmittelbereich und keine davon ist für die Quervernetzung von Proteinen in Lebensmitteln geeignet (Rodríguez Couto *et al.*, 2006).



**Fig. 1-8** Laccase-katalysierte Vernetzungsreaktion über Protein-gebundene Tyrosylseitenketten (Mattinen *et al.*, 2005)

Es wurden Studien mit Laccasen durchgeführt, welche die Eignung des Enzyms hinsichtlich einer Vernetzung von Milchproteinen bzw. in Milchprodukten belegen sollten. Mattinen *et al.* (2005) untersuchte das *cross-linking* von Tyrosin-enthaltenden Modellpeptiden durch Laccase und bestätigte den in Fig. 1-8 dargestellten Vernetzungsmechanismus. Dabei wurden vorrangig Isodityrosinbindungen (C-O-C) und zu geringerem Anteil auch Dityrosinbindungen (C-C) ausgebildet. Es wird angenommen,

dass auch Lebensmittelproteine über diesen Mechanismus verknüpft werden. Mittels der Modellssubstrate  $\alpha$ <sub>s</sub>-Casein, Natriumcaseinat und Molkenproteinisolat (Ercili Cura *et al.*, 2009; Færgemand *et al.*, 1998; Hiller *et al.*, 2009; Steffensen *et al.*, 2008) wurde nachgewiesen, dass Laccasen z. T. in Gegenwart eines Redoxmediators in der Lage waren, diese Proteine zu Oligomeren und Polymeren zu verknüpfen. Hiller *et al.* (2009) berichteten darüber hinaus von einer erhöhten Viskosität einer Proteinlösung nach Laccase-katalysiertem *cross-linking*.

**Tab. 1-5** Kommerziell verfügbare Laccasepräparate für industrielle Prozesse, z. T. Mediatoren enthaltend (Grunwald, 2015; Osma *et al.*, 2010; Polizeli, 2013; Rodríguez Couto *et al.*, 2006; Schmid *et al.*, 2007)

Anwendungsgebiet		Handelsname	Anbieter
Lebensmittelindustrie	Behandlung von Korken	Suberase®	Novozymes
	Farbverstärkung in Tee, Kaffee, Kakao	LACCASE M120	Amano Enzyme USA Co. Ltd.
	Bierbrauen	Flavourstar	Advanced Enzyme Technologies Ltd.
Textilindustrie	Bleichen von Denimstoffen	DeniLite®	Novozymes
		DeniLite® II	Novozymes
		Zylite	Zytex Pvt. Ltd.
		Trilite II	Tri-TexCo. Inc.
		Americos Laccase P	Americos Industries Inc.
		Americos Laccase LTC	Americos Industries Inc.
		Bleach-cut 3S	Season Chemicals Dyestuffs Ltd.
	Primagreen® Ecofade LT100	Genencor Inc.	
	Verarbeitung und Veredelung von Denimstoffen	APCOZYME II-S	Apollo Chemical Company
	Veredelung von Denimstoffen	IndiStar™ Active	Genencor Inc.
		Cololacc BB	Colotex Biotechnology Co. Ltd.
		Ecostone® LCC 10	AB Enzymes GmbH
	Papierherstellung	Bleichen von Zellstoff	Lignozym-Prozess
Delignifizierung und Bleichen von Holzstoff		LaSOX	Bioscreen e.K.
Delignifizierung von Holzstoff		Novozym® 51003	Novozymes
Entfärben von Altpapier		NS51002, NS51003	Novozymes
Zellstoffbleiche, Biokraftstoffherstellung, Abwasserbehandlung		MetZyme	Metgen Oy

### 1.4 Zielsetzung

Der Forschungsansatz, die während der Herstellung von Joghurt unvermeidbaren Viskositätsverluste durch den Einsatz von Laccasen zu kompensieren, wurde bisher nicht verfolgt. Laccasen aus Basidiomyceten verfügen potentiell über die Fähigkeit, durch Vernetzung im sauren Milieu fermentierte Milchprodukte zu stabilisieren. Die Applikation von Laccasen für den zu erforschenden Verwendungszweck sowie Quervernetzungsexperimente mit Laccasen unterschiedlicher Redoxpotentiale stellen neue Forschungsaspekte dar. Der Einsatz dieser Enzyme im sauren pH-Bereich bietet die Möglichkeit, den prozessimmanenten Strukturabbau saurer Milchproteingele nach dem Fermentationsschritt zu kompensieren. Durch Modifikation fermentierter Milchprodukte auf biokatalytischem Wege wären verbesserte viskoelastische Eigenschaften und die Kompensation prozessbedingter Strukturverluste sowie damit einhergehend ein optimierter Rohstoffeinsatz und der Verzicht auf stabilisierende Zusätze möglich.

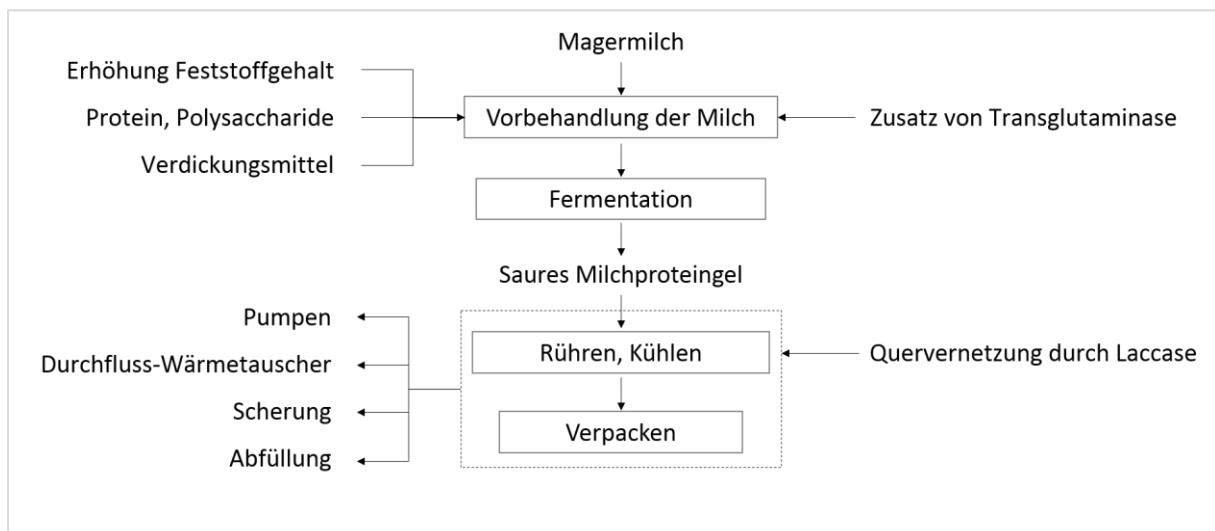
Ziel der Arbeit war es, eine Laccase zu finden, die im Hinblick auf Protein-analytische, technologische, rheologische und sensorische Aspekte für die Anwendung in fermentierten Milchprodukten wie Magermilchjoghurt geeignet ist. Ein besseres Verständnis der Beziehung zwischen den mikrostrukturellen Veränderungen des Gelnetzwerks durch enzymatische Vernetzung und den rheologischen Eigenschaften wurde erwartet.

Da die Lebensmittelindustrie bei der Nutzung biotechnologischer Produkte und Prozesse oftmals die Rolle eines Wegbereiters einnimmt, könnte eine erfolgreiche Anwendung von Laccasen in sauren Milchgelen auch anderen Oxidoreduktasen die Möglichkeit eröffnen, zur Verbesserung von Lebensmitteleigenschaften Verwendung zu finden.



## 2 Vorwort zur Publikation „Laccase-catalysed cross-linking of a yoghurt-like model system made from skimmed milk with added food-grade mediators”

Während für viele Lebensmittel, wie z. B. Wurst-, Fisch- oder Backwaren, enzymatische Vernetzungsmethoden eingesetzt werden, um Produkteigenschaften zu verbessern, gibt es noch keine anwendungsreife Lösung für fermentierte Milchprodukte. Saure Milchgele wie Joghurt eignen sich aus zwei Gründen hervorragend für das enzymatische *cross-linking*. Einerseits handelt es sich um proteinreiche Lebensmittel, die grundsätzlich gute Substrate für enzymatische Quervernetzung darstellen. Andererseits weist Joghurt eine unechte Strukturviskosität auf (Kapitel 1.3.3). Verschiedene Produktionsschritte wie Pumpen und Verpacken, welche erst nach dem Fermentationsschritt stattfinden (Fig. 2-1), rufen durch Scherstress irreversible Strukturschäden im Joghurt hervor (Senge *et al.*, 2011a, 2011b). Studien berechneten eine Abnahme des Speichermoduls um 50 % und der Viskosität um ca. 45 % (Fangary *et al.*, 1999; Weidendorfer *et al.*, 2008). Wenn vom Zusatz von Protein, Polysacchariden oder Hydrokolloiden abgesehen wird (Fig. 2-1), bietet sich an zwei Punkten der Joghurtherstellung der Einsatz von Enzymen an.



**Fig. 2-1** Fließschema der Joghurtherstellung: Prozessschritte, welche die Produkteigenschaften von gerührtem Joghurt negativ beeinflussen können und Ansatzpunkte, um diese Strukturverluste zu kompensieren

Die Verbesserung verschiedener Produkteigenschaften von Magermilchjoghurt durch mTG beruht auf Quervernetzung von Milchproteinen vor der Fermentation (Fig. 2-1) (Kapitel 1.3.4). Die Strukturschäden, welche durch Verarbeitung erst nach der Fermentation erfolgen, können durch mTG-katalysiertes *cross-linking* dementsprechend nicht kompensiert werden. Mit Laccase sollte daher ein alternativer enzymatischer Ansatz gewählt werden, bei dem das Enzym dem bereits fermentierten

Joghurt zugesetzt wurde und dort vernetzen sollte. So können mögliche, durch Scherkräfte hervorgerufene Schäden der Gelstruktur des Joghurts repariert werden. Nachdem die Laccase-katalysierte Vernetzungsreaktion in verschiedenen Studien anhand von Tyrosin-enthaltenden Peptiden und Milchproteinen untersucht wurde (vgl. Kapitel 1.3.5), musste sich das Enzym auch im komplexen Lebensmittel beweisen. Daher sollte überprüft werden, ob eine Laccase-katalysierte Vernetzung auch in Magermilchjoghurt gezeigt werden konnte.

Aufgrund der nicht zufriedenstellenden Vernetzung mit Laccase C alleine wurde zusätzlich der Einsatz von *food grade*-Mediatoren untersucht. In Gegenwart von Kaffeesäure, Vanillinsäure und Vanillin wurden die viskoelastischen Eigenschaften von Magermilchjoghurt deutlich verbessert. Kinetische Parameter dieser Vernetzungsreaktion wurden unter den Aspekten Laccaseaktivität, Mediatorkonzentration sowie Zeitabhängigkeit untersucht. Zusätzlich verdeutlichte eine SDS-PAGE das veränderte Proteinbandenmuster nach Inkubation der Joghurtproben mit Laccase.

### 3 Laccase-catalysed cross-linking of a yoghurt-like model system made from skimmed milk with added food-grade mediators

#### Abstract

Lactic acid fermented foods, such as yoghurt, suffer from structural losses in post-processing steps due to their shear sensitivity. The acidic pH optimum of fungal laccases offers potential to compensate for these losses and enhance the textural characteristics by cross-linking of milk proteins. Physical properties of skimmed milk yoghurt, as measured by dynamic oscillation rheology, changed upon addition of laccase alone or in combination with food-grade mediators. Among seven mediators examined, vanillin, vanillic acid, and caffeic acid were found to be most efficient. Variation of enzyme activity, mediator type and concentration showed best viscoelastic properties for the combination of 3 U laccase per gram yoghurt and 5 mmol/L caffeic acid. Evaluation of the loss factor,  $\tan \delta$ , showed increased elastic properties. SDS-PAGE showed a changed pattern of protein bands after the treatments. Overall, the combination of laccase with common food components provides an alternative to improve yoghurt texture.

#### 3.1 Introduction

Consumers demand fat-reduced food products, but expect at the same time the constant quality and sensory properties with which they are familiar (Frøst *et al.*, 2007). This applies for all dairy products, too, but is challenging, especially for low-fat yoghurt (Pereira *et al.*, 2006). A reduction of the fat content of yoghurt often leads to a poor texture, weak body and decreased flavour quality (Guggisberg *et al.*, 2009; Krzeminski *et al.*, 2011; Sandoval-Castilla *et al.*, 2004). To compensate for these losses, different additives may be used, but not all of them contribute positively to organoleptic properties (Krzeminski *et al.*, 2014). In addition, both the chemical composition and the production conditions affect the rheological properties (Afonso *et al.*, 1999; Pereira *et al.*, 2006). Numerous studies have focussed on improved textural properties of low-fat yoghurt, including the addition of gelling agents, fillers or milk proteins (Guzmán-González *et al.*, 1999; Krzeminski *et al.*, 2011; Sandoval-Castilla *et al.*, 2004). Physical treatments, such as microfluidisation, a special type of homogenisation, have also been evaluated (Ciron *et al.*, 2012). Hydrocolloids and stabilisers should stimulate the perception of fat, but can lead to adverse mouth-feel attributes, such as graininess instead of creaminess (Pereira *et al.*, 2006).

An alternative approach is the formation of a macromolecular network by enzymatic catalysis. Physicochemical properties of protein matrices can be changed by cross-linking, thus offering options

for a concerted engineering of food textures. Cross-linking of milk proteins has been suggested to improve texture and mouth-feel (Gerrard, 2002; Hiller *et al.*, 2009). Enzymes of different classes have been reviewed for their applicability in milk or yoghurt. Transglutaminase (EC 2.3.2.13), the only enzyme with current industrial relevance for fish, meat and dairy products, is capable of introducing new inter- and intramolecular bonds into food proteins *via* acyl transfer between glutamine and lysine side chains. Yoghurt from transglutaminase-treated milk showed improved gel strength, increased viscosity and a dense microstructure (Færgemand *et al.*, 1999a; Lorenzen *et al.*, 2002). Due to their activity maximum near the neutral point, these transferases are not applicable to lactic acid fermented products.

Another potential target for enzymatic protein cross-linking are tyrosyl side chains, also utilised in native proteins, such as gluten and some glycoproteins (Rodriguez-Mateos *et al.*, 2006; H. Singh, 1991; Tilley *et al.*, 2001). The cross-linking of tyrosyl side chains to dityrosine can be achieved by treatment with peroxidase (EC 1.11.1.-), tyrosinase (EC 1.14.18.1), or laccase (EC 1.10.3.2) (Zeeb *et al.*, 2014). Recent studies have proven the cross-linking ability of laccases for caseins (Ercili Cura *et al.*, 2009; Steffensen *et al.*, 2008) and whey proteins (Færgemand *et al.*, 1998). Laccase can be applied after fermentation and before filling of the yoghurt. The activity optimum of fungal laccases matches the pH value of yoghurt, and the enzymes also show a good thermostability. Thus, it should be possible to compensate for structural losses occurring while pumping and packaging of the yoghurt (Afonso *et al.*, 1999; De Lorenzi *et al.*, 1995; Morozova *et al.*, 2007a).

The substrate range of laccases mainly includes phenols and polyphenols. Exposed tyrosyl side chains of peptides and proteins can therefore act as target and enable a laccase-catalysed cross-linking of proteins. This occurs in the presence of oxygen as the electron acceptor. The cross-linking reaction can be impeded for reasons of steric hindrance or an insufficient redox potential of a laccase towards the target molecule. In these cases, low molecular mass compounds with low redox potential that act as mediators for the electron transfer can be used to facilitate the cross-linking reaction. After oxidation by laccase, mediators can diffuse to target moieties that are not amenable for direct oxidation by the enzyme. The target moiety is in turn oxidised by the mediator and is capable of taking part in coupling reactions (Ercili Cura *et al.*, 2009; Selinheimo, 2008; Steffensen *et al.*, 2008). For application in food, mediators from the group of plant phenylpropanoids (caffeic acid) or phenolic flavour compounds (vanillin) appear suitable. Unlike caffeic acid, vanillin does not evoke a bitter taste sensation at common application levels, but rather masks bitter notes (Berger, 2007; Frank *et al.*, 2007).

Using model substrates, such as tyrosine-containing peptides (Mattinen *et al.*, 2005),  $\alpha_s$ -casein (Steffensen *et al.*, 2008), sodium caseinate (Ercili Cura *et al.*, 2009; Hiller *et al.*, 2009) or whey protein isolate (Færgemand *et al.*, 1998) the ability of laccases to cross-link proteins in the absence or presence of redox mediators, such as ferulic acid or chlorogenic acid, has been examined. Oligomers and polymers of the tested substrates were found. Mattinen *et al.* (2005) reported the production of

homopolymers of tyrosine-containing peptides or tyrosine alone with only trace amounts of the mediator cross-linked to the substrate; they also proved that a reactive mediator radical was produced preferentially, and that cross-linking of the substrates occurred by formation of isodityrosine bonds (C-O-C) and to a lesser extent by dityrosine bonds (C-C). Hiller *et al.* (2009) reported an increased viscosity of protein solutions during enzymatic modification of milk proteins using a low redox potential laccase from *Myceliophthora thermophila* and chlorogenic acid. Obviously, the mediated cross-linking reaction of milk proteins did not depend on a high redox potential of the applied laccase.

The objective of this study was to reinforce the viscoelastic properties of skimmed milk yoghurt through treatment with the commercial Laccase C. A special focus was on the quantification of the supporting effect of food-grade laccase mediators. The kinetics of the mediator-supported cross-linking reaction were examined, considering laccase activity, mediator concentration and time-dependency. Besides rheological measurements, the enzyme-catalysed cross-linking reaction was visualised electrophoretically.

## 3.2 Materials and methods

### 3.2.1 Materials

All chemicals were used in highest purity grade and obtained from Carl Roth (Karlsruhe, Germany), AppliChem (Darmstadt, Germany), Fluka (Buchs, Switzerland) and Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Germany). The fungal Laccase C (EC 1.10.3.2) purified from *Trametes sp.* was purchased from ASA Spezialenzyme (Wolfenbüttel, Germany) and was used as received. Stirred skimmed milk yoghurt with a protein concentration of 55 g/kg and a fat concentration of 1 g/kg was obtained from Weihenstephaner Molkerei (Germany, Freising).

### 3.2.2 Enzyme

The commercial Laccase C (Lcc) has a native molecular mass of 43 kDa and a pH optimum of 5.0. Activity was determined using the 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS) assay (Bourbonnais & Paice, 1990) and a UV-1650PC spectral photometer (Shimadzu, Japan) that monitors the time-dependent increase of absorbance at 420 nm caused by the oxidation of ABTS to the cation radical ABTS<sup>•+</sup>. The specific activity of the enzyme preparation was 0.74 U/mg. The enzyme activity unit (U) is defined as the amount of enzyme that catalyses the conversion of one  $\mu\text{mol}$  substrate into product per minute at pH 4.5 and 25 °C.

### 3.2.3 Preparation of skimmed milk yoghurt samples

Commercial stirred plain skimmed milk yoghurt with a protein concentration of 55 g/kg and a lipid concentration of < 1 g/kg was used. All samples were treated the same way; after homogeneous stirring, the yoghurt was set to 40 °C for 30 min, stirred gently for a second time and then incubated at 25 °C for 24 h. For the time course tests, samples were incubated at 25 °C for 24 h, 72 h and 7 days.

Yoghurt without the addition of enzyme or mediator substrates represented the reference (Y). The mediator blank (Y + M) consisted of 5 mmol/L mediator that was added before the yoghurt was set to 40 °C. No Lcc was added to the mediator blank. Caffeic acid ((*E*)-3-(3,4-dihydroxyphenyl)-2-propenoic acid), vanillin (4-hydroxy-3-methoxybenzaldehyde), vanillic acid (4-hydroxy-3-methoxybenzoic acid), ferulic acid ((*E*)-3-(4-hydroxy-3-methoxy-phenyl)prop-2-enoic acid), methyl 4-hydroxybenzoate (E 218), quercetin (2-(3,4-dihydroxyphenyl)-3,5,7-trihydroxy-4*H*-chromen-4-one) and ellagic acid (2,3,7,8-tetrahydroxy-chromeno[5,4,3-cde]chromene-5,10-dione) were used as mediators in separate parallel experiments. For the preparation of the enzyme blank (Y + Lcc), 3 U Lcc per gram (U/g) yoghurt were added immediately after the incubation at 40 °C for 30 min. No mediator was added to the enzyme blank. For the cross-linking reaction, 5 mmol/L of mediator was added to the yoghurt, stirred gently and set to 40 °C before 3 U Lcc per gram yoghurt were added (Y + Lcc + M).

### 3.2.4 Rheology

A Physica MCR 301 stress-controlled rheometer (Anton Paar, Graz, Austria) was used to perform rheological measurements. An integrated Peltier element set measuring system and sample to 25 °C. Parallel plate geometry (25 mm diameter) with a gap width of 1 mm was used. The samples were carefully placed with a spatula onto the lower plate. Then, the upper plate was lowered and excess of the sample around the edge of the upper plate was removed. Initially, a strain sweep ( $\gamma = 0.01\%$  to 100 %) was performed using oscillation experiments at a constant frequency of  $\omega = 10$  rad/s to determine the linear viscoelastic range (LVE). A deformation of  $\gamma < 5\%$  was found to be well within the LVE of the yoghurt samples (data not shown). At this point a frequency sweep with  $\omega = 0.1$  to 100 rad/s with an applied strain of 5 % was carried out without setting of time standards. Measurements were performed in duplicate directly after incubation. Data were collected using RheoPlus software (Anton Paar, Graz, Austria) and the rheological parameters complex shear viscosity  $\eta^*$ , shear storage ( $G'$ ), shear loss modulus ( $G''$ ) and the loss factor  $\tan \delta (= G''/G')$  were calculated. All data presented are averages of duplicate measurements. The standard deviation of replicates for the rheological measurements was typically below 5 %. Due to the apparent pseudoplastic behaviour of yoghurt, a perfect comparison and generalisation of absolute values was rarely possible for experiments conducted on different days (Benezech & Maingonnat, 1994).

### 3.2.5 Sodium dodecylsulphate polyacrylamide gel electrophoresis

Cross-linking of milk proteins was determined using sodium dodecylsulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE; 12 % resolving gel, 4 % stacking gel) according to (Laemmli, 1970). Samples were diluted in denaturing SDS sample buffer (0.1 mol/L Tris-HCl pH 6.8, 0.2 mol/L dithiothreitol, 4 % (w/v) sodium dodecyl sulphate, 20 % (w/v) glycerol, 25 mg/L bromophenol blue) and incubated at 95 °C for 5 min. After electrophoresis at 15 mA, gels were stained with InstantBlue (Expedeon, Cambridgeshire, UK).

## 3.3 Results and discussion

### 3.3.1 Laccase and mediators

The addition of laccase to skimmed milk yoghurt was expected to catalyse a cross-linking reaction *via* radical intermediates of tyrosyl side chains of caseins to increase the viscous properties of yoghurt. A group of naturally occurring phenols known as suitable substrates and used in laccase-catalysed oxidations (Kunamneni *et al.*, 2008; Morozova *et al.*, 2007b) were chosen and examined for their ability to mediate the cross-linking reaction of laccase in yoghurt: ferulic acid, vanillin, vanillic acid, caffeic acid, methyl 4-hydroxybenzoate, quercetin, and ellagic acid.

**Tab. 3-1** Complex shear viscosity,  $\eta^*$ , storage modulus,  $G'$ , and loss modulus,  $G''$  ( $\omega = 0.1$  rad/s), of skimmed milk yoghurt.<sup>a</sup>

Yoghurt	Viscoelastic property		
	$\eta^*$ (Pa s)	$G'$ (Pa)	$G''$ (Pa)
Y	1430 ± 98	132 ± 6	56 ± 4
Y + Lcc	2115 ± 103	195 ± 6	81 ± 4
V	2550 ± 113	236 ± 11	99 ± 5
VA	2985 ± 78	275 ± 8	117 ± 1
CA	5510 ± 240	513 ± 23	202 ± 6

<sup>a</sup> Data are for control skim milk yoghurt samples (Y) and yoghurt after cross-linking of milk proteins using 3 U laccase per gram of yoghurt (Y + Lcc) and samples with an additional 5 mmol/L of vanillin (V), vanillic acid (VA) or caffeic acid (CA) (24 h at 25 °C) as mediator. Values are means ± standard deviation.

Compared with the yoghurt reference (Y), the addition of 3 U Lcc per gram of yoghurt increased the complex shear viscosity,  $\eta^*$ , the shear storage modulus,  $G'$ , and the shear loss modulus,  $G''$ , by approximately 50 % (Y + Lcc) (Tab. 3-1). This effect may be supported by trace amounts of phenolic compounds found in milk, such as guaiacol, an aroma component of plain yoghurt (A. Ott *et al.*, 1997). The increase was even higher if a mediator was added. The reference sample (Y + M) with yoghurt and

mediator, but without additional Lcc, did not show an increase of the measured parameters. In the presence of caffeic acid, vanillin or vanillic acid, the viscoelastic parameters of the yoghurt samples were enhanced, as demonstrated by dynamic rheological measurements (Tab. 3-1). The formation of new covalent bonds during the laccase-catalysed cross-linking reaction was indicated by an increase of the shear storage modulus,  $G'$ , representing the elastic property of the yoghurt samples, and the complex shear viscosity,  $\eta^*$ , describing the viscoelastic flow properties. Furthermore, the shear loss modulus,  $G''$ , indicates the viscous parts of the sample. Applying vanillin or vanillic acid enhanced the shear viscosity,  $\eta^*$ , by another 30 or 60 %, respectively, compared with the control with enzyme only. Using caffeic acid,  $\eta^*$  was increased almost fourfold compared with the yoghurt blank.

The superior effect of caffeic acid is explained by its ortho-diphenol structure which provides a high affinity for laccases. The para-position of the two substituents  $-\text{OH}$  and  $-\text{CH}=\text{CH}-\text{COOH}$  of the benzene ring is favourably as well (Morozova *et al.*, 2007a; Morozova *et al.*, 2007b) but, as mentioned above, the diphenol induces a bitter taste even at low concentrations (Frank *et al.*, 2007). Due to the non-specific oxidation of phenolic compounds by laccases, vanillin and vanillic acid, common flavours in sweet milk products, are also interesting mediators for application in yoghurt. Vanillin is popular in these preparations, shows a low odour threshold of around 20  $\mu\text{g/L}$  in water, and is pleasant even at higher dosages (Belitz *et al.*, 2009; Berger, 2007).

Ferulic acid, methyl 4-hydroxybenzoate, quercetin and ellagic acid did not increase  $\eta^*$ ,  $G'$  and  $G''$ , but showed values comparable with the reference with enzyme alone (Y + Lcc). It can be assumed that these compounds were either not converted or not converted rapidly enough by the laccase, or underwent coupling reactions instead of transferring an electron to the tyrosyl side chains (Camarero *et al.*, 2008; Könst *et al.*, 2013).

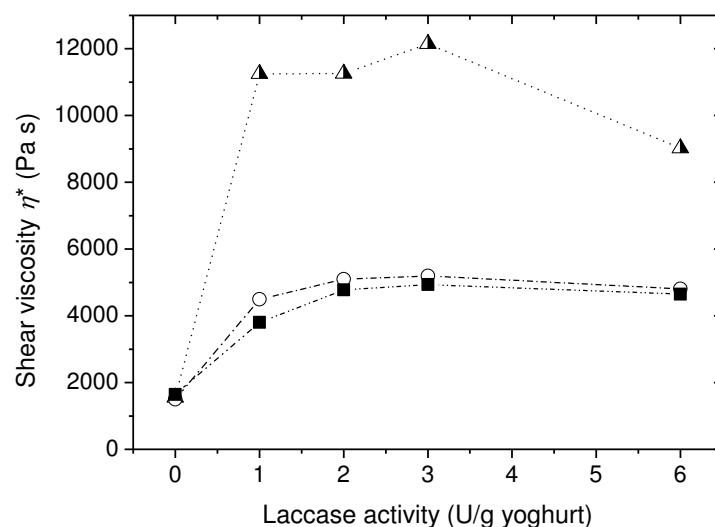
### 3.3.2 Laccase activity

The increasing dosage of Lcc activity to yoghurt resulted in increased values for the viscoelastic parameters (shown for  $\eta^*$  in Fig. 3-1) compared with the references without enzyme (Y; Y + M). While the addition of Lcc alone (Tab. 3-1; shown for  $\eta^*$  in Fig. 3-2: 2795 Pa s) gave an increase in the rheological parameters of about 70 %, the values of the mediator blank ( $\eta^* = 1650 \text{ Pa s}$ ) were comparable with the yoghurt blank ( $\eta^* = 1690 \text{ Pa s}$ ), indicating that there was no cross-linking effect even of the highest mediator concentration (5 mmol/L) in the absence of Lcc. This was confirmed by SDS-PAGE (Fig. 3-3); in comparison with the samples after laccase addition, no protein oligomerisation at higher molecular masses was detected, and furthermore, the casein bands remained unaltered.

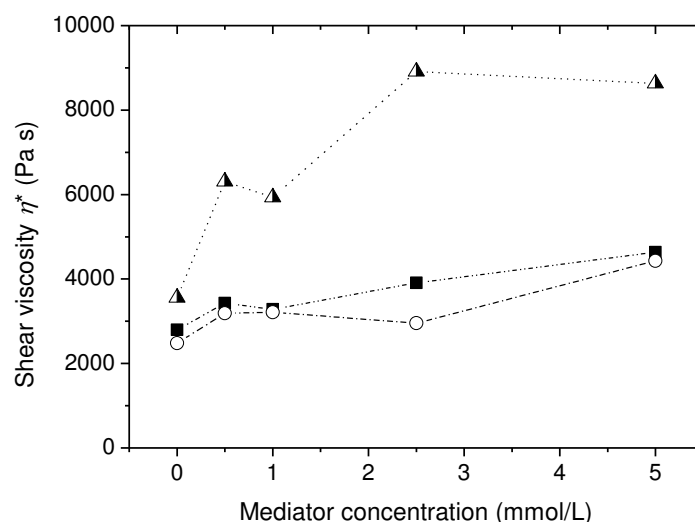
The cross-linking reaction was nearly independent from the added Lcc activity from 2 to 6 U/g in the samples with 5 mmol/L vanillin and vanillic acid. For the samples with 1 U/g Lcc the viscoelastic parameters were slightly decreased, but still higher than the yoghurt blank (Y). This is in contrast to caffeic acid, which resulted in the lowest value for the sample with the highest laccase activity of 6 U/g,



yielding a viscosity of  $\eta^* = 9020$  Pa s. In the samples supplemented with caffeic acid, a low laccase activity of 1 U/g was sufficient to strongly enhance rheological parameters: viscosity ( $\eta^*$ ) increased up to 400 % (11250 Pa s) compared with the yoghurt reference (1550 Pa s), while vanillic acid gave an increase of 300 % (4495 Pa s) and vanillin of around 230 % (3800 Pa s) (Fig. 3-1). For all three mediators, the highest values of  $G'$ ,  $G''$  and  $\eta^*$  were measured for the samples with 3 Unit Lcc per gram yoghurt. Using caffeic acid as the mediator, a maximum gain of around 500 % compared with the yoghurt reference was achieved.



**Fig. 3-1** Complex shear viscosity  $\eta^*$  ( $\omega = 0.1$  rad/s) after cross-linking yoghurt samples using 1 to 6 U Lcc per gram of yoghurt and 5 mmol/L of mediators (24 h at 25 °C): ▲, caffeic acid; ○, vanillic acid; ■, vanillin. The mediator blank (Y + M) is represented as sample with an applied laccase activity of 0 U/g.

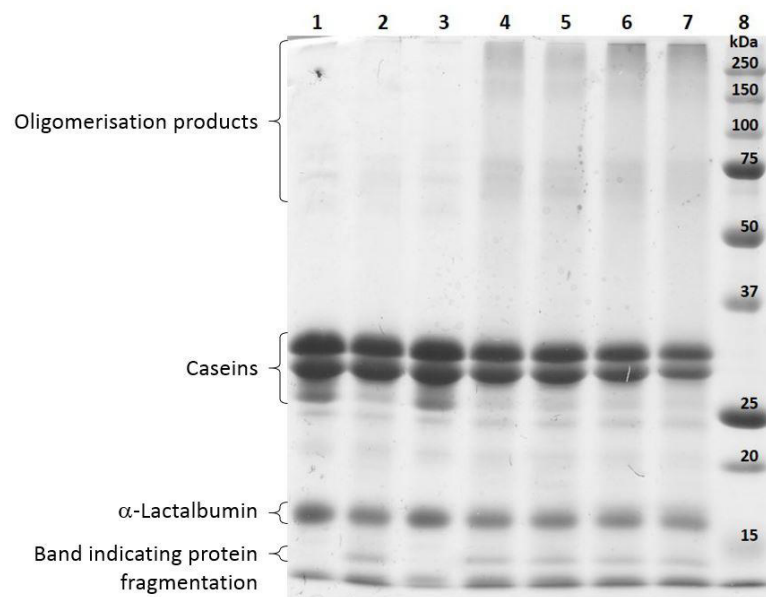


**Fig. 3-2** Complex shear viscosity  $\eta^*$  ( $\omega = 0.1$  rad/s) after cross-linking yoghurt samples using 3 U Lcc per gram yoghurt and different mediator concentrations (24 h at 25 °C): ▲, caffeic acid; ○, vanillic acid; ■, vanillin. The enzyme blank (Y + Lcc) is represented as sample with a mediator concentration of 0 mmol/L.

The independence of the cross-linking reaction of added Lcc activity in the range from 2 to 6 U/g is explained by saturating substrate concentrations of the enzyme reaction. The decreasing rheological

### 3 Laccase-catalysed cross-linking of a yoghurt-like model system made from skimmed milk with added food-grade mediators

parameters found with a Lcc activity of 6 U/g and caffeic acid as the mediator may have been caused by consumption of the available active form of the mediator. A brown layer was observed solely at the yoghurt/air interface, which indicated a higher reaction rate of the enzyme at the surface due to abundantly available oxygen. This colouring was found not only for caffeic acid, the best laccase substrate (Morozova *et al.*, 2007b) in the present study, but also for the other mediators, vanillic acid and vanillin, at the highest concentration of 5 mmol/L in combination with a laccase dosage of 6 U/g. The radical mediator intermediates are supposed to undergo random coupling reactions, resulting in oligomerisation. This led to compounds that are no longer available for the enzyme-catalysed reaction. Even dimers of mediator molecules were capable of taking part in the cross-linking reaction (Camarero *et al.*, 2008). However, oligomerisation consumes these reactive intermediates, and therefore less of them can take part in cross-linking (Ercili Cura *et al.*, 2009). This adverse side-reaction is controlled by lowering the mediator concentration. To a lesser extent, the cross-linking of mediator molecules to the proteins or the chemistry of newly formed bonds are able to contribute to the colour formation. Mattinen *et al.* (2005) demonstrated that only trace amounts of the mediator are coupled to the substrate proteins.



**Fig. 3-3** SDS-PAGE gel of skimmed milk yoghurt samples incubated with Lcc and mediators and reference samples: 10  $\mu$ L, containing 25  $\mu$ g of protein, were loaded onto the gel. Lanes are: 1, yoghurt reference; 2, yoghurt + 3 U/g Lcc; 3, yoghurt + 5 mmol/L vanillic acid; 4, yoghurt + 3 U/g Lcc + 0.5 mmol/L vanillic acid; 5, yoghurt + 3 U/g Lcc + 1 mmol/L vanillic acid; 6, yoghurt + 3 U/g Lcc + 2.5 mmol/L vanillic acid; 7, yoghurt + 3 U/g Lcc + 5 mmol/L vanillic acid; 8, Precision Plus Protein™ Standard (Bio-Rad, München, Germany).

The decrease in viscosity  $\eta^*$  of the yoghurt sample with 6 U/g Lcc added may have also been caused by mild protein degradation. Laccase-induced radicals that are formed by electron abstraction are known to be capable of protein fragmentation. Simultaneous cross-linking and fragmentation reactions of chicken breast myofibril proteins catalysed by a *Trametes hirsuta* laccase were reported by Lantto *et al.* (2005). Selinheimo *et al.* (2006) observed a softening of wheat dough when a *Trametes hirsuta* laccase

was applied in high doses. The absence of the mediator ferulic acid affected the cross-linking of sodium caseinate gels negatively, when using a *Trametes hirsuta* laccase (Ercili Cura *et al.*, 2009).

### 3.3.3 Effect of mediator concentration

Combining laccase and mediators to enhance the cross-linking reaction resulted in the highest increase for the measured parameters for samples at a concentration of 5 mmol/L of all tested mediators (Fig. 3-2). Caffeic acid showed the largest increase for shear viscosity  $\eta^*$ , an increase of 423 % (8630 Pa s) was achieved. At lower mediator concentrations, down to 1 mmol/L, the viscoelastic indicators are not as high as after addition of 5 mmol/L, but still increased compared with the enzyme blank (Y + Lcc). They did not decrease any further at a concentration of 0.5 mmol/L. The two lowest concentrations applied showed an increase of 200 % (6310 Pa s) for caffeic acid and of around 120 % (3190 Pa s) and 100 % (3430 Pa s) for vanillic acid and vanillin, respectively. As a result, the addition of even the lowest concentration of vanillin and vanillic acid (0.5 mmol/L) doubled the viscosity compared with the yoghurt reference. At mediator concentrations of 2.5 mmol/L and below, brown discoloration, indicating polymerisation of the mediator molecules, was no longer detected at the interface.

The data suggest that the proper combination of laccase activity and mediator concentration can be used to obtain the desired texture properties with no visible colour change of the yoghurt.

To some degree, the corresponding data of Fig. 3-1 and Fig. 3-2 (3 U/g Lcc + 5 mmol/L of mediator caffeic acid) appear inconsistent. This is a consequence of the above mentioned irreversible shear-thinning characteristics of yoghurt. The corresponding samples in Fig. 3-1 and Fig. 3-2 came from different days and experimental sets. Although the samples were handled as carefully as possible, a perfect duplication of their preparation was not possible.

### 3.3.4 Time-course of the cross-linking reaction

The time course of the cross-linking reaction in skimmed milk yoghurt was examined over a period of seven days at 25 °C including the different references (plain yoghurt (Y), enzyme only added (Y + Lcc), and mediator only added (Y + M)) and a sample with Lcc plus caffeic acid (Y + Lcc + M); (Tab. 3-2). All samples were prepared at the same time (d 0). In general, the shear viscosity  $\eta^*$  of the reference samples slightly increased over time. The enzyme blank (Y + Lcc) and the cross-linked yoghurt sample (Y + Lcc + M) showed a two-fold increase in  $\eta^*$  immediately after the sample preparation (d 0) compared with yoghurt (Y). The addition of caffeic acid to yoghurt (Y + M) without the addition of enzyme increased  $\eta^*$  slightly. The viscosity  $\eta^*$  of the enzyme reference (Y + Lcc) at day zero was comparable with  $\eta^*$  of the cross-linked yoghurt sample with caffeic acid (Y + Lcc + M) but, after seven days, the yoghurt (Y) and the enzyme blank showed a similar  $\eta^*$  value. The mediator blank sample provided the lowest values for  $\eta^*$  after an incubation time of seven days, and  $\eta^*$  remained constant from

### 3 Laccase-catalysed cross-linking of a yoghurt-like model system made from skimmed milk with added food-grade mediators

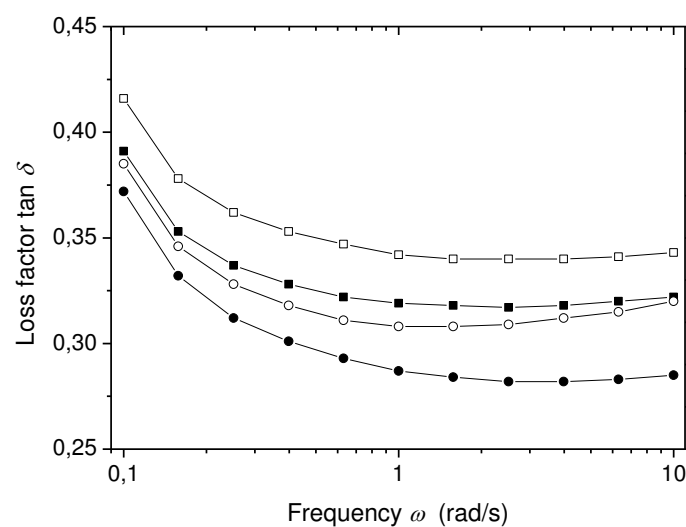
day three on. The sample with enzyme plus caffeic acid (Y + Lcc + M) showed a progressive increase in viscosity over time. After seven days,  $\eta^*$  increased sevenfold compared with the yoghurt reference (Y). Possible problems such as microbial contamination or phase separation were not observed during the incubation time.

The loss factor  $\tan \delta$  (Fig. 3-4) showed that there was no influence of the mediator caffeic acid alone, but the value of  $\tan \delta$  decreased when Lcc was added to the yoghurt (enzyme blank) indicating an altered ratio of the loss modulus  $G''$  and storage modulus  $G'$  that is caused by a gain of elastic parts ( $G'$ ) through formation of new covalent bonds upon cross-linking (Nöbel *et al.*, 2014). The loss factor,  $\tan \delta$ , showed the lowest values for the yoghurt sample with Lcc plus caffeic acid, indicating a strong increase of gel viscosity. The increase of  $\eta^*$  (Tab. 3-2) and a standard ABTS assay confirmed that the enzyme was still active after seven days at 25 °C.

**Tab. 3-2** Development of the complex shear viscosity  $\eta^*$  ( $\omega = 0.1$  rad/s) during the cross-linking reaction.<sup>a</sup>

Yoghurt	Complex shear viscosity			
	Day 0	Day 1	Day 3	Day 7
Y	800 ± 8	1305 ± 7	2350 ± 123	2820 ± 127
Y + Lcc	1570 ± 27	2385 ± 35	2640 ± 146	2995 ± 197
Y + M	1003 ± 57	1390 ± 73	2005 ± 137	2045 ± 143
Y + Lcc + M	1650 ± 56	5670 ± 296	12260 ± 645	20400 ± 1273

<sup>a</sup> Data are for yoghurt with 3 U Lcc per gram and 5 mmol/L of mediator caffeic acid (Y + Lcc + M) over time (25 °C) in comparison with the yoghurt reference (Y), enzyme blank (Y + Lcc) and mediator blank (Y + M) samples. Values are means ± standard deviation.



**Fig. 3-4** Loss factor,  $\tan \delta$ , of different yoghurt samples after incubation for seven days at 25 °C shows increasing elastic parts ( $G'$ ) of the samples with added Lcc: ■, yoghurt blank; ○, enzyme blank; □, mediator reference; ●, cross-linked sample.

### 3.3.5 Analysis of cross-linking by SDS-PAGE

Electrophoresis gels showed differences in the pattern of protein bands when skimmed milk yoghurt was incubated with Lcc, indicating the capability of the enzyme to cross-link milk proteins (Fig. 3-3). The samples showed intense casein bands for the yoghurt reference and mediator reference. The intensity of these bands decreased when Lcc was added to the corresponding sample. One of the intense casein bands,  $\kappa$ -casein (26 kDa), disappeared almost completely upon Lcc treatment. As  $\kappa$ -casein is located on the outside of the casein micelle, it is the most accessible among the caseins. A distinct change in the pattern of protein bands took place when vanillic acid was added. Similar patterns were attained when caffeic acid or vanillin were added as mediators (data not shown). Oligomerisation of proteins with molecular masses of around 70 kDa was detected, while these were not found in the yoghurt and mediator reference samples, and were at a lower intensity in the enzyme reference.

Increasing the mediator concentration had considerable effects on the intensity of the newly formed higher molecular mass bands, as well as on the casein bands. Changes of proteins with molecular masses above 50 kDa were apparent in the yoghurt samples cross-linked with Lcc and vanillic acid (Fig. 3-3: lane 4-7). In the samples incubated with Lcc and mediators, bands became visible were not seen in the reference samples, and there were protein bands of low intensity in the yoghurt and the mediator reference of approximately 85 and 155 kDa that disappeared when Lcc was added. Overall, SDS-PAGE proved that oligomerisation reactions took place at the protein level, and that this reaction was reinforced by vanillic acid. A low molecular mass band below 15 kDa indicated a mild protein degradation caused by laccase, which was shown to affect some model food structures negatively (Ercili Cura *et al.*, 2009; Lantto *et al.*, 2005; Selinheimo *et al.*, 2006). However, this slight change of the protein pattern proved that cross-linking was sufficient to markedly increase the rheological properties of yoghurt (Tab. 3-1; Fig. 3-1 and Fig. 3-2).

Previous studies on less complex systems such as sodium caseinate solutions showed that the cross-linking was most pronounced when laccase was used together with ferulic acid or chlorogenic acid, respectively (Ercili Cura *et al.*, 2009; Hiller *et al.*, 2009). It was reported that the extent of cross-linking was determined by the accessibility of reactive amino acid side chains, and that laccase was not capable of cross-linking proteins efficiently in the absence of a mediator, unless a high enzyme dosage was applied (Selinheimo, 2008). The SDS-PAGE and the rheological measurements of the present study demonstrated that laccase alone was able to catalyse the formation of new bonds in the protein network. Mattinen *et al.* (2006) showed that a *Trametes hirsuta* laccase alone was able to cross-link tyrosine-containing peptides because there was no steric hindrance impeding the enzyme reaction, but it was concluded that proteins were poor substrates for laccases if the accessibility of tyrosine side chains was limited. In agreement with Mattinen *et al.* (2005), the cross-linking of less accessible tyrosyl residues in milk proteins required the mediation by an accessory substrate.

### **3.4 Conclusions**

Laccase C cross-linked the proteins in skimmed milk yoghurt, thereby increasing the complex shear viscosity,  $\eta^*$ , the shear storage modulus,  $G'$ , and the shear loss modulus,  $G''$ . The cross-linking was further enhanced using food-grade mediator compounds, such as caffeic acid, vanillic acid and vanillin. The effects of the laccase/mediator treatment on the chemical composition of skimmed milk yoghurt and the course of laccase inactivation will have to be evaluated in follow-up experiments. Sensory tests and gas chromatographic flavour analysis will be performed to find possible changes of aroma key compounds or altered flavour release upon cross-linking. The enzymatic concept appears promising, but sensitive components, such as unsaturated fatty acids and carotenoids, must remain unaffected for a transfer into practice.

### **Acknowledgements**

This project (AIF 17475 N) was supported by the Arbeitsgemeinschaft industrieller Forschungsvereinigungen "Otto von Guericke" e. V. (AiF) through FEI (Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V., Bonn) and ASA Spezialenzyme (Wolfenbüttel, Germany). Stefan Nöbels helpful advice is gratefully acknowledged. The authors thank Robin Leonhardt and Lucienne Giesler for proofreading the manuscript.

## 4 Vorwort zur Publikation „Dose dependent effects of a milk ion tolerant laccase on yoghurt gel structure”

Die Untersuchungen in Kapitel 3 haben gezeigt, dass ein mit Laccase C behandelter Magermilchjoghurt nach der Vernetzung von Milchproteinen erhöhte viskoelastische Parameter aufwies. Um die Wirtschaftlichkeit der enzymatischen Quervernetzung zu erhöhen und einen Transfer in die Praxis zu ermöglichen, sollten dem Magermilchjoghurt möglichst geringe Mengen an Enzym und Mediator zugesetzt werden müssen.

Daher schloss sich an die erste Studie die Suche nach einer Laccase an, welche effektiver vernetzen sollte als Laccase C. Dies beinhaltete mit dem Einsatz einer möglichst geringen Laccaseaktivität eine vergleichbare Vernetzung zu erzielen. Die Laccaseaktivität wird im System Joghurt vor allem durch den Mineraliengehalt beeinflusst. Die Ionen der Milch liegen z. T. im Verbund mit den Caseinmicellen vor und weisen somit ein gewisses Konzentrationsgefälle auf. Der Mineralstoffgehalt zwischen Modellsubstraten wie den Caseinen und dem komplexen Lebensmittel Joghurt ist nur bedingt vergleichbar (Dalglish, 2011). Eine Übertragung der Ergebnisse von Modellsystemen auf ein Lebensmittel gestaltet sich schwierig. Eine zumindest teilweise Hemmung der eingesetzten Laccasen kann daher nicht ausgeschlossen werden, verringert jedoch die Effizienz der Quervernetzung.

In einem Screening sollten Laccasen aus Basidiomyceten identifiziert werden, die sich für die Vernetzung von Magermilchjoghurt eignen. Als Kriterium wurde hierbei die Inhibierung der Laccasen durch Milch-typische Ionen in relevanten Konzentrationsbereichen ausgewählt.

Untersucht wurden 20 Spezies, deren Laccaseaktivität durch Lignin und Kupfer induziert wurde. In Aktivitätstests wurde die inhibierende Wirkung von Calcium, Chlorid, Phosphat (0,1-50 mM) sowie Magnesium und Citrat (0,1-10 mM) untersucht. Laccase C, welche die viskoelastischen Parameter von Magermilchjoghurt durch *cross-linking* erhöhte (Kapitel 3), wurde als Referenzenzym mitgeführt. Laccasen, die durch die untersuchten Ionen wenig inhibiert wurden, wurden anschließend in Vernetzungstests mit Casein eingesetzt.

Die Untersuchung deckte ein weiteres Problem des Laccase-induzierten Protein-*cross-linking* auf. Bereits die teilweise inhibierte Laccase C zeigte bei der Vernetzung von Joghurt eine leichte Fragmentierung von Caseinen (Fig. 3-3). Die im Screening identifizierte Laccase von *Pleurotus eryngii*, welche durch die in Milch enthaltenen Ionen nur geringfügig inhibiert wurde, führte dagegen zu einem starken Abbau von Casein im Magermilchjoghurt. Auch wenn dieses Phänomen des Abbaus von Protein während Laccase-katalysierter Vernetzungsreaktionen bekannt ist, sind die Ursachen weiterhin unklar, stellen jedoch für den Einsatz von Laccasen für die Quervernetzung in Lebensmitteln einen deutlichen Nachteil dar.

## 5 Dose dependent effects of a milk ion tolerant laccase on yoghurt gel structure

### Abstract

Fungal laccases with their pH optima in the acidic range may be suitable to improve the physical properties of lactic acid fermented dairy foods, such as yoghurt, by cross-linking of the milk proteins. Ions naturally occurring in milk may inhibit the laccase-catalysed reaction. Hence, laccase activity was induced and accumulated in cultures of 20 fungal species and compared to the reference enzyme Laccase C (Lcc C). Laccases of *Funalia trogii*, *Pleurotus flabellatus*, *Pleurotus eryngii*, *Pleurotus lampas* and *Trametes versicolor* showed comparable or higher activities than Lcc C in the presence of calcium, chloride, magnesium, potassium, phosphate and citrate. In a cross-linking experiment, *P. eryngii* laccase (Lcc Per) converted casein completely into protein aggregates with higher molecular masses. A combination of 0.1 U/g Lcc Per and 5 mmol/L vanillin as mediator enhanced all rheological parameters, storage modulus  $G'$ , loss modulus  $G''$  and complex shear viscosity  $\eta^*$  of a skimmed milk yoghurt by approximately 30 %, while a higher dose (1 U/g) resulted in fragmentation of caseins and weakening of the gel. At least 1 U/g of the more strongly inhibited Lcc C was required for measurable cross-linking, but no fragmentation occurred.

### Keywords

Laccase, inhibition, *Pleurotus eryngii*, cross-linking, skimmed milk yoghurt

### Highlights

- Effect of ions of the milk on laccase activity quantified for 20 fungal species
- Laccases of five fungal species were nearly unaffected by ions of the milk
- The not-inhibited Laccase from *Pleurotus eryngii* cross-linked casein without a mediator
- Cross-linking or fragmentation of milk proteins depended on laccase dosage



## 5.1 Introduction

During the production of fermented dairy products, such as yoghurt, protein gels are formed (Belitz *et al.*, 2009) which contribute to the unique texture properties as expected by the consumer (Lucey *et al.*, 1997). However, shear stress and mechanical impact in the course of the production result in extensive syneresis and a decrease of viscosity of these gels (Afonso *et al.*, 2000; Senge *et al.*, 2011a, 2011b). The addition of thickening agents, such as pectin, gelatin or whey protein is common practice to partially restore undesired textural changes (Chouchouli *et al.*, 2013; Krzeminski *et al.*, 2011; Loveday *et al.*, 2013; Lucey *et al.*, 1997; Marafon *et al.*, 2011).

Transglutaminases (EC 2.3.2.13) as well as laccases (EC 1.10.3.2) are capable of cross-linking milk proteins which leads to an enhanced viscosity of milk protein gels (Ercili Cura *et al.*, 2009; Gauche *et al.*, 2009; Hiller *et al.*, 2011). They cross-link caseins efficiently (Bönisch *et al.*, 2004; R. Sharma *et al.*, 2001) but are limited in their cross-linking efficacy by the catalytic selectivity for glutamyl and lysine side chains of proteins (Hiller *et al.*, 2009). Furthermore, transglutaminases possess a pH optimum in the neutral to alkaline range (Motoki *et al.*, 1998) and thus appear to be less suitable for a protein cross-linking in acidic milk products, such as yoghurt with a pH value of about 4.5. Fungal laccases usually possess reaction optima in the acidic range (Baldrian, 2006; Morozova *et al.*, 2007a), and they cross-link  $\alpha$ - and  $\beta$ -casein as well as  $\alpha$ -lactalbumin and  $\beta$ -lactoglobulin (Ercili Cura *et al.*, 2009; Jung *et al.*, 2014; Stanic *et al.*, 2010; Steffensen *et al.*, 2008). The viscoelastic properties of a skimmed milk yoghurt model system were strongly enhanced by a laccase from *Trametes sp.* in the presence of food-grade mediators, such as vanillin (Struch *et al.*, 2015). Hence, laccases may be suitable to compensate for structural losses due to shear stress during production steps.

However, ions naturally occurring in milk may inhibit laccase catalysis. Recent studies proved the inhibitory effect of both calcium and chloride ions on laccase activity (Dwivedi *et al.*, 2011; Hu *et al.*, 2014; Murugesan *et al.*, 2009; Rodríguez Couto *et al.*, 2005; Xu, 1996). Chloride impedes the electron transfer pathway of the enzyme by binding to the trinuclear T2/T3 copper cluster. The inhibition caused by calcium ions is referred to interactions with amino acid side chains resulting in conformational changes of the protein structure (Dwivedi *et al.*, 2011). Little is known about the effects of ions common in food, such as potassium, phosphate, magnesium and citrate ions, on laccase activity. To reduce the amount of laccase applied to yoghurt with concomitant ensuring an effective cross-linking, it is necessary to exert laccases that show only minor sensitivity towards the above mentioned ions.

The focus of this study was to quantify the influence of ions present in milk such as calcium, chloride, potassium, phosphate, magnesium and citrate on laccase activity and the ability of different laccase preparations to cross-link milk proteins. Crude laccase mixtures from 20 fungal species which were known as good laccase producers were generated and secreted into an induction medium and submitted

to inhibition tests. The positive candidates were applied to the cross-linking of casein in a buffered model system.

### 5.2 Methods and materials

#### 5.2.1 Chemicals and reference laccase

All chemicals were used in highest purity grade and obtained from Carl Roth (Karlsruhe, Germany), AppliChem (Darmstadt, Germany), Fluka (Buchs, Switzerland), Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Germany) and Riedel-de Hën (Seelze, Germany). The casein used in the cross-linking experiments was purified according to Post *et al.* (2009). Stirred skimmed milk yoghurt with a protein concentration of 5.5 g/100 g and a lipid concentration of 0.1 g/100 g was obtained from Weihenstephaner Molkerei (Freising, Germany). The fungal Laccase C (EC 1.10.3.2) from *Trametes spec.* was purchased from ASA Spezialenzyme (Wolfenbüttel, Germany) and was used as received.

#### 5.2.2 Applied strains

A total of 20 basidiomycetes were screened for laccase activity (Tab. 5-1).

#### 5.2.3 Cultivation and laccase production

A standard procedure for the cultivation of fungal strains, as described by Haase-Aschoff *et al.* (2013), was used. In brief: The screened strains were grown on agar plates (15 g/L) with standard nutrition liquid (SNL) medium according to Sprecher (1959) and maintained at 4 °C. Precultures were prepared from a mycelial block (1 cm<sup>2</sup>) as inoculum, which was excised from the agar plate and placed in a 300 mL Erlenmeyer flask containing 150 mL of SNL medium. The mycelium was treated with an UltraTurrax homogeniser (ART Prozess- & Labortechnik, Müllheim, Germany). Then the fungal cultures were incubated for 7 d at 150 rpm and 24 °C. Main cultures were prepared from 20 mL of preculture transferred into 500 mL Erlenmeyer flasks containing 250 mL of SNL medium. For the induction of laccases the medium was supplemented with 1 g/L lignin and 300 µmol/L CuSO<sub>4</sub>. One mL of samples of supernatant was taken daily for determination of laccase activity.

#### 5.2.4 Assays

Laccase activity was determined using a standardised protocol described by Struch *et al.* (2015). The enzyme activity Unit (U) is defined as the amount of enzyme that catalysed the conversion of one µmol substrate into product per minute at pH 4.5 and 25 °C. Peptidase activity was determined using the azocasein assay according to Iversen *et al.* (1995).

**Tab. 5-1** Fungal strains examined in this study.

Species	Abbreviation	Origin
<i>Funalia trogii</i>	Ftr	DSMZ <sup>a</sup> , no. 11919
<i>Meripilus giganteus</i>	Mgi	CBS <sup>b</sup> , no. 561.86
<i>Phellinus pini</i>	Ppi	DSMZ <sup>a</sup> , no. 5238
<i>Pleurotus dryinus</i>	Pdr	DSMZ <sup>a</sup> , no. 5178
<i>Pleurotus eryngii</i>	Per	CBS <sup>b</sup> , no. 613.91
<i>Pleurotus flabellatus</i>	Pfl	DSMZ <sup>a</sup> , no. 8299
<i>Pleurotus lampas</i>	Pla	CBS <sup>b</sup> , no. 323.49
Monocaryon MK51 from <i>Pleurotus sapidus</i>	MK 51	Omarini <i>et al.</i> (2014)
<i>Pleurotus ostreatus</i>	Pos A	DSMZ <sup>a</sup> , no. 3344
<i>Pleurotus ostreatus</i>	Pos B	Department of Forest Botany and Tree Physiology, Universität Göttingen, Germany
<i>Pleurotus pulmonarius</i>	Ppu	DSMZ <sup>a</sup> , no. 5331
<i>Pleurotus sajor-caju</i>	Psaj	DSMZ <sup>a</sup> , no. 5339
<i>Pleurotus sapidus</i>	Psa A	DSMZ <sup>a</sup> , no. 8266
<i>Pleurotus sapidus</i>	Psa B	CBS <sup>b</sup> , no. 195.92
<i>Trametes gibbosa</i>	Tgi	Isolated from wood in Lower Saxony, Germany, and identified according to ITS sequences
<i>Trametes hirsuta</i>	Thi	DSMZ <sup>a</sup> , no. 7052
<i>Trametes sp.</i>	Tsp	CBS <sup>b</sup> , no. 480.63; identified according to ITS sequences
<i>Trametes suaveolens</i>	Tsu	DSMZ <sup>a</sup> , no. 5237
<i>Trametes versicolor</i>	Tve A	Isolated from wood and identified according to ITS sequences
<i>Trametes versicolor</i>	Tve B	DSMZ <sup>a</sup> , no. 11269

<sup>a</sup> DSMZ – Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (Braunschweig, Germany).

<sup>b</sup> CBS – Centraalbureau voor Schimmelcultures (Utrecht, Netherlands).

### 5.2.5 Inhibition test

The inhibition test of the fungal laccases was adapted from Lorenzo *et al.* (2005) and slightly modified. The reaction mixture consisted of 220  $\mu\text{L}$  sodium acetate buffer (100 mmol/L, pH 4.5), 30  $\mu\text{L}$  inhibiting ion (final concentration ranging from 0.1 to 50 mmol/L for  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  and phosphate; 0.1 to 10 mmol/L for  $\text{Mg}^{2+}$  and citrate; Tab. 5-2), 20  $\mu\text{L}$  culture supernatant and 30  $\mu\text{L}$  substrate (0.5 mmol/L ABTS). The counterions were sodium or acetate, respectively (Tab. 5-2). The reaction started by the addition of ABTS and was run at 25 °C. A control test, in which the inhibiting ion was replaced by buffer, was conducted in parallel. The relative activity of laccases in presence of inhibiting ions was calculated by means of the formula:

$$A_{\text{rel}} [\%] = A_{\text{PI}} / A_{\text{AI}} \cdot 100$$

where  $A_{\text{rel}}$ : remaining laccase activity (in %),  $A_{\text{PI}}$ : laccase activity in the presence of an inhibitor (in U/L),  $A_{\text{AI}}$ : laccase activity in the absence of inhibiting ions (in U/L). To eliminate the effect of the ion itself on the laccase activity assay, a blank test for every ion without the addition of enzyme was run simultaneously. Data represent average values of at least triplicate measurements with a standard deviation typically below 5 %.

**Tab. 5-2** Average concentrations of ions naturally occurring in milk and fermented dairy products (Souci *et al.*, 2008) and the tested concentration range in conducted laccase inhibition studies.

Tested ions	Concentration [mmol/L]		Concentration range in inhibition tests [mmol/L]	Counterion in inhibition tests
	Skimmed milk yoghurt (0.3 g fat/100 g)	Yoghurt (3.5 g fat/100 g)		
Ca <sup>2+</sup>	34.31	28.79	0.1-50	CH <sub>3</sub> COO <sup>-</sup>
Cl <sup>-</sup>	32.82	27.66	0.1-50	Na <sup>+</sup>
K <sup>+</sup>	46.00	38.61	0.1-50	CH <sub>3</sub> COO <sup>-</sup>
phosphate	33.84	28.56	0.1-50	Na <sup>+</sup>
Mg <sup>2+</sup>	5.54	4.75	0.1-10	CH <sub>3</sub> COO <sup>-</sup>
citrate	n.s. <sup>a</sup>	n.s. <sup>a</sup>	0.1-10	Na <sup>+</sup>

<sup>a</sup> n.s. – not specified for yoghurt, but for milk: 9.25 mmol/L.

### 5.2.6 Cross-linking of casein

A 1 mmol/L casein solution (in 100 mmol/L sodium acetate buffer, pH 4.5) was incubated with a laccase activity of 1 U at 30 °C and 300 rpm (Thermomixer® comfort, Eppendorf, Hamburg, Germany) for 20 h. The enzyme was inactivated by heating to 99 °C for 5 min. As reference, a casein blank without the addition of laccase was treated the same way. The samples were then applied to SDS-PAGE.

### 5.2.7 SDS-PAGE analysis

Cross-linking of milk proteins was determined using SDS-PAGE (12 % resolving gel, 4 % stacking gel) according to Laemmli (1970). Samples were diluted in denaturing SDS sample buffer (0.1 mol/L Tris-HCl pH 6.8, 0.2 mol/L dithiothreitol, 4 % (w/v) sodium dodecyl sulphate, 20 % (w/v) glycerol, 25 mg/L bromophenol blue) and incubated at 95 °C for 10 min. After electrophoresis at 15 mA, gels were stained with InstantBlue (Expedeon, Cambridgeshire, Great Britain).

### 5.2.8 Laccase treatment of skimmed milk yoghurt samples

The cross-linking of the skimmed milk yoghurt samples was implemented as described earlier (Struch *et al.*, 2015). Commercial stirred plain skimmed milk yoghurt with a protein concentration of 5.5 g/100 g and a lipid concentration of < 0.1 g/100 g was used. For cross-linking tests, Lcc C and a laccase from *Pleurotus eryngii* (Lcc Per; purified according to Nieter *et al.* (2014) were applied. All samples were treated the same way: after homogeneous stirring, the yoghurt was set to 40 °C for 30 min, stirred gently for a second time and then incubated at 25 °C for 24 h. Yoghurt without the addition of enzyme or mediator represented the reference (Y). The mediator blank (Y + M) consisted of 5 mmol/L (0.76 mg/g) mediator vanillin (4-hydroxy-3-methoxybenzaldehyde) which was added before the yoghurt was set to 40 °C. No laccase was added to the mediator blank. For the preparation of the enzyme blank (Y + Lcc C; Y + Lcc Per), 0.1 U laccase per gram (U/g) yoghurt were added right after the incubation at 40 °C for 30 min. No mediator was added to the enzyme blank. For the cross-linking reaction, 5 mmol/L of vanillin was added to the yoghurt, stirred gently and set to 40 °C before 0.1 or 1 U laccase per gram yoghurt, respectively, were added.

### 5.2.9 Rheology

The rheological measurements according to Struch *et al.* (2015) were performed using a Physica MCR 301 stress controlled rheometer (Anton Paar, Graz, Austria). An integrated Peltier element set measuring system and sample to 25 °C. Parallel plate geometry (25 mm diameter) with a gap width of 1 mm was used. Without stirring, the samples were carefully placed with a spatula onto the lower plate. Then, the upper plate was lowered and excess of the sample around the edge of the upper plate was removed. Initially, a strain sweep ( $\gamma = 0.01\% - 100\%$ ) was performed using oscillation experiments at a constant frequency of  $\omega = 10$  rad/s to determine the linear viscoelastic range (LVE). A deformation of  $\gamma < 5\%$  was found to be well within the LVE of the yoghurt samples (data not shown). At this point a frequency sweep with  $\omega = 0.1 - 100$  rad/s with an applied strain of 5% was carried out without setting of time standards. Measurements were performed in duplicate directly after incubation. Data were collected using RheoPlus software (Anton Paar, Graz, Austria) and the rheological parameters complex shear viscosity  $\eta^*$ , shear storage ( $G'$ ), shear loss modulus ( $G''$ ) and the loss factor  $\tan \delta (= G''/G')$  were calculated. All data presented are averages of duplicate measurements. For the bulk of the rheological measurements, the standard deviation of repetitions was typically below 5%.

## 5.3 Results and discussion

### 5.3.1 Screening for Ca<sup>2+</sup> and Cl<sup>-</sup> insensitive laccases

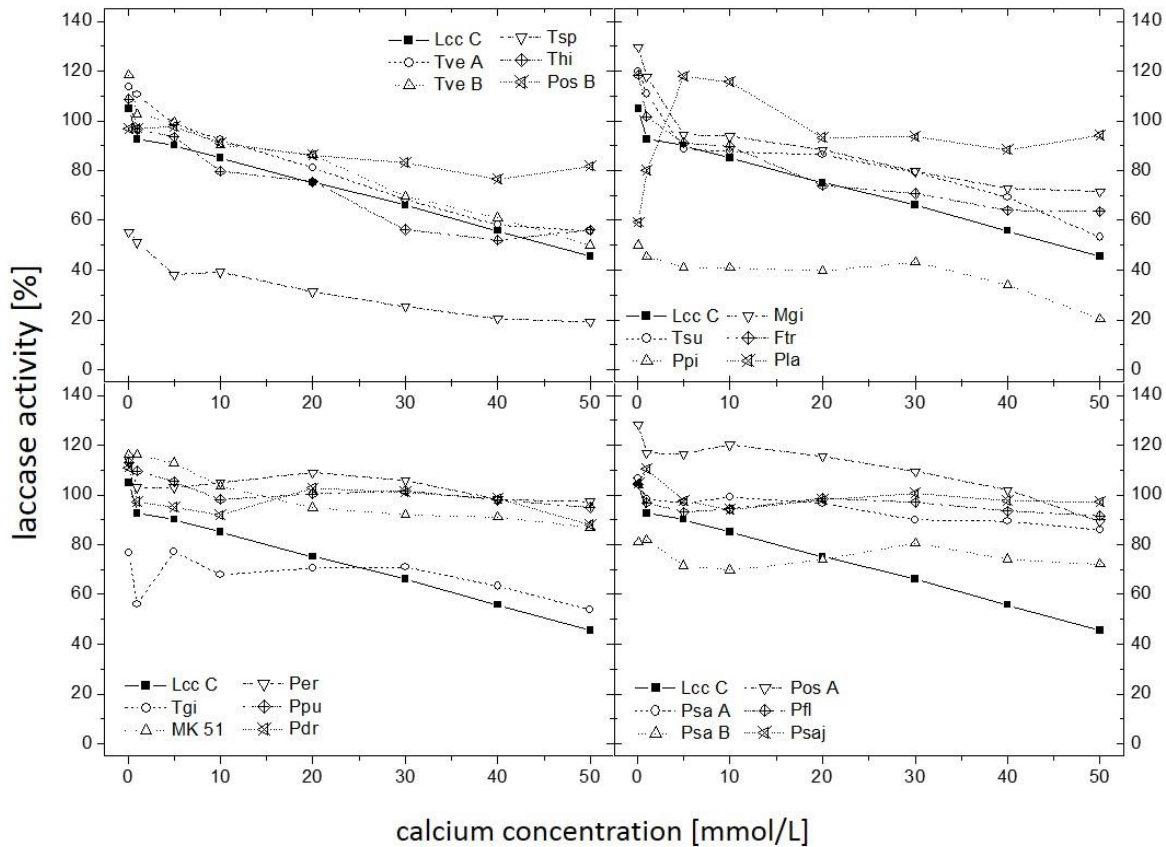
The effect of ions naturally occurring in milk on laccase activity was examined. Inhibition tests were performed with culture supernatants of the cultivated strains in comparison to commercial Lcc C. The studied concentration ranges were guided by the typical concentrations of the tested ions (K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Cl<sup>-</sup>, phosphate, citrate) in fermented dairy products, such as yoghurt (Tab. 5-2). Lcc C was chosen as the reference enzyme because of its ability to cross-link milk proteins in skimmed milk yoghurt to enhance its rheological properties in previous studies (Struch *et al.*, 2015).

#### 5.3.1.1 Effect of calcium on laccase activity

The inhibition tests with different concentrations of calcium ions revealed distinct effects on Lcc C and the different fungal laccases. With increasing Ca<sup>2+</sup> concentration the enzyme activity of Lcc C was decreasing linearly: only 45 % of the initial activity was found with 50 mmol/L Ca<sup>2+</sup> (Fig. 5-1). This proved that Ca<sup>2+</sup> exerted an inhibitory effect on Lcc C at concentrations relevant in dairy milk products. The inhibition of laccases by Ca<sup>2+</sup> was assumed to be the result of interactions with negatively charged amino acids residues of the laccase (Dwivedi *et al.*, 2011; Hu *et al.*, 2014; Rodríguez Couto *et al.*, 2005). This interaction, according to the pH of the surroundings, may cause a modification of the conformation of the peptide chain. The degree of inhibition depends on the individual amino acid sequence and will vary for different laccase species. For example, the laccase from *Meripilus giganteus* (CBV46340.1) (Schmidt *et al.*, 2011) contained ten glutamic acid residues and 35 aspartic acid residues in its sequence, whereas a laccase from *Pleurotus sapidus* (CAH05069.1) (Linke *et al.*, 2005) exhibited 13 glutamic acid residues and 38 aspartic acid residues.

The inhibition of laccases produced by Tve A, Tve B, Ftr and Thi proceeded similarly to the inhibition of Lcc C. Laccases of Tgi, Tsp, Ppi, Pla, Psa B showed inhibition already at very low calcium concentrations of 0.1 mmol/L. Laccases of Tsp and Ppi were massively inhibited to 20 % of the initial activity at 50 mmol/L Ca<sup>2+</sup>. Some laccases were less inhibited by calcium ions, even at higher concentrations: Pla (> 5 mmol/L), Mgi (> 10 mmol/L), Tsu (> 10 mmol/L), Psa B (> 30 mmol/L). Several laccases were only slightly or not inhibited by calcium concentrations typically present in milk products. Laccase activities of Psaj, Pfl, Psa A and Pos B were minimally decreased (minimum of 85 % residual activity for Psa A) in the presence of Ca<sup>2+</sup>. The enzyme activity of laccases produced by Pdr, Per and Ppu remained unaltered or showed just minor inhibition (< 5 %) in the range of calcium concentrations examined. The opposite effect was found for the laccases from Per (10-30 mmol/L Ca<sup>2+</sup>) and Ppu (0.1-10 mmol/L Ca<sup>2+</sup>) revealing strongly increased activities. The above supposed conformational change of the protein structure in the presence of Ca<sup>2+</sup> at lower concentrations (1-5 mmol/L) may have promoted the laccase activity. This kind of effect was demonstrated for laccases

of the white rot fungus *Ganoderma lucidum* (Murugesan *et al.*, 2009). As a result, the accessibility of substrate molecules (e. g. tyrosine residues of casein) into the active site of laccases was improved and the conversion rate increased. The determination of kinetic rate constants would give more insight into the effect of calcium ions on the reaction. It is also possible that the transport of electrons is favoured after a change of the enzymes protein structure. With increasing  $\text{Ca}^{2+}$  concentration the protein structure of laccases changes further, possibly resulting in a deformation of the active site.



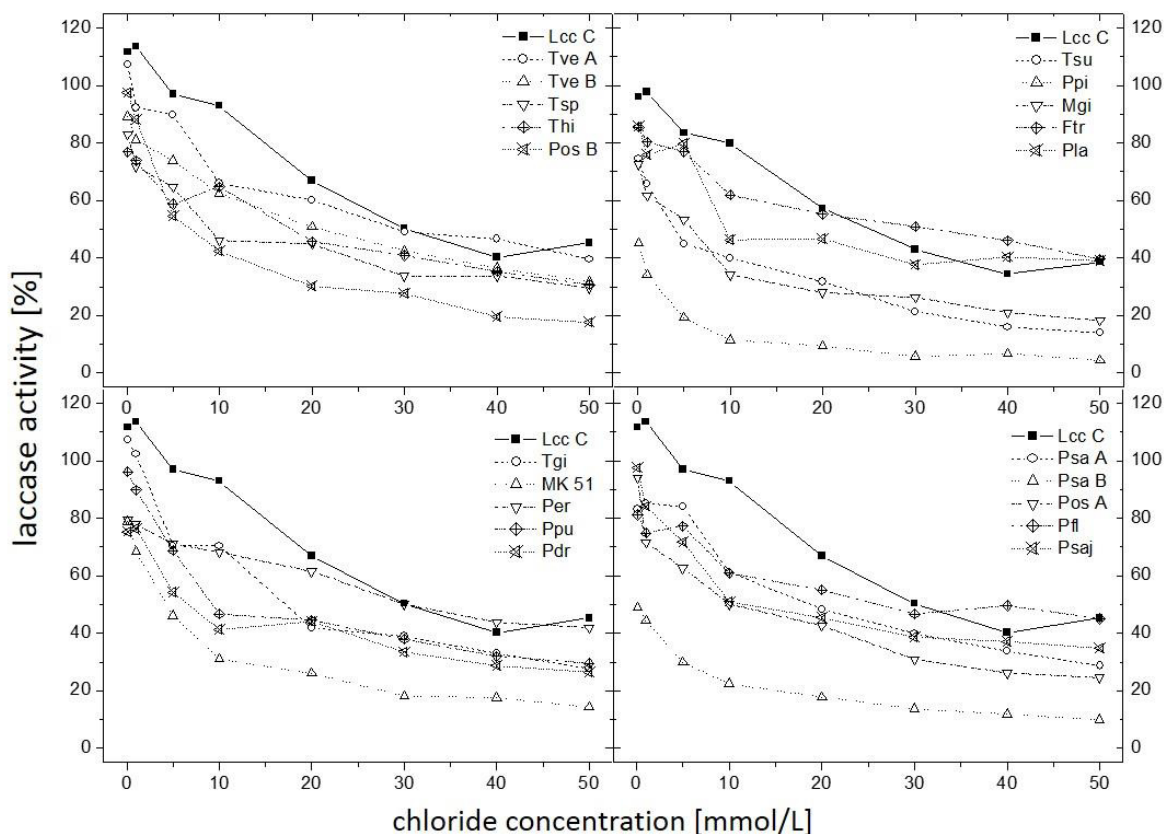
**Fig. 5-1** Relative activities of laccases produced by different fungal species in inhibition tests with calcium ions (0.1-50 mmol/L) by comparison to the reference enzyme Lcc C. Abbreviations of fungal species are listed in Tab. 5-1.

### 5.3.1.2 Effect of chloride on laccase activity

Chloride strongly inhibited all laccases including the reference enzyme Lcc C (Fig. 5-2). Laccase activity decreased for most of the tested enzymes about 40 to 80 % with increasing chloride concentrations up to 50 mmol/L. For Lcc C a loss of activity of about 55 % referring to the initial laccase activity was measured at a chloride concentration of 50 mmol/L. At lower concentrations from 0.1 to 1 mmol/L, no inhibition was detected for Lcc C. This is a special characteristic in comparison to other tested laccases (Dwivedi *et al.*, 2011; Nitheranont *et al.*, 2011; Xu, 1996): inhibition by chloride is usually observed at low concentrations for most of the fungal laccases.

Only 0.1 mmol/L chloride were necessary to decrease laccase activity of Ppi and Psa B to 50 %. At a chloride concentration of 50 mmol/L an activity of about 10 % remained for these laccases. In general the enzyme activity decreased distinctively from 0.1 to 20 mmol/L for laccases of Mgi, MK 51, Ppu, Pla and Psaj. All laccases produced by the screened fungi were less tolerant towards chloride except Ftr, Tve A, Per, Pla and Pfl. Laccases of these strains were comparably or less sensitive towards chloride ions at concentrations from 20 to 50 mmol/L. Laccases of Ftr were even more active compared to Lcc C at 30 and 40 mmol/L chloride and laccases of Pla and Pfl were less inhibited by chloride at 40 mmol/L compared to the reference enzyme. The results of the chloride inhibition tests agreed with the above mentioned studies. The loss of activity is a result of an impeded electron transport caused by chloride ions binding to the trinuclear T2/T3 copper cluster at the active site of laccases (Enaud *et al.*, 2011; Xu, 1996).

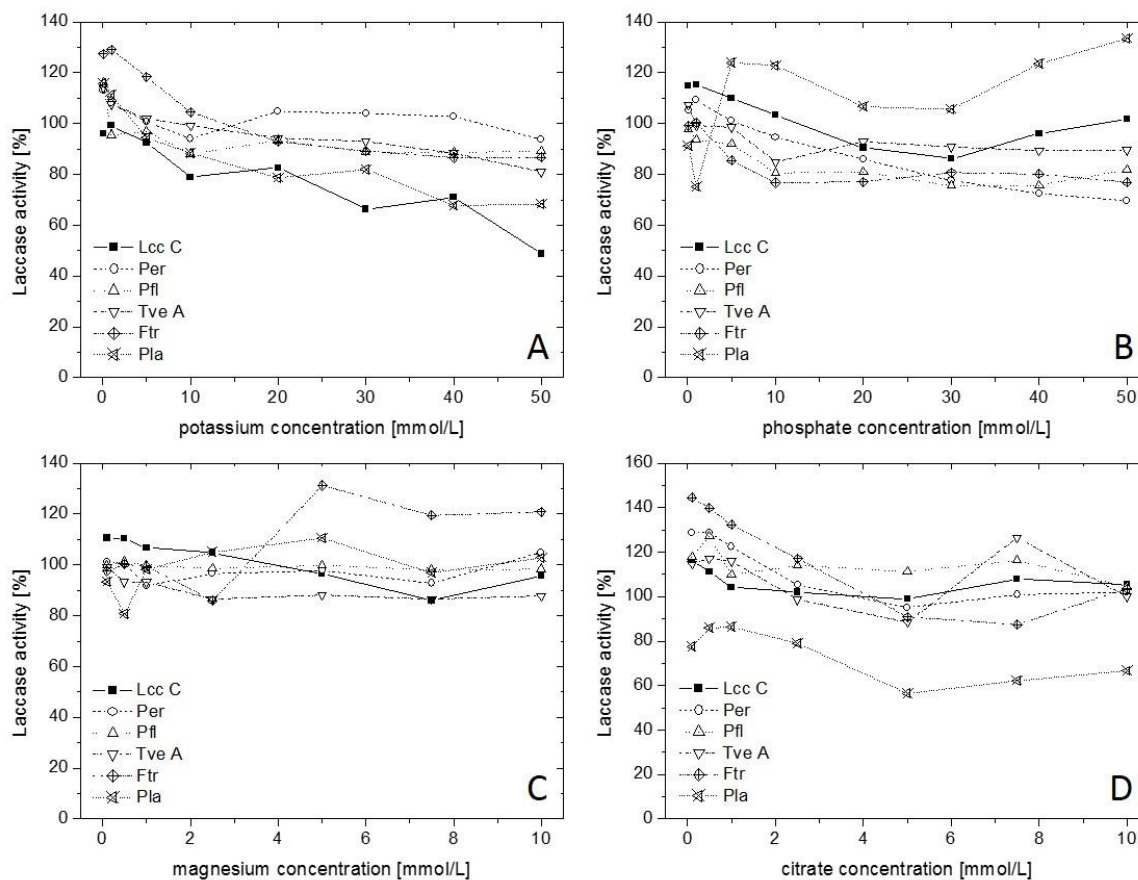
The inhibition tests examining the influence of calcium and chloride ions on the enzyme activity of the tested laccases indicated that Per, Ftr, Tve A, Pfl and Pla produced laccases as tolerant as the reference enzyme, Lcc C, or even less sensitive towards these ions at higher concentrations (20 to 50 mmol/L). Presumably these laccases were more suitable for cross-linking in skimmed milk yoghurt than Lcc C.



**Fig. 5-2** Relative activities of laccases produced by different fungal species in inhibition tests with chloride ions (0.1-50 mmol/L) by comparison to the reference enzyme Lcc C. Abbreviations of fungal species are listed in Tab. 5-1.



## 5.3.2 Inhibition tests with potassium, phosphate, magnesium and citrate



**Fig. 5-3** The inhibiting effect of (A) potassium ions (0.1-50 mmol/L), (B) phosphate (0.1-50 mmol/L), (C) magnesium ions (0.1-10 mmol/L) and (D) citrate (0.1-10 mmol/L) on laccase activity of five selected fungal species (Per – *Pleurotus eryngii*, Pfl – *Pleurotus flabellatus*, Tve A – *Trametes versicolor*, Ftr – *Funalia trogii*, Pla – *Pleurotus lampas*) by comparison to Lcc C as reference enzyme.

The laccases of Per, Ftr, Tve A, Pfl and Pla were submitted to further inhibition tests. Both strong or minor inhibition were measured for the tested ions which corresponds to data of previous studies (Hu *et al.*, 2014; Murugesan *et al.*, 2009; Nagai *et al.*, 2003; Nitheranont *et al.*, 2011; Rodríguez Couto *et al.*, 2005). These observations were based on empirical data, and little is known about specific mechanisms affecting laccase activity.

In the presence of potassium, the activity of Lcc C was decreasing with increasing  $K^+$  concentration to a minimum of 50 % of the initial activity at 50 mmol/L (Fig. 5-3A). A comparable loss of activity was measured for laccases of Pla (70 % at 50 mmol/L  $K^+$ ). Enzyme activity of Ftr laccase was enhanced with 0.1 to 10 mmol/L  $K^+$ . Laccases of Per, Tve A and Pfl were less sensitive to  $K^+$  and just slightly affected.

In general, phosphate was a weak inhibitor. The enzyme activity decreased slightly up to a concentration of 5 mmol/L and did not decrease further with increasing concentrations of phosphate (Fig. 5-3B). Lcc C

seemed to be more tolerant compared to other laccases and showed increased activity; only at a concentration of 30 mmol/L phosphate a loss of 15 % was noted. Solely laccases of Pla were more active (5-50 mmol/L). The activity of the Tve A laccases was higher in the range of 20 to 30 mmol/L phosphate compared to Lcc C. Ftr, Pfl and Per laccases were affected slightly more than the reference enzyme from 0.1 to 30 mmol/L.

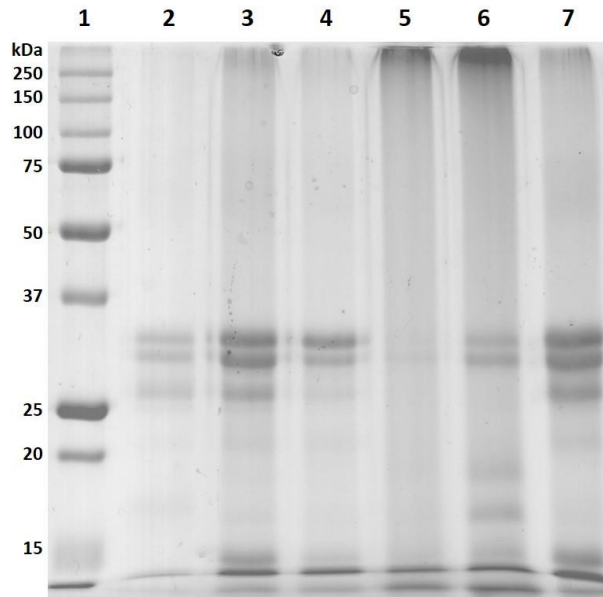
Magnesium had only weak positive or negative impacts on laccases. Nagai *et al.* (2003) found slightly enhanced activities of a laccase from *Lentinula edodes* with 1 mmol/L MgCl<sub>2</sub>. Nitheranont *et al.* (2011) proved MgSO<sub>4</sub> having no effect on activity of a *Grifola frondosa* laccase at a concentration of 1 mmol/L and a loss of about 5 % with 5 mmol/L. The results observed here agreed with the previous studies. A maximum loss of about 20 % was measured among all tested laccases in the presence of magnesium ions. Lcc C was not inhibited at concentrations of 0.1 to 5 mmol/L but with 7.5 mmol/L its activity decreased by 15 % (Fig. 5-3C). Laccase activity of Pfl remained unaltered in the tested range. Mg<sup>2+</sup> also increased the activity of some laccases: Per, Pla and Tve A showed enhanced activities compared to Lcc C at concentrations higher than 2.5 mmol/L Mg<sup>2+</sup>. Ftr possessed about 120 % of the initial laccase activity in the range from 5 to 10 mM.

Four of the tested laccases were not or just slightly inhibited by citrate, such as Lcc C and the laccases of Per, Pfl and Tve A (Fig. 5-3D). Laccases of Pla showed the strongest inhibition with citrate (remaining laccase activity: 56 % at 5 mmol/L). It was assumed that citrate may have acted as a chelating agent on the copper atoms of laccases (Lorenzo *et al.*, 2005; Zavarzina *et al.*, 2004). Lorenzo *et al.* (2005) reported a *Trametes versicolor* laccase being inhibited by citric acid with just a minor decrease of the enzyme activity. However, Ftr laccase was strongly activated (about 145 % of initial activity with 0.1 mmol/L). The converse argument for the Ftr laccase would conclude that the copper ions of this enzyme are well protected against this chelator.

### 5.3.3 Cross-linking of casein

Standardised activities of the overall least inhibited laccases of Ftr, Per, Pfl, Tve A and Lcc C (1 U) were incubated with purified casein (Post *et al.*, 2009) at pH 4.5 to assess their application potential. Unfortunately, Pla did not produce enough laccase activity for casein cross-linking. Modifications of casein were followed by the electrophoretic detection of the protein patterns (Fig. 5-4). The intensity of the casein bands decreased markedly during incubation with the laccase of Per, while protein aggregates with molecular masses above 250 kDa were formed. The laccase of Pfl caused a complete disappearance of  $\kappa$ -casein and an intense protein band larger than 250 kDa appeared, as it was shown for Lcc C by Struch *et al.* (2015). Moreover, two protein bands below 20 kDa appeared for this sample indicating an enzymatic protein fragmentation (Lantto *et al.*, 2005). When incubated with Lcc C or laccases of Ftr and Tve A, the casein bands remained almost unaltered, and the protein band larger than 250 kDa was less intense compared to Pfl and Per laccases. The cross-linking of casein in the presence of a mediator

worked even better for all tested laccases (data not shown). Finally, Per was chosen as the candidate with the most suitable over-all profile of attributes for cross-linking tests in yoghurt. This enzyme was purified according to Nieter *et al.* (2014).



**Fig. 5-4** SDS-PAGE after cross-linking of casein with laccases of selected fungal species and Lcc C (100 mmol/L sodium acetate buffer, pH 4.5; 30 °C; 20 h): (1) protein standard Precision Plus Protein™ Dual Color (Bio-Rad, München, Germany), (2) casein blank, (3) casein + Lcc C, (4) casein + Ftr, (5) casein + Per, (6) casein + Pfl, (7) casein + Tve A.

### 5.3.4 Cross-linking of skimmed milk yoghurt

**Tab. 5-3** Complex shear viscosity,  $\eta^*$ , storage modulus,  $G'$ , and loss modulus,  $G''$  ( $\omega = 0.1$  rad/s), of skimmed milk yoghurt. Data refer to control skim milk yoghurt samples (Y), mediator blank (Y + M), yoghurt after cross-linking of milk proteins using 0.1 U laccase per gram of yoghurt (Y + Lcc Per; Y + Lcc C) and samples with an additional 5 mmol/L of vanillin (0.1 U/g Lcc Per or Lcc C; 1.0 U/g Lcc Per or Lcc C) (24 h at 25 °C) as mediator. Values are means  $\pm$  standard deviation.

Yoghurt sample	Viscoelastic property		
	$\eta^*$ (Pa s)	$G'$ (Pa)	$G''$ (Pa)
Y	1685 $\pm$ 67	155 $\pm$ 8	65 $\pm$ 4
Y + M	1688 $\pm$ 35	156 $\pm$ 6	65 $\pm$ 3
Y + Lcc Per	1395 $\pm$ 69	129 $\pm$ 7	54 $\pm$ 1
0.1 U/g Lcc Per	2134 $\pm$ 70	197 $\pm$ 8	82 $\pm$ 2
1.0 U/g Lcc Per	901 $\pm$ 25	39 $\pm$ 1	81 $\pm$ 4
Y + Lcc C	1585 $\pm$ 75	147 $\pm$ 6	60 $\pm$ 2
0.1 U/g Lcc C	1775 $\pm$ 64	165 $\pm$ 4	68 $\pm$ 1
1.0 U/g Lcc C	11250 $\pm$ 401	4495 $\pm$ 122	3800 $\pm$ 112

In cross-linking studies with plain stirred skimmed milk yoghurt, the effect of the less sensitive Lcc Per at different dosages was compared to Lcc C. The results demonstrated the dose dependent action of laccases. Without the addition of the mediator, both laccases (Y + Lcc C; Y + Lcc Per) were not able to enhance the viscoelastic properties of yoghurt compared to the yoghurt reference (Y), as measured by the complex shear viscosity  $\eta^*$ , the shear storage modulus  $G'$  and the shear loss modulus  $G''$  (Tab. 5-3). No syneresis or change of colour became visible in any of the samples. The mediator blank (Y + M) without the addition of laccase assured that there was no influence of the mediator alone. A laccase activity of 0.1 U Lcc Per per gram yoghurt increased the rheological indicators by 30 % for  $\eta^*$  and  $G'$  (Tab. 5-3) in the presence of 5 mmol/L of the mediator vanillin. However, with 1 U/g Lcc Per applied to the yoghurt the viscoelastic parameters were decreased by about 50 % for  $\eta^*$  and even 75 % for  $G'$ . Increasing the laccase activity did not result in a cross-linking but in a fragmentation of the milk proteins (Fig. 5-4). For activities less than 0.1 U/g of Lcc Per neither cross-linking nor degradation was detected. Consequently, Lcc Per had a narrow activity optimum for the cross-linking of yoghurt. In contrast, 0.1 U/g of Lcc C resulted in rheological parameters comparable to the yoghurt reference (Y). An activity of 1 U/g Lcc C applied to the yoghurt enhanced all indicators tenfold. With further increasing Lcc C activity the viscoelastic properties increased likewise (Struch *et al.*, 2015). Thus, a dosage typical for Lcc C led to a breakdown of the yoghurt structure when Lcc Per was used instead. Peptidolytic activity was below the detection limit. The fragmentation of proteins by laccases is assumed to be induced by radicals formed by electron abstraction (Claus, 2003). Laccase-treated arabinoxylan showed poor stability properties, probably due to depolymerisation by radicals (Carvajal-Millan *et al.*, 2005). Selinheimo *et al.* (2006) reported a softening of dough when a *Trametes hirsuta* laccase was applied in high doses. Lantto *et al.* (2005) observed simultaneous cross-linking and fragmentation reactions in chicken-breast myofibril proteins catalysed by a *T. hirsuta* laccase. No fragmentation was found when a *Myceliophthora thermophila* laccase was applied in a similar matrix (Lantto *et al.*, 2007a). In these studies it was assumed that laccase-induced protein degradation proceeds similar to other oxidative modifications (Martinaud *et al.*, 1997; Xiong *et al.*, 1995). Possibly the less inhibited Lcc Per produced more radicals at an activity of 1 U/g than the reference enzyme leading to the observed breakdown of the yoghurt structure.

### 5.4 Conclusion

Ions naturally occurring in milk, such as calcium and chloride, are known as laccase inhibitors. Laccases which were less affected by these ions compared to Lcc C were presumed to enable an effective cross-linking in fermented dairy products at low dosages. Out of 20 fungal strains, five species produced laccases which were less inhibited by calcium and chloride ions compared to the reference enzyme. Particularly effective was Lcc Per which cross-linked casein completely and showed a cofactor-

mediated cross-linking in skimmed milk yoghurt at a low activity of 0.1 U/g. Higher activities resulted in a degradation of proteins and consequently decreased the viscoelastic properties. As a result, the radical mechanism of the laccase-catalysed reactions may result in building up or breaking down a food structure. The inhibition of laccases, such as Lcc C, by higher concentrations of the ions of the milk offers a more controllable cross-linking reaction which can be modified by dose ( $\geq 1$  U/g) and mediator concentration compared to an ion insensitive laccase, such as Lcc Per. Not only the redox potential, amount of activity applied and the operational properties, but also the different tolerance of laccases against ions common in foods need to be observed to achieve the aspired strengthening of the food structure in a specific chemical environment. Further studies are necessary to reveal the impact of laccase-catalysed radical reactions on food biopolymers, such as proteins.

### **Acknowledgement**

This project (AiF 17475 N) was supported by the Arbeitsgemeinschaft industrieller Forschungsvereinigungen "Otto von Guericke" e. V. (AiF) through FEI (Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V., Bonn) and ASA Spezialenzyme (Wolfenbüttel, Germany). The authors thank Robin Leonhardt for proofreading the manuscript.

## **6 Vorwort zu “Evaluation of the suitability of laccases for the application in skimmed milk yoghurt”**

Für den Einsatz eines Enzyms im Lebensmittel müssen auch die Wirkungen auf andere Inhaltsstoffe als die zu vernetzenden bewertet werden. Für Laccasen gibt es in dieser Hinsicht noch keine Untersuchungen in einem komplexen Lebensmittel und nur wenige Studien, die sich mit oxidativen Modifikationen von Aminosäuren durch Laccasen beschäftigt haben (Mattinen *et al.*, 2005; Steffensen *et al.*, 2008; Steffensen *et al.*, 2009).

Der radikalische Reaktionsmechanismus, der durch Laccasen initiiert wird, wird zur Quervernetzung von Proteinen und Polysacchariden funktionalisiert. Da nur der erste Schritt, die Elektronenabstraktion vom Zielsubstrat, durch Laccasen katalysiert wird und die Folgereaktion des gebildeten Radikals nicht-enzymatisch stattfindet, besteht keine Möglichkeit, diese Reaktion zu kontrollieren. Im besten Falle findet eine Kopplung von Protein-gebundenen Aminosäuren statt, was in einer Quervernetzung resultiert (z. B. Dityrosin: Fig. 1-8). Im ungünstigen Fall wird das Radikal auf ein ebenfalls empfindliches Substrat übertragen und führt so zu unerwünschten oxidativen Veränderungen an z. B. Fettsäuren oder essentiellen Aminosäuren. Die Oxidation von Fettsäuren beeinträchtigt hauptsächlich den Geschmack eines Lebensmittels und trägt erheblich zum Verderb bei (Belitz *et al.*, 2009; Pokorný, 1990). Die Veränderung von Aminosäuren führt im schlechtesten Fall zur Verminderung des Nährwerts, aber auch die Verdaubarkeit und das allergene Potential des Lebensmittels können beeinflusst werden (Buchert *et al.*, 2010; Gerrard, 2002).

Des Weiteren deckte die Suche nach einer effektiv vernetzenden Laccase (Struch *et al.*, 2016) ein weiteres Problem der oxidativen Wirkweise von Laccasen auf. Die Radikalreaktion kann auch zur Spaltung von kovalenten Bindungen führen, was sich in einem Abbau der Proteinstruktur und verringerter Gelstärke widerspiegelt.

Die Untersuchungen in Kapitel 7 befassen sich mit der Analyse der Joghurtkomponenten hinsichtlich oxidativer Veränderungen infolge Laccase-katalysierter Reaktionen. Auch die Verdaubarkeit vernetzter Joghurtproben und die Proteinfragmentierung während der Vernetzungsreaktion wurden untersucht. Anhand der Ergebnisse der Untersuchungen sollte eine Einschätzung getroffen werden, inwiefern sich Laccasen für den Einsatz im Lebensmittel Joghurt eignen.

## 7 Evaluation of the suitability of laccases for the application in skimmed milk yoghurt

### Abstract

The cross-linking of milk proteins in skimmed milk yoghurt proceeds *via* laccase-induced radical formation. Oxidation-sensitive compounds, such as fatty acids and amino acids, must remain unaffected of oxidative side reactions upon laccase-catalysed cross-linking. In this study, oxidative modifications that influence food negatively were examined. Amino acids were not affected but tasting of cross-linked whole milk yoghurt samples revealed oxidation of fatty acids that were below the detection limit of gas chromatographic analyses. Additionally, the influence of the redox potential of laccases was examined concerning cross-linking and fragmentation of proteins in skimmed milk yoghurt. Enzyme-treated yoghurt samples were as susceptible to simulated digestion as the untreated control. Furthermore, the cross-linking with 3 U/g of Laccase C (Lcc C) was correlated to an increase of the protein concentration of about 3 % to achieve comparable viscoelastic properties. Besides the taste of the cross-linked yoghurt samples, Lcc C was evaluated to be suitable for the application in skimmed milk yoghurt.

### Keywords

Laccase, cross-linking, oxidative side reactions, amino acids, lipid oxidation, protein degradation, digestibility

### 7.1 Introduction

Food systems consist mostly of complex mixtures of different proteins. On one side this offers the potential for enzymatic modifications to strengthen the structure or to improve the texture of food. On the other side the cross-linking of food protein matrices is demanding. Transglutaminase (EC 2.3.2.13) is the only enzyme so far that accomplished this task. Transglutaminases are applied in different kinds of food, such as meat and fish products, baked goods and pasta (Buchert *et al.*, 2007). They catalyse the formation of isopeptide bonds between glutamyl and lysyl side chains of proteins. Due to its non-redox mechanism, no side reactions were reported for transglutaminases, besides the deamidation of glutamic acid residues in the absence of an acyl acceptor (Jaros *et al.*, 2006; Motoki *et al.*, 1998).

Oxidoreductases are another class of enzymes that are considered to be applicable to foods (Heck *et al.*, 2013; Matheis *et al.*, 1987). Tyrosinases (EC 1.14.18.1) were shown to cross-link small tyrosine-containing peptides, milk proteins, meat proteins and cereal (Lantto *et al.*, 2007b; Mattinen *et al.*, 2008;

Selinheimo *et al.*, 2007a; Selinheimo *et al.*, 2007b; Selinheimo *et al.*, 2008). Due to colour formation resulting from the uncontrollable non-enzymatic reaction of reactive quinones, the applicability of tyrosinases in food products may be limited (Bittner, 2006; Buchert *et al.*, 2010; Matheis *et al.*, 1984). Cross-linking with peroxidases (EC 1.11.1.-) was studied in small peptides (Michon *et al.*, 1997),  $\alpha$ -lactalbumin (Saricay *et al.*, 2013) and set-style yoghurt (Wen *et al.*, 2012). Matheis *et al.* (1984) reported a dough improving effect and gels from gelatine and silk fibroin as a result of cross-linking by exerting a peroxidase/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-system. The addition of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> to food products depends on food regulations of every individual country and is as in consequence a disadvantage for the application of peroxidases for the cross-linking of food proteins. Among the enzyme class of oxidoreductases, especially laccases hold the potential to challenge the position of transglutaminase since they are capable of cross-linking both structured and unstructured proteins, but also polysaccharides (Chen *et al.*, 2012; Flanagan *et al.*, 2006; Selinheimo *et al.*, 2008; Steffensen *et al.*, 2008). Laccases (EC 1.10.3.2) offer a broad substrate range what makes them attractive for industrial applications. Furthermore, only ubiquitous dioxygen is needed as electron acceptor and the concomitantly produced water is the sole by-product of the laccase reaction (Jones *et al.*, 2015). In previous studies, laccases proved their capability for cross-linking of tyrosine-containing peptides (Mattinen *et al.*, 2005; Steffensen *et al.*, 2009), milk proteins (Ercili Cura *et al.*, 2009; Færgemand *et al.*, 1998; Hiller *et al.*, 2008; Steffensen *et al.*, 2008; Struch *et al.*, 2015), gelatine (Jus *et al.*, 2012) and conjugates of proteins and oligosaccharides (Selinheimo *et al.*, 2008). Previous studies also revealed the involvement of laccases in the fragmentation of proteins. This observation was made not only for model substrates, such as small tyrosine-containing peptides (Steffensen *et al.*, 2009) and laccase-treated arabinoxylan (Carvajal-Millan *et al.*, 2005; Labat *et al.*, 2000), but also for chicken-breast myofibril proteins (Lantto *et al.*, 2005), and milk proteins of a skimmed milk yoghurt (Struch *et al.*, 2016). The radical mechanism of the laccase-catalysed reaction was assumed to be responsible for the cleavage of bonds resulting in protein degradation, as it was comparable to other radical-derived oxidative modifications (Martinaud *et al.*, 1997; Xiong *et al.*, 1995).

A thorough understanding of the oxidative action of laccases in proteinaceous systems is the prerequisite for application in protein rich food matrices such as fermented dairy products. Skimmed milk yoghurt was cross-linked successfully and the enzymatic approach appears to be promising (Struch *et al.*, 2015), but sensitive compounds, such as essential amino acids and unsaturated fatty acids, must remain unaffected of the oxidative mode of action of laccases for a transfer into practice. Both, modification and cross-linking of amino acids can impair the nutritional value of a food product. Tyrosine and cysteine are known to be involved into laccase-initiated cross-linking reactions (Figuroa-Espinoza *et al.*, 1998; Labat *et al.*, 2000; Mattinen *et al.*, 2005; Mattinen *et al.*, 2006; Steffensen *et al.*, 2009). The oxidation of tryptophan, histidine and methionine to *N*-formylkynurenine respectively kynurenine, 2-oxo-histidine and methionine-derived carbonyl compounds were reported for laccases (Steffensen *et al.*, 2008). The oxidation of fatty acids present in at least small amounts in skimmed milk yoghurt has a negative impact on the taste impression (Belitz *et al.*, 2009; A. Ott *et al.*, 1997). The impairment of



nutritional characteristics is an undesirable effect, but it is not necessarily caused by enzyme action. Different processing conditions, such as heating or grinding, likewise lead to oxidative damages of fatty and amino acids (Buchert *et al.*, 2010; Gardner, 1979; Xiong *et al.*, 1995).

To the best of our knowledge, this is the first study analysing possible side reactions of laccases in skimmed milk yoghurt. This study comprises different analytical methods to evaluate the oxidative mode of action of laccases during the cross-linking reaction regarding sensitive ingredients, such as amino and fatty acids. The degradation of milk proteins during cross-linking with laccases was examined concerning the influence of the redox potential of laccases. The increase of viscosity as a result of an increased protein concentration was compared to laccase-catalysed crosslinking of skimmed milk yoghurt.

## **7.2 Materials and methods**

### **7.2.1 Materials**

All chemicals were used in highest purity grade and obtained from Carl Roth (Karlsruhe, Germany), AppliChem (Darmstadt, Germany), Fluka (Buchs, Switzerland), Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Germany), Riedel-de Hën (Seelze, Germany) and VWR International GmbH (Darmstadt, Germany), respectively. Stirred skimmed milk yoghurt with a protein concentration of 5.5 % and a lipid concentration of 0.1 % and whole milk yoghurt with a protein concentration of 4.5 % and a lipid concentration of 3.5 % were obtained from Weihenstephaner Molkerei (Freising, Germany). Skimmed milk powder with a protein concentration of 35.5 % was obtained from Saliter (Obergünzberg, Germany).

### **7.2.2 Enzymes**

The fungal Laccase C (Lcc C) from *Trametes spec.* and Laccase A (Lcc A) from *Agaricus bisporus* were purchased from ASA Spezialenzyme (Wolfenbüttel, Germany) and used as received. Pepsin from porcine gastric mucosa was obtained from Sigma-Aldrich. Trypsin from bovine pancreas was purchased from Amresco (Ohio, USA).

### **7.2.3 Cross-linking of yoghurt samples**

Cross-linking of yoghurt samples was implemented as described earlier (Struch *et al.*, 2015). Commercial stirred plain skimmed milk yoghurt with a protein concentration of 5.5 % and a lipid concentration of < 0.1 % was used, unless stated otherwise. For cross-linking tests, Lcc C and Lcc A were applied. All samples were treated the same way: after homogeneous stirring, the yoghurt was set

to 40 °C for 30 min, stirred gently for a second time and then incubated at 25 °C for 24 h. Yoghurt without the addition of enzyme or mediator represented the reference (Y). The mediator blank (Y + M) consisted of 5 mmol/L (0.9 mg/g) mediator caffeic acid ((*E*)-3-(3,4-dihydroxyphenyl)-2-propenoic acid) which was added before the yoghurt was set to 40 °C. No laccase was added to the mediator blank. For the preparation of the enzyme blank (Y + Lcc), 3 U laccase per gram (U/g) yoghurt were added directly after the incubation at 40 °C for 30 min. No mediator was added to the enzyme blank. For the cross-linking reaction, 5 mmol/L of caffeic acid was added to the yoghurt, stirred gently and set to 40 °C before 3 U laccase per gram yoghurt, respectively, were added.

### 7.2.4 Preparation of skimmed milk yoghurt samples with different protein concentrations

The same skimmed milk yoghurt as for the cross-linking reaction was used and different amounts of skimmed milk powder were added to the yoghurt for the setting of miscellaneous protein contents (6.0-11.5 %) of the samples. Then the samples were incubated for 24 h at 25 °C without the addition of laccase. A yoghurt reference without skimmed milk powder (protein content 5.5 %) was treated the same way.

### 7.2.5 Rheology

The rheological measurements were performed as described earlier (Struch *et al.*, 2015).

### 7.2.6 Quantification of amino acids

Cross-linked yoghurt samples were subjected to acidic hydrolysis with 6 N HCl at 100 °C for 16 h (Matissek *et al.*, 2014). Then amino acids were analysed according to Giesler *et al.* (2013). The measurements were performed in triplicates.

### 7.2.7 Enzymatic incubation of amino acids

Solutions of single amino acids (L-tryptophan, L-methionine, L-histidine, L-tyrosine, L-lysine, L-proline, L-cysteine, L-threonine, L-phenylalanine, L-arginine) were prepared in 0.1 mol/L sodium acetate buffer, pH 4.5 with 2 % ethanol. The first test included the incubation of 950  $\mu$ L of the 2 mmol/L amino acid solution with 50  $\mu$ L Lcc C (28 mg/mL) for 24 h at 40 °C. For the second test, 475  $\mu$ L of a 2 mmol/L single amino acid solution were added to 475  $\mu$ L of 2 mmol/L tyrosine solution and incubated with 50  $\mu$ L Lcc C (28 mg/mL) for 24 h at 40 °C. For the control samples, Lcc C was replaced by an equivalent amount of bidest. H<sub>2</sub>O. The reaction was stopped by heating to 99 °C for 10 min. Before the samples were analysed by mass spectrometry, the enzyme was precipitated by the addition of 1000  $\mu$ L of ice cold methanol (HPLC-grade) and subsequent centrifugation at 0 °C for 15 min at 17,000 $\times$ g. The supernatant was transferred into a glas vial.

### 7.2.8 Mass spectrometry

For the identification of oxidative modifications and cross-linking of amino acids due to laccase reaction, high performance liquid chromatography coupled to a triple quadrupole mass analyser was conducted (Varian 212-LC Chromatography Pump, ProStar 325 UV-Vis Detector, 320 TQ-MS mass spectrometer). The MS was performed simultaneously in the ESI positive and negative mode with a scan range of  $m/z$  115–700. The MS parameters for ESI(+)/ESI(-) were: capillary voltage +30 V/-20 V, needle voltage 5000 V/-4500 V, nebulizer gas (N<sub>2</sub>) 379 kPa, drying gas (N<sub>2</sub>) 207 kPa at 350 °C. For HPLC, water and acetonitrile (MS-grade), both containing 0.1 % formic acid, were used as the mobile phase, and the following linear gradient was used: 2 % acetonitrile for six min, up to 100 % acetonitrile within 32 min, hold for seven min and back to start conditions within seven min. The separation was performed on a Nucleodur C18 Pyramid column (250 × 4 mm, 5 μm, Macherey-Nagel, Düren, Germany) at a flow rate of 500 μL/min. Additionally, UV absorption was monitored at 214 and 280 nm.

### 7.2.9 Analysis of fatty acids

For the examination of a potential oxidative impact of laccases on the fatty acids of yoghurt, whole milk yoghurt samples (fat concentration 3.5 %) were incubated with Lcc C in the presence of different mediators (CA - caffeic acid, VA - vanillic acid, V - vanillin) for seven days at 25 °C (Tab. 7-1).

**Tab. 7-1** Samples prepared for the examination of a possible oxidative impact of Lcc C on fatty acids

Sample	Yoghurt [g]	Lcc C [U/g]	Mediator [mmol/L] / [mg/g]
Y	30	-	-
Y + Lcc	30	3	-
Y + CA	30	-	5 / 0.90
Y + VA	30	-	5 / 0.84
Y + V	30	-	5 / 0.76
Y + Lcc + CA	30	3	5 / 0.90
Y + Lcc + VA	30	3	5 / 0.84
Y + Lcc + V	30	3	5 / 0.76

A standard protocol for the extraction of fatty acids from food matrices according to Weibull-Stoldt was used (Matissek *et al.*, 2014). After derivatisation with sodium methoxide, samples were analysed by gas chromatography. For each sample, 1.0 μL of the derivatised extract was injected into a Perkin Elmer Auto System XL gas chromatograph (Perkin Elmer, Rodgau, Germany) with a 30 m × 0.32 mm i.d. × 0.25 μm Optima Wax column (Macherey-Nagel, Düren, Germany). The system was equipped with an autosampler and a split/splitless injector, operating in the split mode (1:10; 275 °C). Volatiles were detected using a flame ionisation detector (250 °C). The oven temperature was held at 150 °C for 4 min, raised at 4 °C/min to 250 °C followed by 25 °C/min to 325 °C and held for 5 min. Hydrogen was used

as carrier gas at a flow rate of 2 mL/min. Identification of the fatty acids was performed using a fatty acid methyl ester standard mix (Supelco® 37 Component FAME Mix, Sigma-Aldrich) and nonadecanoic acid methyl ester (Fluka) as internal standard.

### 7.2.10 Tasting of cross-linked yoghurt samples

For the sensory evaluation, two different kinds of yoghurt samples were prepared. Skimmed milk yoghurt and whole milk yoghurt were cross-linked with 3 U/g Lcc C in the presence of the mediator vanillin (Tab. 7-2). For every type of yoghurt, a sample without the addition of enzyme represented the reference. The sensory evaluation of the cross-linked yoghurt samples was carried out by a panel of ten judges. The yoghurt samples were assessed in two aspects: texture (creaminess, firmness and colour) and taste (vanilla aroma, lipid oxidation).

**Tab. 7-2** Yoghurt samples prepared for sensory evaluation

Sample	Yoghurt	Fat concentration	Composition	
			Lcc C [U/g]	Vanillin [mM]
1	Skimmed milk yoghurt	0.1 %	3	5
2	Skimmed milk yoghurt	0.1 %	3	1
3	Skimmed milk yoghurt	0.1 %	-	5
4	Whole milk yoghurt	3.5 %	3	5
5	Whole milk yoghurt	3.5 %	-	5

### 7.2.11 SDS-PAGE

Cross-linking respectively fragmentation of milk proteins were determined using SDS-PAGE (18 % resolving gel, 4 % stacking gel) according to Laemmli (1970). Samples were diluted in denaturing SDS sample buffer (0.1 mol/L Tris-HCl pH 6.8, 0.2 mol/L dithiothreitol, 4 % (w/v) sodium dodecyl sulphate, 20 % (w/v) glycerol, 25 mg/L bromophenol blue) and incubated at 95 °C for 10 min. After electrophoresis at 20 mA, gels were stained with InstantBlue (Expedeon, Cambridgeshire, Great Britain).

### 7.2.12 Simulated digestion of cross-linked yoghurt samples

*In vitro* gastric fluid digestion and digestion with trypsin were adapted from Tantoush *et al.* (2011) and slightly modified. Briefly, 50 µL of a cross-linked yoghurt sample were diluted with 10 µL of bidest. H<sub>2</sub>O. 20 µL of 0.4 mol/L HCl containing 8 g/L sodium chloride and 13 mg/mL pepsin were added. Digestion proceeded at 37 °C for 60 min under continuous shaking and was stopped by the addition of

5  $\mu\text{L}$  0.2 mol/L sodium carbonate. Yoghurt reference samples were prepared by the addition of bidest.  $\text{H}_2\text{O}$  instead of pepsin solution. A pepsin control consisted of 20  $\mu\text{L}$  of pepsin solution and the substrate was replaced by an equivalent volume of bidest.  $\text{H}_2\text{O}$ .

For tryptic digestion, 50  $\mu\text{L}$  of a cross-linked yoghurt sample were incubated with 10  $\mu\text{L}$  bidest.  $\text{H}_2\text{O}$  and 20  $\mu\text{L}$  of 20 mmol/L ammonium bicarbonate buffer, pH 8.0, containing 13 mg/mL trypsin. The reaction proceeded at 37 °C with continuous shaking for 60 min. The digestion was stopped by heating to 99 °C for 10 min. Yoghurt reference samples were prepared by addition of bidest.  $\text{H}_2\text{O}$  instead of trypsin solution. A trypsin control consisted of 20  $\mu\text{L}$  of trypsin solution and the substrate was replaced by an equivalent volume of bidest.  $\text{H}_2\text{O}$ .

After the digestion was stopped, samples were immediately diluted with denaturing SDS sample buffer and heated to 95 °C for 10 min. Afterwards, the samples were applied to SDS-PAGE analysis.

## **7.3 Results and discussion**

### **7.3.1 Evaluation of oxidative modification of amino acids and fatty acids**

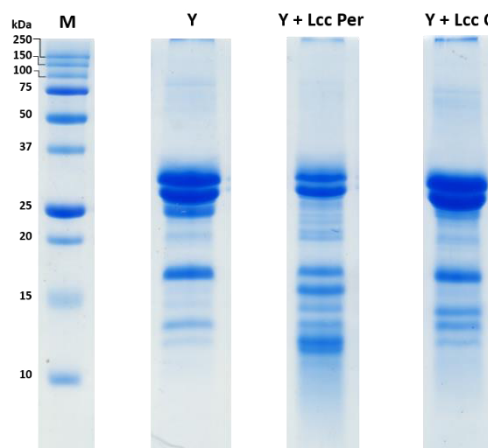
In order to ensure the use of laccases for structure formation and regeneration in dairy products it must be assured that there were no side reactions regarding oxidation-sensitive ingredients, such as fatty acids of milk fat or essential amino acids. For analytical tests, yoghurt samples were incubated with 3 U/g of Lcc C and the spectra of fatty and amino acids were analysed concerning laccase-catalysed oxidative modifications.

#### **7.3.1.1 Amino acids**

The amino acids of skimmed milk yoghurt samples cross-linked with Lcc C were analysed directly after the addition of enzyme (day 0) and at day 1 and day 7 of incubation. The concentrations of the amino acids were determined after acidic hydrolysis exerting RP-HPLC (Tab. 7-3 and Tab. 7-4). The resulting data should provide information about losses of amino acids due to oxidative alterations throughout the cross-linking reaction or if amino acids were involved in the formation of cross-links. The results of the HPLC analysis did not show explicit trends regarding the amino acid concentrations. Some, such as threonine and isoleucine, increased during incubation. Some did not vary over the whole period of incubation (alanine, methionine). The concentration of glutamic acid decreased from the start of incubation to day 7.

The amino acid concentrations of the yoghurt reference sample (Y) did not change for all three examined days. The yoghurt sample cross-linked with laccase (Y + Lcc C) revealed increasing amino acid concentrations up to day 7 except glutamic acid which decreased. The values of the yoghurt samples

with added mediator (Y + CA, VA or V) were comparable to the yoghurt reference, proving there was no influence of the mediator compounds in the absence of Lcc C (Tab. 7-4). The yoghurt samples cross-linked with Lcc C in the presence of a mediator (Y + Lcc C + CA, VA or V) showed decreasing values of glutamic acid concentration. The concentration of tyrosine that is considered to be the main substrate of laccase-catalysed cross-linking reactions was either increased or decreased but it was impossible to correlate this observation to the cross-linking reaction (Tab. 7-3). The tyrosine concentration increased for Y + Lcc + VA and Y + Lcc + V from day 0 to day 1 and subsequently decreased by day 7. However, the tyrosine concentration increased from day 0 to day 7 for the yoghurt reference (Y), but it showed a decline up to day 1 and raised again by day 7 for the yoghurt sample cross-linked with Lcc C (Y + Lcc). For all measurements, the values of tryptophan were below the detection limit. The detection of asparagine and glutamine was not possible due to the acidic hydrolysis of the samples and for proline and cysteine due to *o*PA derivatisation, respectively. Histidine and glycine co-eluted in one peak which hindered a distinct interpretation. Based on the measured concentrations of amino acids of the skimmed milk yoghurt samples throughout the incubation period, the oxidative influence of Lcc C could not be evaluated.



**Fig. 7-1** Degradation of proteins during incubation of skimmed milk yoghurt with laccases: M - Precision Plus Protein™ Standard (Bio-Rad), Y – yoghurt reference without the addition of laccase, Y + Lcc Per – yoghurt + 3 U/g Lcc Per, Y + Lcc C – yoghurt + 3 U/g Lcc C

According to Berlett *et al.* (1997) the unsteady values of the amino acid concentrations result from protein degradation and from modifications of the amino acids. In earlier studies, the laccase-treatment of skimmed milk yoghurt led to slight (Lcc C, Struch *et al.* (2015)) or pronounced (*Pleurotus eryngii* laccase (Lcc Per), Struch *et al.* (2016)) fragmentation of milk proteins (Fig. 7-1) depending on the enzyme activity in addition to cross-linking of proteins. This fragmentation does not necessarily yield in the formation of N- and C-terminal ends. The amino moiety is required for derivatisation with *o*PA, otherwise the amino acid is not detected. Additionally, amino acids derivatives could also arise from acidic hydrolysis which are also not amenable to derivatisation. The latter could be prevented by an alternative decomposition method under mild reaction conditions, such as complete hydrolysis using peptidases.

**Tab. 7-3** Concentrations of amino acids ( $\mu\text{g}/100 \text{ mg}$  yoghurt) of different yoghurt samples analysed by RP-HPLC directly after addition of 3 U/g Lcc C (Day 0) and at day 1 and day 7 of incubation at 25 °C. Values are means  $\pm$  standard deviation.

	Y			Y + Lcc			Y + Lcc + CA			Y + Lcc + VA			Y + Lcc + V		
	Day 0	Day 1	Day 7	Day 0	Day 1	Day 7	Day 0	Day 1	Day 7	Day 0	Day 1	Day 7	Day 0	Day 1	Day 7
Asp	46,0 $\pm$ 3,1	48,2 $\pm$ 3,1	51,5 $\pm$ 6,1	45,4 $\pm$ 4,9	42,0 $\pm$ 1,8	56,9 $\pm$ 3,1	45,7 $\pm$ 2,8	50,7 $\pm$ 3,5	53,7 $\pm$ 3,7	40,1 $\pm$ 5,5	51,3 $\pm$ 2,2	51,2 $\pm$ 4,1	43,1 $\pm$ 3,8	45,7 $\pm$ 2,0	52,0 $\pm$ 2,9
Glu	91,0 $\pm$ 4,0	93,2 $\pm$ 5,7	95,0 $\pm$ 5,0	97,9 $\pm$ 11,1	98,5 $\pm$ 1,9	91,3 $\pm$ 4,1	96,1 $\pm$ 7,5	101,0 $\pm$ 4,4	87,3 $\pm$ 5,4	102,3 $\pm$ 3,8	89,7 $\pm$ 4,0	98,0 $\pm$ 3,5	99,5 $\pm$ 8,8	96,0 $\pm$ 9,2	87,4 $\pm$ 4,2
Ser	32,3 $\pm$ 1,9	35,1 $\pm$ 3,4	36,1 $\pm$ 3,0	31,7 $\pm$ 3,1	30,2 $\pm$ 0,6	40,0 $\pm$ 2,7	32,6 $\pm$ 1,5	36,7 $\pm$ 2,1	38,6 $\pm$ 3,9	28,7 $\pm$ 3,9	39,4 $\pm$ 3,5	34,6 $\pm$ 2,3	30,4 $\pm$ 2,8	34,9 $\pm$ 1,6	35,8 $\pm$ 3,0
Thr	23,7 $\pm$ 1,5	26,1 $\pm$ 2,3	26,8 $\pm$ 2,3	23,4 $\pm$ 2,2	22,5 $\pm$ 0,5	30,0 $\pm$ 2,0	23,2 $\pm$ 1,0	27,0 $\pm$ 1,5	28,3 $\pm$ 2,7	21,6 $\pm$ 2,7	29,2 $\pm$ 2,3	26,1 $\pm$ 1,8	22,8 $\pm$ 2,0	25,9 $\pm$ 1,2	27,0 $\pm$ 2,1
Arg	16,4 $\pm$ 1,3	18,2 $\pm$ 2,0	18,3 $\pm$ 1,5	16,2 $\pm$ 1,6	15,1 $\pm$ 0,3	20,9 $\pm$ 1,5	16,7 $\pm$ 0,9	18,5 $\pm$ 1,0	18,9 $\pm$ 2,0	15,0 $\pm$ 2,1	20,2 $\pm$ 1,8	17,2 $\pm$ 1,1	15,8 $\pm$ 1,5	17,8 $\pm$ 0,8	17,9 $\pm$ 1,5
Ala	19,0 $\pm$ 1,5	20,8 $\pm$ 2,2	20,9 $\pm$ 1,9	18,6 $\pm$ 2,1	17,7 $\pm$ 0,4	23,4 $\pm$ 1,8	19,1 $\pm$ 1,0	21,8 $\pm$ 1,4	22,7 $\pm$ 2,5	16,7 $\pm$ 2,6	23,4 $\pm$ 2,2	20,4 $\pm$ 1,5	17,8 $\pm$ 2,0	20,3 $\pm$ 1,0	21,0 $\pm$ 2,0
Tyr	25,1 $\pm$ 1,9	28,0 $\pm$ 2,7	28,8 $\pm$ 2,5	24,6 $\pm$ 2,4	23,2 $\pm$ 0,5	28,7 $\pm$ 2,2	25,0 $\pm$ 1,3	28,2 $\pm$ 1,7	29,3 $\pm$ 3,0	22,7 $\pm$ 3,1	30,5 $\pm$ 2,7	24,1 $\pm$ 1,7	23,6 $\pm$ 2,3	27,5 $\pm$ 1,3	24,7 $\pm$ 2,0
Met	9,4 $\pm$ 0,8	11,7 $\pm$ 1,3	12,5 $\pm$ 1,1	9,8 $\pm$ 1,1	8,1 $\pm$ 0,2	12,7 $\pm$ 1,0	7,2 $\pm$ 0,4	6,1 $\pm$ 0,4	11,1 $\pm$ 1,3	8,8 $\pm$ 1,3	13,0 $\pm$ 1,3	10,9 $\pm$ 0,9	9,8 $\pm$ 0,9	9,5 $\pm$ 0,4	10,5 $\pm$ 1,0
Val	27,6 $\pm$ 1,8	31,6 $\pm$ 2,8	32,5 $\pm$ 2,7	27,0 $\pm$ 2,5	26,4 $\pm$ 0,6	35,4 $\pm$ 2,3	27,9 $\pm$ 1,2	32,3 $\pm$ 1,6	33,9 $\pm$ 3,1	25,6 $\pm$ 3,0	34,2 $\pm$ 2,7	30,6 $\pm$ 1,9	26,7 $\pm$ 2,0	30,9 $\pm$ 1,4	32,0 $\pm$ 2,5
Phe	24,1 $\pm$ 2,0	26,9 $\pm$ 2,7	27,6 $\pm$ 2,4	26,9 $\pm$ 2,4	23,4 $\pm$ 0,5	29,4 $\pm$ 2,2	24,5 $\pm$ 1,2	28,3 $\pm$ 1,6	30,2 $\pm$ 3,1	21,5 $\pm$ 2,7	30,1 $\pm$ 2,6	27,6 $\pm$ 1,8	23,0 $\pm$ 2,2	26,5 $\pm$ 1,4	27,8 $\pm$ 2,5
Ile	21,7 $\pm$ 1,5	25,4 $\pm$ 2,6	26,0 $\pm$ 1,6	21,2 $\pm$ 2,1	21,3 $\pm$ 0,3	27,6 $\pm$ 1,8	22,0 $\pm$ 1,0	26,0 $\pm$ 1,3	26,6 $\pm$ 2,6	20,3 $\pm$ 2,3	27,5 $\pm$ 2,2	24,5 $\pm$ 1,2	20,9 $\pm$ 1,8	24,9 $\pm$ 1,0	25,0 $\pm$ 1,9
Leu	48,3 $\pm$ 3,9	59,3 $\pm$ 6,6	58,8 $\pm$ 4,3	47,1 $\pm$ 4,9	50,7 $\pm$ 1,0	60,8 $\pm$ 4,4	47,8 $\pm$ 2,5	61,4 $\pm$ 3,6	58,3 $\pm$ 5,1	43,1 $\pm$ 6,0	60,3 $\pm$ 3,9	57,0 $\pm$ 3,7	44,9 $\pm$ 4,4	57,6 $\pm$ 1,8	56,7 $\pm$ 3,5
Lys	41,5 $\pm$ 2,8	39,6 $\pm$ 5,8	39,0 $\pm$ 2,9	37,1 $\pm$ 3,8	32,9 $\pm$ 1,1	45,2 $\pm$ 5,9	37,4 $\pm$ 3,0	42,5 $\pm$ 5,9	42,1 $\pm$ 8,2	32,0 $\pm$ 7,8	43,7 $\pm$ 8,5	38,3 $\pm$ 4,3	34,2 $\pm$ 4,5	39,7 $\pm$ 8,1	42,5 $\pm$ 6,8

**Tab. 7-4** Concentrations of amino acids ( $\mu\text{g}/100 \text{ mg}$  yoghurt) of yoghurt samples analysed by RP-HPLC at Day 7 of incubation with 3 U/g Lcc C and different mediators (CA - caffeic acid, VA - vanillic acid, V - vanillin) in comparison to yoghurt samples with mediator and without the addition of enzyme. Values are means  $\pm$  standard deviation.

	Y	Y + Lcc	Y + Lcc + CA	Y + Lcc + VA	Y + Lcc + V	Y + CA	Y + VA	Y + V
Asp	51,5 $\pm$ 3,1	56,9 $\pm$ 4,9	53,7 $\pm$ 2,8	51,2 $\pm$ 5,5	52,0 $\pm$ 3,8	54,7 $\pm$ 3,9	53,3 $\pm$ 4,4	54,5 $\pm$ 4,3
Glu	95,0 $\pm$ 4,0	91,3 $\pm$ 11,1	87,3 $\pm$ 7,5	98,0 $\pm$ 3,8	87,4 $\pm$ 8,8	106,3 $\pm$ 0,9	98,5 $\pm$ 1,7	97,4 $\pm$ 15,0
Ser	36,1 $\pm$ 1,9	40,0 $\pm$ 3,1	38,6 $\pm$ 1,5	34,6 $\pm$ 3,9	35,8 $\pm$ 2,8	37,1 $\pm$ 3,0	36,6 $\pm$ 2,7	38,0 $\pm$ 2,9
His+Gly <sup>a</sup>	10,4	10,4	9,6	10,3	9,3	10,8	9,6	10,4
Thr	26,8 $\pm$ 1,5	30,0 $\pm$ 2,2	28,3 $\pm$ 1,0	26,1 $\pm$ 2,7	27,0 $\pm$ 2,0	27,6 $\pm$ 2,0	27,4 $\pm$ 2,0	28,3 $\pm$ 2,1
Arg	18,3 $\pm$ 1,3	20,9 $\pm$ 1,6	18,9 $\pm$ 0,9	17,2 $\pm$ 2,1	17,9 $\pm$ 1,5	18,5 $\pm$ 1,5	18,3 $\pm$ 1,4	19,2 $\pm$ 1,4
Ala	20,9 $\pm$ 1,5	23,4 $\pm$ 2,1	22,7 $\pm$ 1,0	20,4 $\pm$ 2,6	21,0 $\pm$ 2,0	21,6 $\pm$ 1,8	21,1 $\pm$ 1,6	22,3 $\pm$ 1,8
Tyr	28,8 $\pm$ 1,9	28,7 $\pm$ 2,4	29,3 $\pm$ 1,3	24,1 $\pm$ 3,1	24,7 $\pm$ 2,3	29,5 $\pm$ 2,3	29,2 $\pm$ 2,1	30,3 $\pm$ 2,4
Met	12,5 $\pm$ 0,8	12,7 $\pm$ 1,1	11,1 $\pm$ 0,4	10,9 $\pm$ 1,3	10,5 $\pm$ 0,9	13,2 $\pm$ 1,0	12,6 $\pm$ 0,7	12,2 $\pm$ 0,8
Val	32,5 $\pm$ 1,8	35,4 $\pm$ 2,5	33,9 $\pm$ 1,2	30,6 $\pm$ 3,0	32,0 $\pm$ 2,0	32,8 $\pm$ 2,6	33,0 $\pm$ 2,3	33,1 $\pm$ 2,6
Phe	27,6 $\pm$ 2,0	29,4 $\pm$ 2,4	30,2 $\pm$ 1,2	27,6 $\pm$ 2,7	27,8 $\pm$ 2,2	28,6 $\pm$ 2,7	28,1 $\pm$ 2,0	31,3 $\pm$ 2,2
Ile	26,0 $\pm$ 1,5	27,6 $\pm$ 2,1	26,6 $\pm$ 1,0	24,5 $\pm$ 2,3	25,0 $\pm$ 1,8	25,6 $\pm$ 2,4	25,5 $\pm$ 1,6	25,8 $\pm$ 1,9
Leu	58,8 $\pm$ 3,9	60,8 $\pm$ 4,9	58,3 $\pm$ 2,5	57,0 $\pm$ 6,0	56,7 $\pm$ 4,4	61,5 $\pm$ 6,2	60,5 $\pm$ 4,5	61,5 $\pm$ 4,3
Lys	39,0 $\pm$ 2,8	45,2 $\pm$ 3,8	42,1 $\pm$ 3,0	38,3 $\pm$ 7,8	42,5 $\pm$ 4,5	44,3 $\pm$ 7,5	44,4 $\pm$ 6,3	45,0 $\pm$ 4,1

<sup>a</sup> – co-elution of histidine and glycine; indicated as  $\mu\text{mol}/\text{L}$  per 100 mg yoghurt

**Tab. 7-5** Compounds and cross-links resulting from the oxidation of amino acid side chains (V. K. Sharma, 2012; Stadtman, 2006; Steffensen *et al.*, 2008)

Amino acids	Oxidation products	Known cross-links
Phenylalanine <sup>a</sup>	2-, 3-, and 4-Hydroxyphenylalanine; 2,3-dihydroxyphenylalanine	-
Tryptophan <sup>a</sup>	2-, 4-, 5-, 6-, 7-Hydroxy tryptophan; <i>N</i> -formylkynurenine; 3-OH-kynurenine	-
Histidine <sup>b</sup>	2-Oxohistidine; 4-OH-glutamate	-
Methionine <sup>a</sup>	Methionine sulfoxide; methionine sulfone	-
Cysteine <sup>b</sup>	Cysteine sulfenic acid, cysteine sulfinic acid, cysteine sulfonic acid (cystic acid)	Cys-Cys <sup>c</sup>
Threonine <sup>a</sup>	2-Amino-3-keto-butyric acid	-
Arginine <sup>b</sup>	Glutamic semialdehyde	-
Lysine <sup>a</sup>	<i>N</i> <sub>ε</sub> -(carboxymethyl)lysine, $\alpha$ -amino adipic semialdehyde	-
Tyrosine <sup>b</sup>	3,4-Dihydroxyphenylalanine	Tyr-Tyr <sup>d</sup>
Proline	Glutamylsemialdehyde; 2-pyrrolidone, 4- and 5-OH-proline; pyroglutamic acid	-

<sup>a</sup> essential amino acid, <sup>b</sup> conditionally essential amino acid, <sup>c</sup> Figueroa-Espinoza *et al.* (1998); Labat *et al.* (2000), <sup>d</sup> Mattinen *et al.* (2005); Steffensen *et al.* (2009)

In further MS experiments, alterations of single oxidation-sensitive amino acids, especially of the essential ones, such as lysine, histidine or methionine, were examined (Tab. 7-5). Oxidative modifications were known to be induced by reactive oxygen species and other radical producing prooxidants (Berlett *et al.*, 1997; V. K. Sharma, 2012; Stadtman, 2006). Steffensen *et al.* (2008) reported that laccase-catalysed oxidation of proteins resulted in carbonyl formation on histidine, tryptophan and methionine. Neither these oxidative modifications nor any other laccase-catalysed alteration were observed using mass spectrometry during cross-linking of peptides by Steffensen *et al.* (2009). In agreement with the latter study, no carbonyl formation, such as *N*-formylkynurenine from tryptophan or 2-oxohistidine from histidine, was detected in amino acids incubated with Lcc C. Additionally, none of the above mentioned oxidation products of amino acids (Tab. 7-5) were observed. Furthermore, MS analyses showed homo-cross-links of different amino acids. Disulphide with a mass of 240 Da was detected. The coupling of cysteinyl residues was considered to be a common cross-link formed upon laccase action (Figueroa-Espinoza *et al.*, 1998; Labat *et al.*, 2000). The most common cross-link formed by laccases are dityrosyl bonds with a mass of 360 Da (Mattinen *et al.*, 2005; Steffensen *et al.*, 2008). Dityrosine was observed not only in the samples incubated with Lcc C, but also in the enzyme blank in the absence of any amino acids. Thus, this mass peak was partially derived from the enzyme preparation. Consequently and with regard to the results of the amino acid analyses, just minor amounts of dityrosine were formed upon laccase reaction. This was in agreement with Steffensen *et al.* (2009) who examined the modifications of a *Trametes versicolor* laccase on different tyrosine- or cysteine-containing peptides.



In measurements of dityrosine they found only a small amount of the available tyrosine (< 0.2 %) cross-linked in the absence of ferulic acid as mediator. Additionally, no hetero-cross-links between tyrosine and any other amino acid were observed in the MS experiments.

Steffensen *et al.* (2009) stated that oxidative alterations of amino acid residues during laccase-catalysed cross-linking might occur but are not major oxidation products catalysed by laccases. It was concluded that possible quality impairment forced by unspecific oxidative modifications during cross-linking of food proteins with laccases should be minor. Major results of cross-linking reactions of proteins were the formation of tyrosine and cysteine cross-links, occasional fragmentation next to the site of cross-linking and incorporation of the mediator depending on its concentration.

### 7.3.1.2 Fatty acids

The oxidation of fatty acids in food, especially in yoghurt, must be avoided to guarantee an unaltered aroma profile of the cross-linked yoghurt sample. The laccase-catalysed, radical-initiated cross-linking reaction might trigger the lipid oxidation. During this reaction, oxygen is added to C-C double bonds of unsaturated fatty acids, leading to the formation of hydroperoxides. Carbonyl compounds and alcohols resulted from consecutive reactions that could influence the yoghurt aroma negatively (Belitz *et al.*, 2009; A. Ott *et al.*, 1997; Pokorný, 1990; Simpson *et al.*, 2012).

For the examination of a potential oxidative impact of laccases on the fatty acids of yoghurt, whole milk yoghurt samples were incubated with Lcc C for seven days and with different mediators (Tab. 7-1).

A change in the qualitative composition after incubation with laccase for seven days was not detected (Fig. 7-2). The elution pattern of the fatty acids was comparable for all samples. No new peaks appeared upon cross-linking. This observation was supported by the determination of the quantitative composition of the yoghurt samples (Tab. 7-6). The content of the fatty acids was comparable for all samples. No alteration of the unsaturated fatty acids myristoleic acid (14:1 (Z9)), palmitoleic acid (16:1 (Z9)) and elaidic acid (18:1 (E9)) due to laccase oxidation was observed. Solely slightly reduced values for linoleic acid (18:2 (Z9, Z12)) and oleic acid (18:1 (Z9)) were detected for the samples Y + Lcc and Y + Lcc + VA in comparison to the yoghurt reference Y. It was assumed that the minimal losses of these oxidation-sensitive fatty acids were caused by the laccase-catalysed radical reaction (Srebotnik *et al.*, 2005). The polyunsaturated  $\gamma$ -linolenic acid (18:3 (Z6, Z9, Z12)) was not detected in neither the yoghurt reference nor the cross-linked yoghurt samples.

The sensory evaluation revealed an off-flavour in the cross-linked whole milk yoghurt samples (see 7.3.1.3), which was attributed to lipid oxidation. A comparable off-flavour was not detected in the sensory tests of cross-linked skimmed milk yoghurt samples, although their taste was not convincing.

Milk exhibits a relatively high amount of monounsaturated fatty acids and a low quantity of polyunsaturated fatty acids. Compounds providing C-C double bonds, such as unsaturated fatty acids,

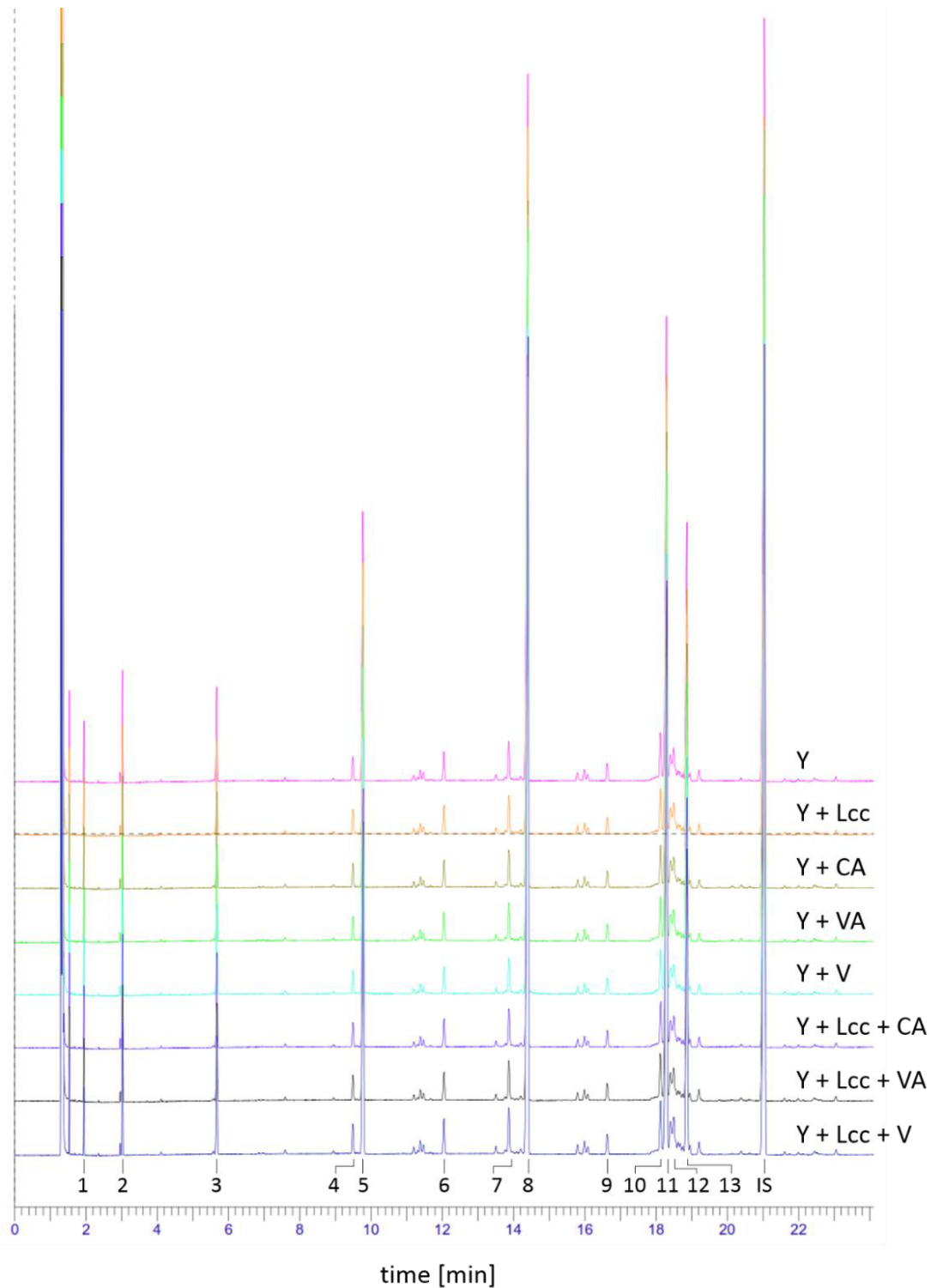
are in general susceptible to attacks by radical oxygen species. Consequently, lipid oxidation is one of the main reasons for the decay of dairy products (Belitz *et al.*, 2009; Simpson *et al.*, 2012). Besides the laccase-initiated radical formation necessary for the cross-linking of milk proteins, copper ions are capable to start the process of lipid oxidation (Simpson *et al.*, 2012; Yin *et al.*, 2011). Copper ions might come from denatured enzymes, such as laccases. As the storage stability of fatty acids is negatively affected by a very low concentration of copper, it cannot be guaranteed at a concentration level between 0.01 to 0.2 ppm, depending on the respective compound (Belitz *et al.*, 2009). The acidic pH value of yoghurt further promotes the oxidation reaction of fatty acids by heavy metal ions. However, the decomposition of the formed hydroperoxides proceeds slower for copper ions than for iron ions (Belitz *et al.*, 2009). At low enzyme dosages and in skimmed milk yoghurt, the oxidation of fatty acids is negligible.

### 7.3.1.3 Tasting of cross-linked yoghurt samples

Besides the analytical investigation of the amino and fatty acids, the cross-linked yoghurt samples were evaluated in sensory tests. The panel comprised ten participants who judged both, taste and texture, of the yoghurt samples. Not only skimmed milk yoghurt was cross-linked and evaluated but also whole milk yoghurt (Tab. 7-2). The latter one was chosen due to the higher fat concentration to prove if laccase-catalysed reactions alter oxidation-sensitive unsaturated fatty acids that lead to negative impacts on the taste impression.

The texture of the skimmed milk yoghurt samples which were cross-linked by Lcc C (Sample 1 and 2) were partially perceived to be firmer than the corresponding reference (Sample 3) while other participants did not observe differences to the yoghurt sample without enzyme. The mediator vanillin was noticeable as vanilla flavouring in all three samples and did not change upon cross-linking. The vanilla aroma was less intense in Sample 2 due to the lower concentration of vanillin (1 mmol/L) applied. None of the participants assessed the three skimmed milk yoghurt samples as delicate. The samples were described to have a slightly sour and cheesy taste although a lipid oxidation was not detected in this sensory evaluation.

The impressions of the texture of the cross-linked whole milk yoghurt samples were comparable to the skimmed milk yoghurt samples. The yoghurt sample with Lcc C (Sample 4) was evaluated to be firmer than the yoghurt sample without the enzyme (Sample 5). However, while the taste of the latter sample was not assessed negatively but described to have a vanilla aroma, the cross-linked sample was inedible. The yoghurt sample incubated with Lcc C tasted fermented and bitter indicating an oxidation of the fatty acids in the yoghurt, especially linoleic acid (Pokorný, 1990).



**Fig. 7-2** Overlay of GC chromatograms: Examination of the influence of 3 U/g Lcc C on fatty acids of different whole milk yoghurt samples (25 °C, 7 d): 1 – caprylic acid, 2 – decanoic acid, 3 – lauric acid, 4 – myristoleic acid, 5 – myristic acid, 6 – pentadecanoic acid, 7 – palmitoleic acid, 8 – palmitic acid, 9 – heptadecanoic acid, 10 – linoleic acid, 11 – oleic acid, 12 – elaidic acid, 13 – stearic acid, IS – internal standard nonadecanoic acid; Y – yoghurt reference, Y + Lcc – yoghurt + 3 U/g Lcc C, Y + CA – yoghurt + 5 mM caffeic acid, Y + VA – yoghurt + 5 mM vanillic acid, Y + V – yoghurt + 5 mM vanillin, Y + Lcc + CA – yoghurt + 3 U/g Lcc C + 5 mM caffeic acid, Y + Lcc + VA – yoghurt + 3 U/g Lcc C + 5 mM vanillic acid, Y + Lcc + V – yoghurt + 3 U/g Lcc C + 5 mM vanillin

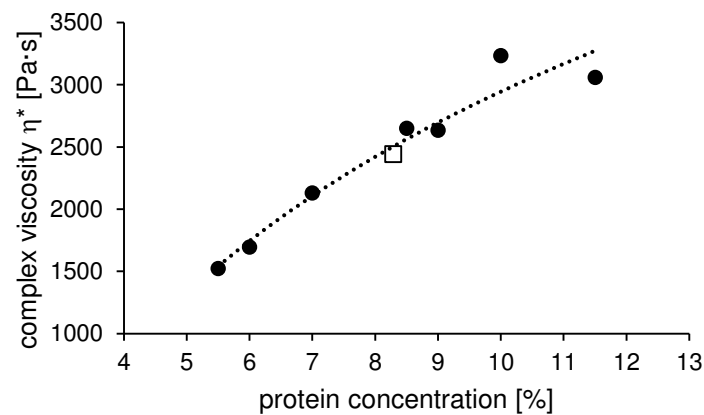
**Tab. 7-6** Relative composition of fatty acids [%] of whole milk yoghurt samples treated with 3 U/g Lcc C and different mediators (CA - caffeic acid, VA - vanillic acid, V - vanillin) for 7 days at 25 °C in comparison to yoghurt samples with mediator and without the addition of enzyme.

Fatty acid	Y	Y + Lcc	Y + CA	Y + VA	Y + V	Y + Lcc + CA	Y + Lcc + VA	Y + Lcc + V
8:0	0,93 ± 0,01	0,89 ± 0,08	0,92 ± 0,01	0,93 ± 0,04	0,92 ± 0,03	0,93 ± 0,02	0,90 ± 0,04	0,94 ± 0,01
10:0	2,47 ± 0,02	2,42 ± 0,12	2,45 ± 0,04	2,45 ± 0,07	2,44 ± 0,05	2,45 ± 0,03	2,41 ± 0,06	2,47 ± 0,02
12:0	3,34 ± 0,01	3,34 ± 0,03	3,32 ± 0,04	3,30 ± 0,05	3,31 ± 0,03	3,31 ± 0,02	3,33 ± 0,04	3,31 ± 0,04
14:1 (Z9)	0,97 ± 0,06	0,99 ± 0,00	1,00 ± 0,01	0,99 ± 0,02	1,00 ± 0,02	1,01 ± 0,01	1,03 ± 0,03	1,00 ± 0,01
14:0	11,68 ± 0,003	11,84 ± 0,08	11,67 ± 0,05	11,59 ± 0,06	11,67 ± 0,07	11,65 ± 0,06	11,85 ± 0,26	11,68 ± 0,10
15:0	1,23 ± 0,02	1,25 ± 0,02	1,25 ± 0,003	1,24 ± 0,002	1,24 ± 0,01	1,24 ± 0,01	1,26 ± 0,02	1,24 ± 0,003
16:1 (Z9)	1,67 ± 0,01	1,66 ± 0,003	1,67 ± 0,01	1,67 ± 0,01	1,68 ± 0,02	1,68 ± 0,01	1,67 ± 0,02	1,66 ± 0,002
16:0	37,42 ± 0,12	37,61 ± 0,23	37,35 ± 0,12	37,26 ± 0,14	37,36 ± 0,14	37,18 ± 0,01	37,30 ± 0,15	37,23 ± 0,03
17:0	0,74 ± 0,01	0,74 ± 0,01	0,75 ± 0,01	0,75 ± 0,02	0,74 ± 0,02	0,75 ± 0,01	0,75 ± 0,002	0,74 ± 0,01
18:2 (Z9, Z12)	2,13 ± 0,04	1,91 ± 0,03	2,04 ± 0,10	2,11 ± 0,02	2,10 ± 0,02	2,12 ± 0,01	2,03 ± 0,01	2,03 ± 0,04
18:1 (Z9)	24,42 ± 0,09	24,14 ± 0,08	24,35 ± 0,06	24,42 ± 0,07	24,41 ± 0,09	24,45 ± 0,01	24,18 ± 0,14	24,26 ± 0,18
18:1 (E9)	1,10 ± 0,03	1,16 ± 0,004	1,16 ± 0,03	1,22 ± 0,04	1,19 ± 0,02	1,20 ± 0,02	1,17 ± 0,02	1,19 ± 0,03
18:0	12,07 ± 0,17	12,05 ± 0,01	12,01 ± 0,06	11,99 ± 0,10	11,93 ± 0,11	11,93 ± 0,03	12,03 ± 0,11	11,95 ± 0,05

This examination elucidated that laccases are not suitable for cross-linking of other than low fat food matrices. A minimal oxidative alteration of the fatty acids affected adversely the taste of the product.

### 7.3.2 Comparison of an enhanced viscosity by the addition of milk protein and by laccase-catalysed cross-linking

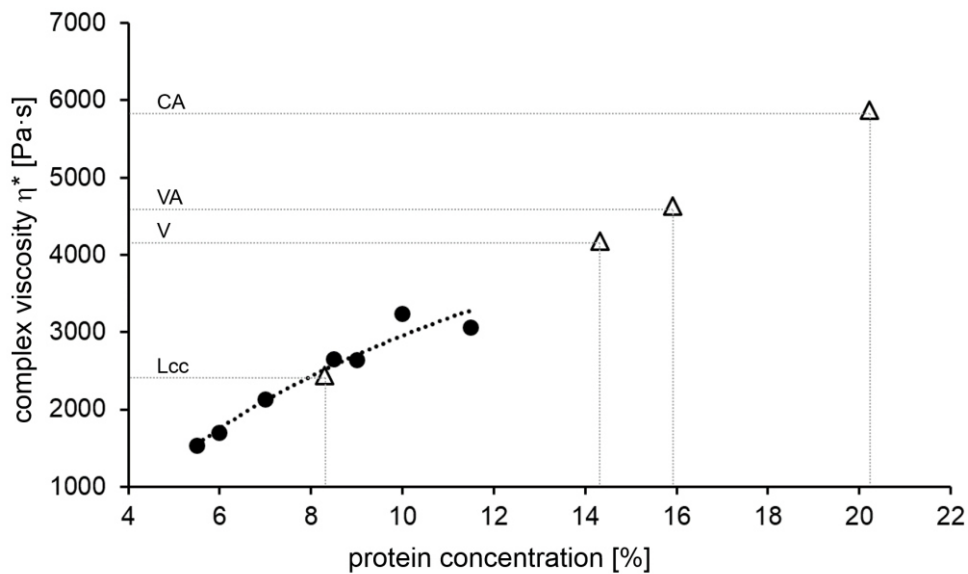
Raising the solid content of yoghurt by the addition of milk protein to enhance viscoelastic properties is a common method of the dairy industry but it is associated with undesired additional costs (Loveday *et al.*, 2013). In order to evaluate the economic relevance of laccase-catalysed cross-linking in skimmed milk yoghurt, the complex viscosity  $\eta^*$  of yoghurt samples with raised protein concentrations were compared to cross-linked yoghurt samples.



**Fig. 7-3** Complex viscosity  $\eta^*$  ( $\omega = 0.1$  rad/s) as a function of (●) the protein concentration (5.5 – 11.5 %) of skimmed milk yoghurt compared to a (□) skimmed milk yoghurt sample (protein concentration 5.5 %) cross-linked with 3 U/g Lcc C

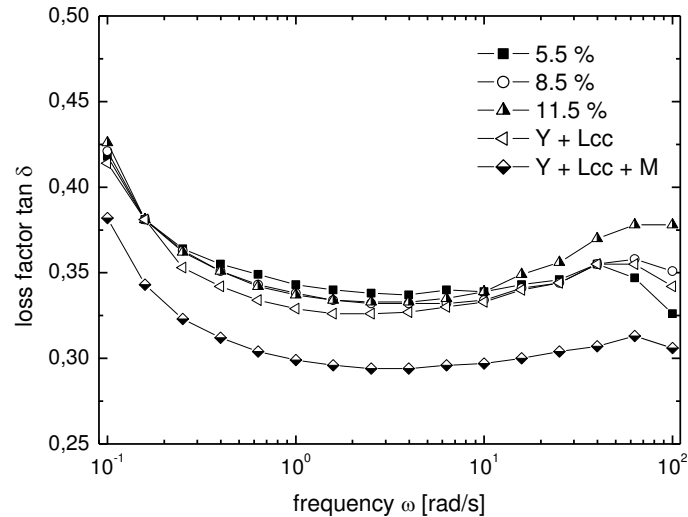
The protein concentration of skimmed milk yoghurt was raised by the addition of skimmed milk powder from 5.5 % of the reference sample up to 11.5 %. This resulted in a doubling of the rheological parameters (Fig. 7-3). The increase of the complex viscosity  $\eta^*$  stagnated from a protein concentration of 10 %. The yoghurt samples with added skimmed milk powder were compared to a yoghurt sample (5.5 % protein) cross-linked with 3 U/g Lcc C. In order to achieve an analogous viscosity  $\eta^*$ , the addition of approximately 3 % of protein was necessary. The laccase-catalysed cross-linking after supplementation of food-grade mediators led to values of viscosity (Fig. 7-4) that were not achieved by raising the protein concentration in yoghurt. The yoghurt sample cross-linked in the presence of vanillin provided nearly the threefold complex viscosity  $\eta^*$  than the reference yoghurt at a protein concentration of 5.5 %. The viscosity  $\eta^*$  of the yoghurt sample treated with 3 U/g Lcc C and 5 mM of caffeic acid was approximately twofold of the viscosity with the highest protein concentration (11.5 %). However, an increased solid content through addition of skimmed milk powder causes undesirable textural

attributes and sensory properties, such as reduced creaminess and increased graininess (Loveday *et al.*, 2013; Pereira *et al.*, 2006; Sandoval-Castilla *et al.*, 2004; Sonne *et al.*, 2014).



**Fig. 7-4** Complex viscosity  $\eta^*$  ( $\omega = 0.1$  rad/s) as a function of (●) the protein concentration (5.5 – 11.5 %) of skimmed milk yoghurt compared to (□) skimmed milk yoghurt samples (protein concentration 5.5 %) cross-linked with 3 U/g Lcc C and different mediators: Lcc – yoghurt + 3 U/g Lcc C; V – yoghurt + 3 U/g Lcc C + 5 mmol/L vanillin, VA – yoghurt + 3 U/g Lcc C + 5 mmol/L vanillic acid, CA – yoghurt + 3 U/g Lcc C + 5 mmol/L caffeic acid

The increased protein concentration did not result in increased elastic parts ( $G'$ ) as demonstrated by the loss factor  $\tan \delta$  (Fig. 7-5). All samples with additional skimmed milk powder revealed a  $\tan \delta$  comparable to the reference sample with a protein concentration of 5.5 % (shown exemplarily for protein concentrations 8.5 % and 11.5 % in Fig. 7-5). Increasing elastic parts and a concomitantly decreasing  $\tan \delta$  were determined for yoghurt samples cross-linked with Lcc C (Y + Lcc) and with Lcc C in presence of the mediator caffeic acid (Y + Lcc + M), respectively. It was assumed that the addition of skimmed milk powder caused a strengthening of the macromolecular protein network by further ionic interactions and hydrogen bonds between water and proteins making up the network. The stagnation of increasing viscoelastic parameters from a certain protein concentration (10-12 %) was explained by exhaustion of potential sites for the mentioned interactions. The enzymatic approach to increase the viscosity of yoghurt is based on the formation of intermolecular covalent bonds between the milk proteins of yoghurt. The exhaustion of the enzymatic cross-linking reaction is also possible by reaction of all available cross-linking sites. Previous studies have shown that it was sufficient to couple just a small amount of the potential cross-linking sites resulting in a firmer gel structure (Lauber *et al.*, 2000; Lorenzen *et al.*, 2002). However, the laccase-catalysed cross-linking of skimmed milk yoghurt led to a firmer network with a more elastic structure compared to the increased solid content.

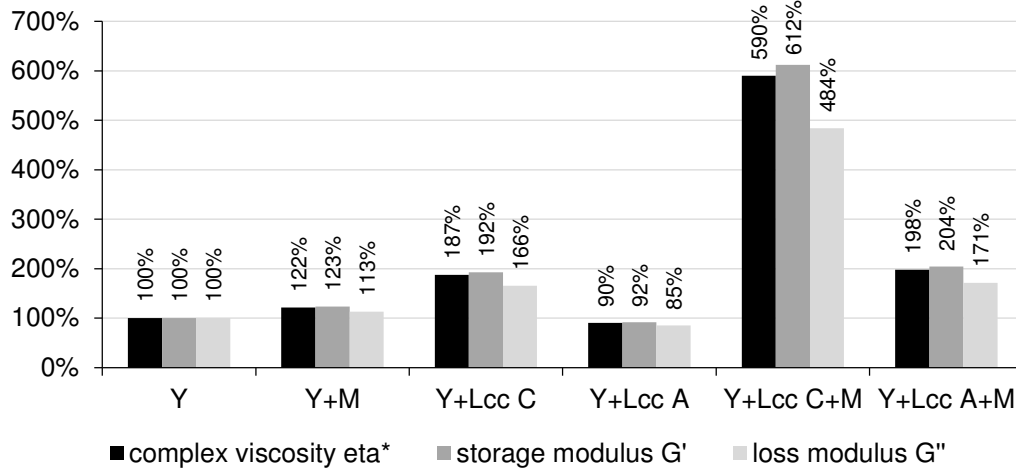


**Fig. 7-5** Loss factor  $\tan \delta$  of skimmed milk yoghurt samples with different protein concentrations (5.5 %, 8.5 %, 11.5 %) in comparison to a yoghurt sample cross-linked with Lcc C: Y + Lcc – yoghurt + 3 U/g Lcc C; Y + Lcc + M – yoghurt + 3 U/g Lcc C + 5 mmol/L caffeic acid

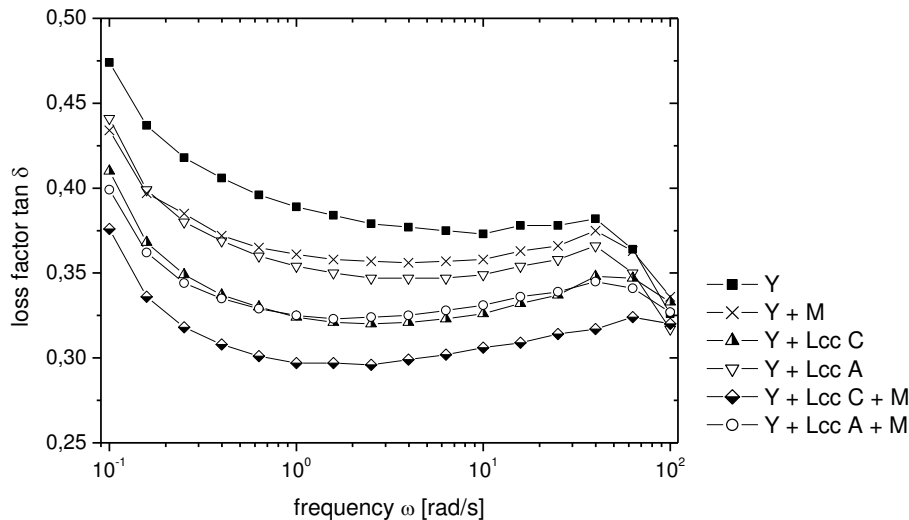
### 7.3.3 Influence of the redox potential of laccases on cross-linking and fragmentation

During cross-linking studies of the laccases which were less inhibited by ions of the milk, some of the examined enzymes led to degradation of casein. Protein fragmentation resulted in weakening of the gel when skimmed milk yoghurt was incubated with a laccase from *Pleurotus eryngii* (Lcc Per; Tab. 5-3, Fig. 7-1) (Struch *et al.*, 2016). Lcc C likewise showed fragmentation of milk proteins to a minor degree after cross-linking of skimmed milk yoghurt (Fig. 3-3), but it did not affect the strength of the gel (Struch *et al.*, 2015). Previous studies described fragmentation when a *Trametes hirsuta* laccase was applied for cross-linking of chicken breast myofibril proteins (Lantto *et al.*, 2005; Lantto *et al.*, 2007a). Most of the laccases causing fragmentation of proteins were classified as high redox potential laccases (Baldrian, 2006; Mate *et al.*, 2015; Morozova *et al.*, 2007a). Hence, the influence of the redox potential on whether cross-linking or fragmenting a protein in a complex food matrix was examined. Simultaneously, the suitability of a middle redox potential laccase (Tab. 1-4) was tested concerning its capability of cross-linking of a skimmed milk yoghurt and preventing degradation of milk proteins.

A laccase from *Agaricus bisporus* (Lcc A) was chosen for cross-linking experiments in skimmed milk yoghurt. Lcc A was sequenced after tryptic digestion and a high similarity was found for the annotated laccase 5 from *Agaricus bisporus* var. *bisporus* H97 (EKV48763.1). This enzyme provides a highly conserved catalytic triade (LRD-X-L). Thus, Lcc A was identified as middle redox potential laccase (Esparan *et al.*, 2015) (Tab. 1-4). Reference yoghurt samples were incubated with Lcc C providing a high redox potential. Caffeic acid was used as redox mediator.



**Fig. 7-6** Complex shear viscosity  $\eta^*$ , storage modulus  $G'$  and loss modulus  $G''$  ( $\omega = 0.1$  rad/s) of skimmed milk yoghurt (related to the yoghurt reference Y) cross-linked with the high redox potential Lcc C and the middle redox potential Lcc A in the presence and absence of the mediator (M) caffeic acid



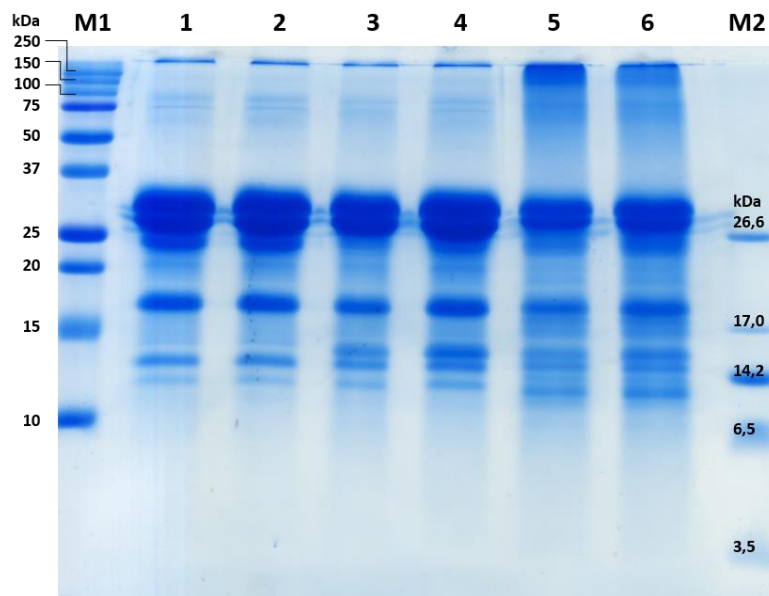
**Fig. 7-7** Loss factor  $\tan \delta$  of different yoghurt samples after incubation for 24 h at 25 °C shows increasing elastic parts of samples with added laccases

From the measurement of the viscoelastic properties (Fig. 7-6) it was concluded that Lcc A was not capable of enhancing the parameters  $G'$ ,  $G''$  and  $\eta^*$  in the absence of the mediator (Y + Lcc A). All three indicators were reduced by 10 % compared to the yoghurt reference (Y). However, Lcc C increased these parameters by at least 70 % which is comparable to an earlier study (Struch *et al.*, 2015). The loss factor  $\tan \delta$  which represents the ratio of the viscous ( $G''$ ) and elastic ( $G'$ ) properties of the yoghurt sample revealed lower values for the yoghurt sample cross-linked with Lcc A (Y + Lcc A) than the reference sample (Y) (Fig. 7-7). Consequently, the elastic parts increased due to incubation of yoghurt with Lcc A, although the viscoelastic parameters did not indicate it. Hence, a laccase-induced degradation of proteins was excluded, because degradation would result in an increase of the viscous



parts ( $G''$ ) and thus in higher values of  $\tan \delta$  compared to the reference without enzyme (Y). The decreased values of  $\tan \delta$  were also found for the yoghurt sample cross-linked with Lcc C (Y + Lcc C). In the presence of the mediator caffeic acid the rheological parameters were enhanced twofold for Lcc A (Y + Lcc A + M) and fivefold for Lcc C (Y + Lcc C + M) in comparison to Y. Likewise, the loss factor  $\tan \delta$  increased significantly and proved the gain of elastic parts due to cross-linking in the presence of a mediator. The extent of the cross-linking using Lcc A in the presence of caffeic acid is comparable to cross-linking with Lcc C without the mediator (Fig. 7-6 and Fig. 7-7).

The SDS-PAGE in Fig. 7-8 showed the alterations of the proteins at the molecular level. The yoghurt samples that were cross-linked with Lcc A and Lcc C without the mediator (Fig. 7-8: lane 3 and 4) were comparable and solely distinguished by the intensity of the casein bands (24-30 kDa).  $\kappa$ -casein (24 kDa) disappeared almost completely when yoghurt was incubated with Lcc C (Y + Lcc C). This effect was less pronounced for the yoghurt sample cross-linked with Lcc A (Y + Lcc A). These changes of the protein pattern supported the results of the rheological measurements (Fig. 7-6 and Fig. 7-7). In the presence of the mediator caffeic acid, the intensity of the casein bands decreased markedly for both laccases (Fig. 7-8: lane 5 and 6). The yoghurt cross-linked with Lcc C (Y + Lcc C + M) revealed a stronger decrease of the casein bands than the yoghurt sample incubated with Lcc A (Y + Lcc A + M). Additionally, protein bands of molecular masses of 150 kDa up to >250 kDa and below 18 kDa appeared for both samples. The protein bands of higher molecular masses than the caseins indicated the formation of oligomers, while the protein bands below 18 kDa were referred to protein fragmentation (Fig. 3-3). The degradation of milk proteins did not seem to provide negative effects with regard to the viscoelastic properties of the cross-linked yoghurt samples.



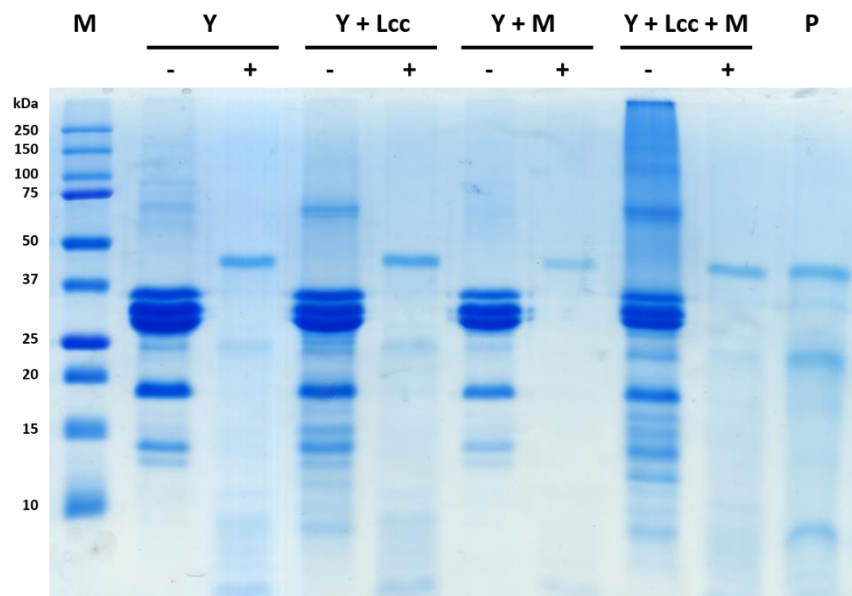
**Fig. 7-8** SDS-PAGE gel of skimmed milk yoghurt samples incubated with Lcc A or Lcc C: M1 – Precision Plus Protein™ Standard (Bio-Rad), 1 – yoghurt reference (Y), 2 – yoghurt + 5 mmol/L caffeic acid (Y + M), 3 – yoghurt + 3 U/g Lcc C (Y + Lcc C), 4 – yoghurt + 3 U/g Lcc A (Y + Lcc A), 5 – yoghurt + 3 U/g Lcc C + 5 mmol/L caffeic acid (Y + Lcc C + M), 6 – yoghurt + 3 U/g Lcc A + 5 mmol/L caffeic acid (Y + Lcc A + M), 7 – Ultra Low Range Molecular Weight Marker (Sigma-Aldrich)

The results of this examination demonstrated the influence of the redox potential concerning the cross-linking of milk proteins in skimmed milk yoghurt. The potential substrate for laccases are tyrosine residues forming cross-links *via* dityrosyl bonds (Mattinen *et al.*, 2005). This amino acid exhibits a redox potential for the abstraction of a single electron of 1220 mV at a pH value of 2 respectively 930 mV at pH 7 (Harriman, 1987). These redox potentials by far exceed the highest redox potential described for laccases of approximately 800 mV (Mot *et al.*, 2012). Nevertheless, the high redox potential Lcc C was able to cross-link proteins in skimmed milk yoghurt in the absence of a mediator to some extent (Struch *et al.*, 2015). Lcc A which was classified as middle redox potential laccase according to structural characteristics was not capable of enhancing the viscoelastic properties of the yoghurt samples before the mediator caffeic acid was applied. The redox potential of Lcc A was insufficient for oxidation of tyrosyl side chains but is sufficient for the electron abstraction of the mediator compound which exhibits a redox potential of 540 mV (Jovanovic *et al.*, 1994) or 377 mV in acetonitrile (González *et al.*, 2009), respectively. This enabled the cross-linking in yoghurt *via* laccase-mediator-system (Mogharabi *et al.*, 2014; Morozova *et al.*, 2007b). Hiller *et al.* (2009) reported of a low redox potential laccase from *Myceliophthera thermophila* which enhanced the viscosity of a solution of milk proteins by enzymatic cross-linking with chlorogenic acid as mediator. This proved that a suitable mediator enables laccase-catalysed cross-linking reaction of proteins even if the redox potential is actually insufficient for the targeted substrate.

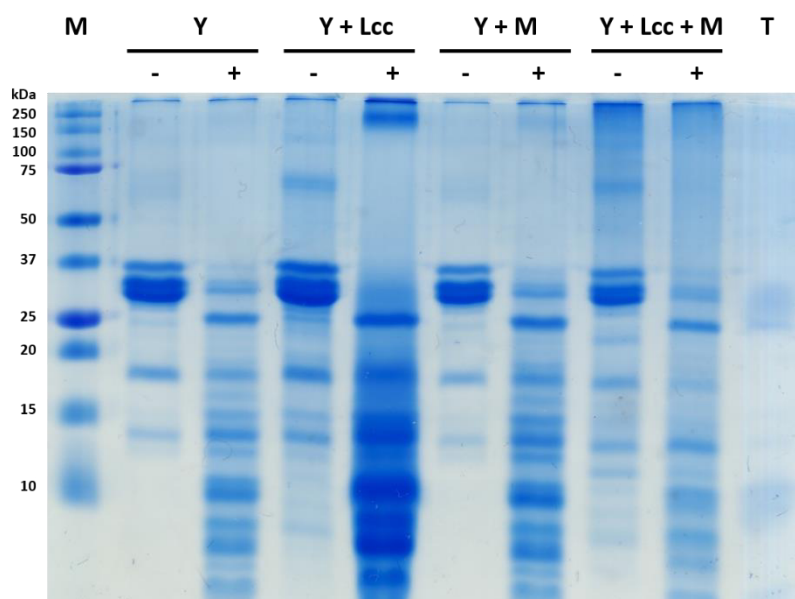
However, a slight protein degradation was observed upon cross-linking with Lcc A (Fig. 7-8). The fragmentation of casein was independent of the redox potential of the applied laccase and thus attributed to the radical mechanism of the laccase-catalysed reaction (Struch *et al.*, 2016). Additionally, the fragmentation was pronounced in the presence of a mediator. This was noticed not only for cross-linking in skimmed milk yoghurt (Fig. 7-8) but also for the laccase-catalysed cross-linking of small tyrosine-containing peptides (data not shown). Steffensen *et al.* (2009) observed fragmentation of a part of the cross-linked angiotensin II antipeptide (EGVYVHPV) catalysed by a *Trametes versicolor* laccase. Four other examined peptides containing tyrosine or cysteine did not show fragmentation during laccase reaction. Hence, it was suggested the fragmentation correlated to amino acids present in the peptide and was favoured due to steric stress of the bulky valine residues adjacent to the tyrosyl side chain in this peptide. It was shown that the fragmentation occurred next to the site of cross-linking. In other cross-linking experiments, no fragmentations of  $\alpha$ -casein,  $\beta$ -lactoglobulin and BSA were observed after incubation with a laccase from *T. versicolor* (Steffensen *et al.*, 2008). Lantto *et al.* (2005) reported of simultaneous cross-linking and fragmentation reactions of chicken-breast myofibril proteins by a *Trametes hirsuta* laccase, but the mechanism of the protein degradation was not further examined. The literature is lacking of a thorough understanding of the laccase-induced fragmentation reactions and how to control them. Consequently, the laccase-catalysed cross-linking of food proteins, especially of milk proteins, remains a challenging task.

### 7.3.4 Simulated digestion

The digestibility of cross-linked protein is a prerequisite for the prediction of effects caused by the laccase-catalysed coupling reaction. The incubation with pepsin under *in vitro* conditions revealed that the yoghurt reference and the cross-linked yoghurt samples were almost completely digested after 60 min (Fig. 7-9). The cross-linked casein formed upon laccase-catalysed reaction was not resistant to the pepsin digestion. The yoghurt reference was not observed to be more susceptible to digestion than the cross-linked yoghurt samples (Y + Lcc, Y + Lcc + M). In contrast to this observation, Stanic *et al.* (2010) showed cross-linked  $\beta$ -casein with a molecular mass of approximately 150 kDa remained unaffected after 15 min of digestion with pepsin in simulated gastric fluid. The digestion test with trypsin revealed no noticeable difference in the digestion of laccase-treated yoghurt samples (Fig. 7-10). However, a small fraction of cross-linked casein with molecular masses above 150 kDa remained undigested after 60 min of incubation. A comparison of the two digests showed that trypsin under basic conditions was not capable to hydrolyse some of the newly formed bonds of the cross-linked caseins. Since these bonds were already cleaved by pepsin under acidic conditions, the cross-linked yoghurt samples might be completely digestible. In accordance to Stanic *et al.* (2010) and Tantoush *et al.* (2011) the samples treated with laccase and mediator were digested more effectively by trypsin compared to the yoghurt cross-linked with laccase. Nothing is known yet about the role of the mediator that would explain this effect. In addition to the latter observation, Stanic *et al.* (2010) and Tantoush *et al.* (2011) reported that laccase-treated monomeric  $\beta$ -casein and  $\beta$ -lactoglobulin were digested most effectively compared to the untreated protein sample. This was not observed in the simulated digestion of the yoghurt samples.



**Fig. 7-9** Digestion with pepsin of different yoghurt samples: M – Precision Plus Protein™ Standard (Bio-Rad), Y – yoghurt reference, Y + Lcc – yoghurt + 3 U/g Lcc C, Y + M – yoghurt + 5 mmol/L CA, Y + Lcc + M – yoghurt + 3 U/g Lcc C + 5 mmol/L CA, P – pepsin control; - control sample without pepsin solution, + digestion with pepsin solution



**Fig. 7-10** Tryptic digestion of different yoghurt samples: M – Precision Plus Protein™ Standard (Bio-Rad), Y – yoghurt reference, Y + Lcc – yoghurt + 3 U/g Lcc C, Y + M – yoghurt + 5 mmol/L CA, Y + Lcc + M – yoghurt + 3 U/g Lcc C + 5 mmol/L CA, T – trypsin control; - control sample without trypsin solution, + digestion with trypsin solution

#### 7.4 Conclusion

The results of different examinations made to assess the suitability of laccases for the application in skimmed milk yoghurt are promising regarding food products rich in proteins. Amino acids remained unaffected by oxidative alterations and the cross-linked proteins were still susceptible to digestion. The experiments revealed also that laccases were not suitable for food comprising high fat concentrations. Laccase-induced oxidation cannot be excluded and even small amounts of oxidised fat led to an impaired quality of the food product. However, the application of laccases for cross-linking in food protein matrices might have economical relevance. The possible involvement of the laccase mediator in the degradation of proteins will have to be evaluated in follow-up experiments.

## 8 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnten die viskoelastischen Parameter von Magermilchjoghurt durch Quervernetzung mit den kommerziellen Enzymen Laccase C und Laccase A in Gegenwart von *food grade*-Mediatoren erhöht werden. Als Resultat eines Screenings unter dem Aspekt der Laccase-Inhibierung wurde eine Laccase aus *Pleurotus eryngii* identifiziert, die jedoch ein sehr enges Aktivitätsoptimum für die Vernetzung im Magermilchjoghurt aufwies.

Die Betrachtung der Ergebnisse bestärkt die Annahme, dass sich Laccasen für die Vernetzung von Lebensmittelmatrices eignen. Aufgrund des radikalischen Reaktionsmechanismus sollten diese jedoch einen niedrigen Fettgehalt aufweisen, da eine Fettoxidation nicht ausgeschlossen werden kann. Die Herstellung von Gelen oder Polymerfilmen aus Proteinen bzw. Polysacchariden oder einer Kombination dieser Biopolymere erscheint ein geeignetes Anwendungsgebiet für Laccasen. Eine Bewertung von analytischen und sensorischen Untersuchungen ist für jede individuelle Laccase unverzichtbar, sobald ansprechende vernetzende Aktivitäten nachgewiesen werden. Verschiedene Laccasen zeigten in den durchgeführten Untersuchungen in unterschiedlichem Grad Abbaureaktionen von Proteinen sowie oxidative Veränderungen von Inhaltsstoffen.

Eine weitere Voraussetzung für den Einsatz von Laccasen im Lebensmittelbereich ist die Verfügbarkeit in *food grade*-Qualität. Während die Produktion von Laccasen aus Basidiomyceten durch Induktion gesteigert werden kann, stellt die Aufreinigung der Enzyme einen limitierenden Prozess dar. Entsprechende Proteinreinigungsmethoden müssen an ein vielversprechendes Enzym angepasst werden. Erst ein günstiges Herstellungsverfahren macht Laccasen gegenüber der mikrobiellen Transglutaminase konkurrenzfähig. Alternativ können Pilzlaccasen heterolog produziert werden. Bisher werden auf diesem Wege aber nur mäßige Aktivitäten erzeugt. Des Weiteren ist die Akzeptanz des Verbrauchers für heterolog produzierte Enzyme ein entscheidender Faktor hinsichtlich der Anwendung im Lebensmittelbereich. Hier wiederum weisen Enzyme aus essbaren Pilzen einen maßgebenden Vorteil auf.

Nicht nur die Quervernetzung von Milchproteinen modifiziert Eigenschaften von fermentierten Milchprodukten, auch die Veränderung von Proteineigenschaften wird in Betracht gezogen. Beispielhaft dafür stehen Enzyme, welche die Ladungsverhältnisse der Micellen verändern oder die Anzahl hydrophober Wechselwirkungen erhöhen und so sensorische Eigenschaften positiv beeinflussen (Cases *et al.*, 2003; Jacobsen *et al.*, 2012; Jacobsen *et al.*, 2014; Miwa *et al.*, 2011).

Diese Beispiele verdeutlichen, welche bedeutende Rolle die Beziehung zwischen Struktur und Funktion für die Entwicklung von Lebensmitteln spielt. Je besser diese Beziehung für ein Lebensmittel verstanden wird, desto eher können sensorische und Textureigenschaften durch den Einsatz von Enzymen verbessert werden.

## 9 Literaturverzeichnis

- Aehle, W. (2007). *Enzymes in Industry: Production and Applications* (Vol. 3). Weinheim: WILEY-VCH.
- Afonso, I. M., & Maia, J. M. (1999). Rheological monitoring of structure evolution and development in stirred yoghurt. *Journal of Food Engineering*, *42*, 183-190.
- Afonso, I. M., & Maia, J. M. (2000). Rheological monitoring of structure development and rebodding of set-style yoghurt. *Applied Rheology*, *10*, 73-79.
- Baldrian, P. (2006). Fungal laccases-occurrence and properties. *FEMS Microbiology Reviews*, *30*, 215-242.
- Belitz, H. D., Grosch, W., & Schieberle, P. (2009). *Food chemistry*. Berlin, Heidelberg: Springer.
- Berger, R. G. (2007). *Flavours and fragrances: Chemistry, bioprocessing and sustainability*. Berlin, Heidelberg: Springer.
- Berlett, B. S., & Stadtman, E. R. (1997). Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *Journal of Biological Chemistry*, *272*, 20313-20316.
- Bertrand, T., Jolival, C., Briozzo, P., Caminade, E., Joly, N., Madzak, C., & Mougin, C. (2002). Crystal structure of a four-copper laccase complexed with an arylamine: Insights into substrate recognition and correlation with kinetics. *Biochemistry*, *41*, 7325-7333.
- Bittner, S. (2006). When quinones meet amino acids: Chemical, physical and biological consequences. *Amino Acids*, *30*, 205-224.
- Bönisch, M. P., Lauber, S., & Kulozik, U. (2004). Effect of ultra-high temperature treatment on the enzymatic cross-linking of micellar casein and sodium caseinate by transglutaminase. *Journal of Food Science*, *69*, E398-E404.
- Bourbonnais, R., & Paice, M. G. (1990). Oxidation of non-phenolic substrates: An expanded role for laccase in lignin biodegradation. *FEBS Letters*, *267*, 99-102.
- Buchert, J., Selinheimo, E., Kruus, K., Mattinen, M. L., Lantto, R., & Autio, K. (2007). Using crosslinking enzymes to improve textural and other properties of food. In *Novel Enzyme Technology for Food Applications* (pp. 101-139).
- Buchert, J., Cura, D. E., Ma, H., Gasparetti, C., Monogioudi, E., Faccio, G., Mattinen, M., Boer, H., Partanen, R., Selinheimo, E., Lantto, R., & Kruus, K. (2010). Crosslinking food proteins for improved functionality. *Annual Review of Food Science and Technology*, *1*, 113-138.
- Camarero, S., Cañas, A. I., Nousiainen, P., Record, E., Lomascolo, A., Martínez, M. J., & Martínez, Á. T. (2008). *p*-Hydroxycinnamic acids as natural mediators for laccase oxidation of recalcitrant compounds. *Environmental Science and Technology*, *42*, 6703-6709.
- Carvajal-Millan, E., Guigliarelli, B., Belle, V., Rouau, X., & Micard, V. (2005). Storage stability of laccase induced arabinoxylan gels. *Carbohydrate Polymers*, *59*, 181-188.
- Cases, E., Vidal, V., & Cuq, J. L. (2003). Effect of K-Casein Deglycosylation on the Acid Coagulability of Milk. *Journal of Food Science*, *68*, 2406-2410.
- Chen, B., Li, H., Ding, Y., & Suo, H. (2012). Formation and microstructural characterization of whey protein isolate/beet pectin coacervations by laccase catalyzed cross-linking. *LWT - Food Science and Technology*, *47*, 31-38.
- Chouchouli, V., Kalogeropoulos, N., Konteles, S. J., Karvela, E., Makris, D. P., & Karathanos, V. T. (2013). Fortification of yoghurts with grape (*Vitis vinifera*) seed extracts. *LWT - Food Science and Technology*, *53*, 522-529.
- Ciron, C. I. E., Gee, V. L., Kelly, A. L., & Auty, M. A. E. (2012). Modifying the microstructure of low-fat yoghurt by microfluidisation of milk at different pressures to enhance rheological and sensory properties. *Food Chemistry*, *130*, 510-519.
- Claus, H. (2003). Laccases and their occurrence in prokaryotes. *Archives of Microbiology*, *179*, 145-150.
- Claus, H. (2004). Laccases: structure, reactions, distribution. *Micron*, *35*, 93-96.
- Dalgleish, D. G. (2011). On the structural models of bovine casein micelles - Review and possible improvements. *Soft Matter*, *7*, 2265-2272.

- De Jong, G. A. H., Wijngaards, G., & Koppelman, S. J. (2003). Transglutaminase inhibitor from milk. *Journal of Food Science*, *68*, 820-825.
- de Kruif, C. G., Huppertz, T., Urban, V. S., & Petukhov, A. V. (2012). Casein micelles and their internal structure. *Advances in Colloid and Interface Science*, *171-172*, 36-52.
- De Lorenzi, L., Pricl, S., & Torriano, G. (1995). Rheological behaviour of low-fat and full-fat stirred yoghurt. *International Dairy Journal*, *5*, 661-671.
- Di Pierro, P., Mariniello, L., Sorrentino, A., Giosafatto, C. V. L., Chianese, L., & Porta, R. (2010). Transglutaminase-induced chemical and rheological properties of cheese. *Food Biotechnology*, *24*, 107-120.
- Dickinson, E. (1997). Enzymic crosslinking as a tool for food colloid rheology control and interfacial stabilization. *Trends in Food Science and Technology*, *8*, 334-339.
- Dickinson, E. (2012). Emulsion gels: The structuring of soft solids with protein-stabilized oil droplets. *Food Hydrocolloids*, *28*, 224-241.
- Dörfelt, H., & Ruske, E. (2014). *Morphologie der Großpilze*. Berlin: Springer Spektrum.
- Dwivedi, U. N., Singh, P., Pandey, V. P., & Kumar, A. (2011). Structure–function relationship among bacterial, fungal and plant laccases. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, *68*, 117-128.
- Enaud, E., Trovaslet, M., Naveau, F., Decristoforo, A., Bizet, S., Vanhulle, S., & Jolival, C. (2011). Laccase chloride inhibition reduction by an anthraquinonic substrate. *Enzyme and Microbial Technology*, *49*, 517-525.
- Enguita, F. J., Martins, L. O., Henriques, A. O., & Carrondo, M. A. (2003). Crystal structure of a bacterial endospore coat component: A laccase with enhanced thermostability properties. *Journal of Biological Chemistry*, *278*, 19416-19425.
- Ercili Cura, D., Lantto, R., Lille, M., Andberg, M., Kruus, K., & Buchert, J. (2009). Laccase-aided protein modification: Effects on the structural properties of acidified sodium caseinate gels. *International Dairy Journal*, *19*, 737-745.
- Erjavec, J., Kos, J., Ravnikar, M., Dreo, T., & Sabotič, J. (2012). Proteins of higher fungi - from forest to application. *Trends in Biotechnology*, *30*, 259-273.
- Espanan, V., Krings, U., Struch, M., & Berger, R. G. (2015). A three-enzyme-system to degrade curcumin to natural vanillin. *Molecules*, *20*, 6640-6653.
- Færgemand, M., & Qvist, K. B. (1997). Transglutaminase: Effect on rheological properties, microstructure and permeability of set style acid skim milk gel. *Food Hydrocolloids*, *11*, 287-292.
- Færgemand, M., Otte, J., & Qvist, K. B. (1998). Cross-Linking of Whey Proteins by Enzymatic Oxidation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *46*, 1326-1333.
- Færgemand, M., Murray, B. S., Dickinson, E., & Qvist, K. B. (1999a). Cross-linking of adsorbed casein films with transglutaminase. *International Dairy Journal*, *9*, 343-346.
- Færgemand, M., Sørensen, M. V., Jørgensen, U., Budolfson, G., & Qvist, K. B. (1999b). Transglutaminase: Effect on instrumental and sensory texture of set style yoghurt. *Milchwissenschaft*, *54*, 563-566.
- Fangary, Y. S., Barigou, M., & Seville, J. P. K. (1999). Simulation of yoghurt flow and prediction of its end-of-process properties using rheological measurements. *Food and Bioproducts Processing: Transactions of the Institution of Chemical Engineers, Part C*, *77*, 33-39.
- Figueroa-Espinoza, M. C., Morel, M. H., & Rouau, X. (1998). Effect of Lysine, Tyrosine, Cysteine, and Glutathione on the Oxidative Cross-Linking of Feruloylated Arabinoxylans by a Fungal Laccase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *46*, 2583-2589.
- Figura, L. O., & Teixeira, A. A. (2007). *Food physics: Physical properties - Measurement and applications*. Berlin: Springer.
- Flanagan, J., & Singh, H. (2006). Conjugation of sodium caseinate and gum arabic catalyzed by transglutaminase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *54*, 7305-7310.
- Frank, O., Blumberg, S., Kunert, C., Zehentbauer, G., & Hofmann, T. (2007). Structure determination and sensory analysis of bitter-tasting 4-vinylcatechol oligomers and their identification in roasted coffee by means of LC-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *55*, 1945-1954.
- Frøst, M. B., & Janhøj, T. (2007). Understanding creaminess. *International Dairy Journal*, *17*, 1298-1311.
- Fuchs, G., & Schlegel, H.-G. (2014). *Allgemeine Mikrobiologie* (9 ed.). Stuttgart: Thieme.

- Gardner, H. W. (1979). Lipid hydroperoxide reactivity with proteins and amino acids: a review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *27*, 220-229.
- Gauche, C., Tomazi, T., Barreto, P. L. M., Ogliari, P. J., & Bordignon-Luiz, M. T. (2009). Physical properties of yoghurt manufactured with milk whey and transglutaminase. *LWT - Food Science and Technology*, *42*, 239-243.
- Gerrard, J. A. (2002). Protein-protein crosslinking in food: Methods, consequences, applications. *Trends in Food Science & Technology*, *13*, 389-397.
- Gerrard, J. A., Brown, P. K., & Fayle, S. E. (2003a). Maillard crosslinking of food proteins III: The effects of glutaraldehyde, formaldehyde and glyceraldehyde upon bread and croissants. *Food Chemistry*, *80*, 45-50.
- Gerrard, J. A., Brown, P. K., & Fayle, S. E. (2003b). Maillard crosslinking of food proteins II: The reactions of glutaraldehyde, formaldehyde and glyceraldehyde with wheat proteins in vitro and in situ. *Food Chemistry*, *80*, 35-43.
- Giardina, P., Faraco, V., Pezzella, C., Piscitelli, A., Vanhulle, S., & Sannia, G. (2010). Laccases: a never-ending story. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *67*, 369-385.
- 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*, 8641-8649.
- González, M. D., Vidal, T., & Tzanov, T. (2009). Electrochemical study of phenolic compounds as enhancers in laccase-catalyzed oxidative reactions. *Electroanalysis*, *21*, 2249-2257.
- Grunwald, P. (2015). *Industrial Biocatalysis* (Vol. 1). Singapore: Pan Stanford Publishing.
- Guggisberg, D., Cuthbert-Steven, J., Piccinalli, P., Bütikofer, U., & Eberhard, P. (2009). Rheological, microstructural and sensory characterization of low-fat and whole milk set yoghurt as influenced by inulin addition. *International Dairy Journal*, *19*, 107-115.
- Guzmán-González, M., Morais, F., Ramos, M., & Amigo, L. (1999). Influence of skimmed milk concentrate replacement by dry dairy products in a low fat set-type yoghurt model system. I: Use of whey protein concentrates, milk protein concentrates and skimmed milk powder. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *79*, 1117-1122.
- Guzmán-González, M., Morais, F., & Amigo, L. (2000). Influence of skimmed milk concentrate replacement by dry dairy products in a low-fat set-type yoghurt model system. Use of caseinates, co-precipitate and blended dairy powders. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *80*, 433-438.
- Haase-Aschoff, P., Linke, D., & Berger, R. G. (2013). Detection of feruloyl- and cinnamoyl esterases from basidiomycetes in the presence of interfering laccase. *Bioresource Technology*, *130*, 231-238.
- Harriman, A. (1987). Further comments on the redox potentials of tryptophan and tyrosine. *The Journal of Physical Chemistry*, *91*, 6102-6104.
- Heck, T., Faccio, G., Richter, M., & Thöny-Meyer, L. (2013). Enzyme-catalyzed protein crosslinking. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *97*, 461-475.
- Hellwig, M., & Henle, T. (2014). Baking, Ageing, Diabetes: A Short History of the Maillard Reaction. *Angewandte Chemie International Edition*, *53*, 10316-10329.
- Hershko, A., & Ciechanover, A. (1998). The ubiquitin system. *Annual Review of Biochemistry*, *67*, 425-479.
- Hibbett, D. S., Binder, M., Bischoff, J. F., Blackwell, M., Cannon, P. F., Eriksson, O. E., Huhndorf, S., James, T., Kirk, P. M., Lücking, R., Thorsten Lumbsch, H., Lutzoni, F., Matheny, P. B., McLaughlin, D. J., Powell, M. J., Redhead, S., Schoch, C. L., Spatafora, J. W., Stalpers, J. A., Vilgalys, R., Aime, M. C., Aptroot, A., Bauer, R., Begerow, D., Benny, G. L., Castlebury, L. A., Crous, P. W., Dai, Y. C., Gams, W., Geiser, D. M., Griffith, G. W., Gueidan, C., Hawksworth, D. L., Hestmark, G., Hosaka, K., Humber, R. A., Hyde, K. D., Ironside, J. E., Koljalg, U., Kurtzman, C. P., Larsson, K. H., Lichtwardt, R., Longcore, J., Miadlikowska, J., Miller, A., Moncalvo, J. M., Mozley-Standridge, S., Oberwinkler, F., Parmasto, E., Reeb, V., Rogers, J. D., Roux, C., Ryvarden, L., Sampaio, J. P., Schüßler, A., Sugiyama, J., Thorn, R. G., Tibell, L., Untereiner, W. A., Walker, C., Wang, Z., Weir, A., Weiss, M., White, M. M., Winka, K., Yao, Y. J., & Zhang, N. (2007). A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycological Research*, *111*, 509-547.



- Hiller, B., & Lorenzen, P. C. (2008). Surface hydrophobicity of physicochemically and enzymatically treated milk proteins in relation to techno-functional properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *56*, 461-468.
- Hiller, B., & Lorenzen, P. C. (2009). Functional properties of milk proteins as affected by enzymatic oligomerisation. *Food Research International*, *42*, 899-908.
- Hiller, B., & Lorenzen, P. C. (2011). Properties of set-style skim milk yoghurt as affected by an enzymatic or Maillard reaction induced milk protein oligomerisation. *LWT - Food Science and Technology*, *44*, 811-819.
- Holt, C. (1992). Structure and stability of bovine casein micelles. *Advances in Protein Chemistry*, *43*, 63-153.
- Holt, C., Carver, J. A., Ecroyd, H., & Thorn, D. C. (2013). Invited review: Caseins and the casein micelle: Their biological functions, structures, and behavior in foods. *Journal of Dairy Science*, *96*, 6127-6146.
- Horne, D. S. (1998). Casein interactions: Casting light on the black boxes, the structure in dairy products. *International Dairy Journal*, *8*, 171-177.
- Horne, D. S. (2006). Casein micelle structure: Models and muddles. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, *11*, 148-153.
- Hu, X., Wang, C., Wang, L., Zhang, R., & Chen, H. (2014). Influence of temperature, pH and metal ions on guaiacol oxidation of purified laccase from *Leptographium qinlingensis*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *30*, 1285-1290.
- Iličić, M. D., Milanović, S. D., Carić, M. D., Dokić, L. P., & Kanurić, K. G. (2014). Effect of Transglutaminase on Texture and Flow Properties of Stirred Probiotic Yoghurt during Storage. *Journal of Texture Studies*, *45*, 13-19.
- Iversen, S. L., & Jorgensen, M. H. (1995). Azocasein assay for alkaline protease in complex fermentation broth. *Biotechnology Techniques*, *9*, 573-576.
- Jacobsen, J., Wind, S. L., & Qvist, K. B. (2012). Use of glycosidase in preparation of a milk product. In (pp. 41pp.): Chr. Hansen A/S, Den. .
- Jacobsen, J., Wind, S. L., Rasholt, E. L., & van den Brink, J. M. (2014). N-Glycosidase F improves gel firmness in fermented milk products. *International Dairy Journal*.
- Jaros, D., Partschefeld, C., Henle, T., & Rohm, H. (2006). Transglutaminase in dairy products: Chemistry, physics, applications. *Journal of Texture Studies*, *37*, 113-155.
- Jaros, D., Jacob, M., Otto, C., & Rohm, H. (2010). Excessive cross-linking of caseins by microbial transglutaminase and its impact on physical properties of acidified milk gels. *International Dairy Journal*, *20*, 321-327.
- Jones, S. M., & Solomon, E. I. (2015). Electron transfer and reaction mechanism of laccases. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *72*, 869-883.
- Jovanovic, S. V., Steenken, S., Tosic, M., Marjanovic, B., & Simic, M. G. (1994). Flavonoids as antioxidants. *Journal of the American Chemical Society*, *116*, 4846-4851.
- Jung, J., & Wicker, L. (2014).  $\beta$ -Lactoglobulin conformation and mixed sugar beet pectin gel matrix is changed by laccase. *LWT - Food Science and Technology*, *55*, 9-15.
- Jus, S., Stachel, I., Fairhead, M., Meyer, M., Thöny-meyer, L., & Guebitz, G. M. (2012). Enzymatic cross-linking of gelatine with laccase and tyrosinase. *Biocatalysis and Biotransformation*, *30*, 86-95.
- Kandarakis, S. A., Piperi, C., Topouzis, F., & Papavassiliou, A. G. (2014). Emerging role of advanced glycation-end products (AGEs) in the pathobiology of eye diseases. *Progress in Retinal and Eye Research*, *42*, 85-102.
- Kavanagh, K. (2011). *Fungi: Biology and Applications* (Vol. 2). Hoboken: Wiley-Blackwell.
- Khan, A. R., & James, M. N. G. (1998). Molecular mechanisms for the conversion of zymogens to active proteolytic enzymes. *Protein Science*, *7*, 815-836.
- Kirk, P. M. (2008). *Ainsworth & Bisby's dictionary of the fungi* (10 ed.). Wallingford: CABI.
- Knudsen, J. C., & Skibsted, L. H. (2010). High pressure effects on the structure of casein micelles in milk as studied by cryo-transmission electron microscopy. *Food Chemistry*, *119*, 202-208.
- Könst, P., Kara, S., Kochius, S., Holtmann, D., Arends, I. W. C. E., Ludwig, R., & Hollmann, F. (2013). Expanding the scope of laccase-mediator systems. *ChemCatChem*, *5*, 3027-3032.
- Krzeminski, A., Großhable, K., & Hinrichs, J. (2011). Structural properties of stirred yoghurt as influenced by whey proteins. *LWT - Food Science and Technology*, *44*, 2134-2140.

- Krzeminski, A., Prell, K. A., Busch-Stockfisch, M., Weiss, J., & Hinrichs, J. (2014). Whey protein-pectin complexes as new texturising elements in fat-reduced yoghurt systems. *International Dairy Journal*, *36*, 118-127.
- Kunamneni, A., Camarero, S., García-Burgos, C., Plou, F. J., Ballesteros, A., & Alcalde, M. (2008). Engineering and Applications of fungal laccases for organic synthesis. *Microbial Cell Factories*, *7*.
- Labat, E., Morel, M. H., & Rouau, X. (2000). Effects of laccase and ferulic acid on wheat flour doughs. *Cereal Chemistry*, *77*, 823-828.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, *227*, 680-685.
- Lantto, R., Puolanne, E., Kalkkinen, N., Buchert, J., & Autio, K. (2005). Enzyme-aided modification of chicken-breast myofibril proteins: Effect of laccase and transglutaminase on gelation and thermal stability. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *53*, 9231-9237.
- Lantto, R., Puolanne, E., Katina, K., Niemistö, M., Buchert, J., & Autio, K. (2007a). Effect of laccase and transglutaminase on the textural and water-binding properties of cooked chicken breast meat gels. *European Food Research and Technology*, *225*, 75-83.
- Lantto, R., Puolanne, E., Kruus, K., Buchert, J., & Autio, K. (2007b). Tyrosinase-Aided Protein Cross-Linking: Effects on Gel Formation of Chicken Breast Myofibrils and Texture and Water-Holding of Chicken Breast Meat Homogenate Gels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *55*, 1248-1255.
- Lauber, S., Henle, T., & Klostermeyer, H. (2000). Relationship between the crosslinking of caseins by transglutaminase and the gel strength of yoghurt. *European Food Research and Technology*, *210*, 305-309.
- Leonhardt, R. H., Plagemann, I., Linke, D., Zelena, K., & Berger, R. G. (2013). Orthologous lipoxygenases of *Pleurotus* spp. - A comparison of substrate specificity and sequence homology. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, *97*, 189-195.
- Li, H., Webb, S. P., Ivanic, J., & Jensen, J. H. (2004). Determinants of the Relative Reduction Potentials of Type-1 Copper Sites in Proteins. *Journal of the American Chemical Society*, *126*, 8010-8019.
- Lindequist, U., Niedermeyer, T. H. J., & Jülich, W.-D. (2005). The Pharmacological Potential of Mushrooms. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, *2*, 285-299.
- Linke, D., Bouws, H., Peters, T., Nimtz, M., Berger, R. G., & Zorn, H. (2005). Laccases of *Pleurotus sapidus*: Characterization and Cloning. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *53*, 9498-9505.
- Lorenzen, P., Schlimme, E., & Roos, N. (1998). Crosslinking of sodium caseinate by a microbial transglutaminase. *Die Nahrung*, *42*, 151-154.
- Lorenzen, P., Neve, H., Mautner, A., & Schlimme, E. (2002). Effect of enzymatic cross-linking of milk proteins on functional properties of set-style yoghurt. *International Journal of Dairy Technology*, *55*, 152-157.
- Lorenzo, M., Moldes, D., Rodríguez Couto, S., & Sanromán, M. A. (2005). Inhibition of laccase activity from *Trametes versicolor* by heavy metals and organic compounds. *Chemosphere*, *60*, 1124-1128.
- Lösche, K. (2000). *Enzyme in der Lebensmitteltechnologie* (Vol. 1). Hamburg: Behr.
- Loveday, S. M., Sarkar, A., & Singh, H. (2013). Innovative yoghurts: Novel processing technologies for improving acid milk gel texture. *Trends in Food Science & Technology*, *33*, 5-20.
- Lucero, H. A., & Kagan, H. M. (2006). Lysyl oxidase: an oxidative enzyme and effector of cell function. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, *63*, 2304-2316.
- Lucey, J. A., & Singh, H. (1997). Formation and physical properties of acid milk gels: A review. *Food Research International*, *30*, 529-542.
- Lucey, J. A. (2002). Formation and physical properties of milk protein gels. *Journal of Dairy Science*, *85*, 281-294.
- Lucey, J. A. (2008). Milk Protein Gels. In *Milk Proteins* (pp. 449-481).
- Marafon, A. P., Sumi, A., Alcântara, M. R., Tamime, A. Y., & Nogueira de Oliveira, M. (2011). Optimization of the rheological properties of probiotic yoghurts supplemented with milk proteins. *LWT - Food Science and Technology*, *44*, 511-519.

- Marchin, S., Putaux, J. L., Pignon, F., & Léonil, J. (2007). Effects of the environmental factors on the casein micelle structure studied by cryo transmission electron microscopy and small-angle x-ray scattering/ultras-small-angle x-ray scattering. *Journal of Chemical Physics*, 126.
- Martinaud, A., Mercier, Y., Marinova, P., Tassy, C., Gatellier, P., & Renerre, M. (1997). Comparison of Oxidative Processes on Myofibrillar Proteins from Beef during Maturation and by Different Model Oxidation Systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 2481-2487.
- Mate, D. M., & Alcalde, M. (2015). Laccase engineering: From rational design to directed evolution. *Biotechnology Advances*, 33, 25-40.
- Matheis, G., & Whitaker, J. R. (1984). Modification of proteins by polyphenol oxidase and peroxidase and their products. *Journal of Food Biochemistry*, 8, 137-162.
- Matheis, G., Sen, L. C., Clifford, A. J., & Whitaker, J. R. (1985). Attachment of N-acetyl-L-methionine into whole soybeans and the nutritional consequences for the rat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 33, 39-44.
- Matheis, G., & Whitaker, J. R. (1987). A review: Enzymatic cross-linking of proteins applicable to foods. *Journal of Food Biochemistry*, 11, 309-327.
- Matissek, R., Steiner, G., & Fischer, M. (2014). *Lebensmittelanalytik* (5 ed.). Heidelberg, Berlin: Springer Spektrum.
- Mattinen, M. L., Kruus, K., Buchert, J., Nielsen, J. H., Andersen, H. J., & Steffensen, C. L. (2005). Laccase-catalyzed polymerization of tyrosine-containing peptides. *FEBS Journal*, 272, 3640-3650.
- Mattinen, M. L., Hellman, M., Permi, P., Autio, K., Kalkkinen, N., & Buchert, J. (2006). Effect of protein structure on laccase-catalyzed protein oligomerization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 8883-8890.
- Mattinen, M. L., Lantto, R., Selinheimo, E., Kruus, K., & Buchert, J. (2008). Oxidation of peptides and proteins by *Trichoderma reesei* and *Agaricus bisporus* tyrosinases. *Journal of Biotechnology*, 133, 395-402.
- Mezger, T. G. (2012). *Das Rheologie-Handbuch: für Anwender von Rotations- und Oszillations-Rheometern*. Hannover: Vincentz Network.
- Michon, T., Chenu, M., Kellershon, N., Desmadril, M., & Guéguen, J. (1997). Horseradish peroxidase oxidation of tyrosine-containing peptides and their subsequent polymerization: A kinetic study. *Biochemistry*, 36, 8504-8513.
- Miwa, N., & Ohashi, W. (2011). Low-fat or fat-free yoghurt, and process for production thereof. In (pp. 29pp.): Ajinomoto Co., Inc., Japan; Amano Enzyme Inc. .
- Mogharabi, M., & Faramarzi, M. A. (2014). Laccase and laccase-mediated systems in the synthesis of organic compounds. *Advanced Synthesis and Catalysis*, 356, 897-927.
- Monnier, V. M., Sell, D. R., Nagaraj, R. H., Miyata, S., Grandhee, S., Odetti, P., & Ibrahim, S. A. (1992). Maillard reaction-mediated molecular damage to extracellular matrix and other tissue proteins in diabetes, aging, and uremia. *Diabetes*, 41, 36-41.
- Morozova, O. V., Shumakovich, G. P., Gorbacheva, M. A., Shleev, S. V., & Yaropolov, A. I. (2007a). "Blue" laccases. *Biochemistry (Moscow)*, 72, 1136-1150.
- Morozova, O. V., Shumakovich, G. P., Shleev, S. V., & Yaropolov, Y. I. (2007b). Laccase-mediator systems and their applications: A review. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 43, 523-535.
- Mot, A. C., & Silaghi-Dumitrescu, R. (2012). Laccases: Complex architectures for one-electron oxidations. *Biochemistry (Moscow)*, 77, 1395-1407.
- Motoki, M., & Seguro, K. (1998). Transglutaminase and its use for food processing. *Trends in Food Science and Technology*, 9, 204-210.
- Müller, E., & Loeffler, W. (1992). *Mykologie: Grundriß für Naturwissenschaftler und Mediziner* (5 ed.). Stuttgart: Thieme.
- Murugesan, K., Kim, Y.-M., Jeon, J.-R., & Chang, Y.-S. (2009). Effect of metal ions on reactive dye decolorization by laccase from *Ganoderma lucidum*. *Journal of Hazardous Materials*, 168, 523-529.
- Nagai, M., Sato, T., Watanabe, H., Saito, K., Kawata, M., & Enei, H. (2003). Purification and characterization of an extracellular laccase from the edible mushroom *Lentinula edodes*, and decolorization of chemically different dyes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 60, 327-335.

- Nieter, A., Haase-Aschoff, P., Linke, D., Nimtz, M., & Berger, R. G. (2014). A halotolerant type A feruloyl esterase from *Pleurotus eryngii*. *Fungal Biology*, *118*, 348-357.
- Nitheranont, T., Watanabe, A., & Asada, Y. (2011). Extracellular laccase produced by an edible basidiomycetous mushroom, *Grifola frondosa*: Purification and characterization. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, *75*, 538-543.
- Nöbel, S., Hahn, C., Hitzmann, B., & Hinrichs, J. (2014). Rheological properties of microgel suspensions: Viscoelastic modelling of microstructural elements from casein micelles to fermented dairy products. *International Dairy Journal*, *39*, 157-166.
- O'Sullivan, M. M., Kelly, A. L., & Fox, P. F. (2002). Effect of transglutaminase on the heat stability of milk: A possible mechanism. *Journal of Dairy Science*, *85*, 1-7.
- Olempska-Beer, Z. S., Merker, R. I., Ditto, M. D., & DiNovi, M. J. (2006). Food-processing enzymes from recombinant microorganisms—a review. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, *45*, 144-158.
- Omarini, A. B., Plagemann, I., Schimanski, S., Krings, U., & Berger, R. G. (2014). Crosses between monokaryons of *Pleurotus sapidus* or *Pleurotus florida* show an improved biotransformation of (+)-valencene to (+)-nootkatone. *Bioresource Technology*, *171*, 113-119.
- Osma, J. F., Toca-Herrera, J. L., & Rodríguez-Couto, S. (2010). Uses of Laccases in the Food Industry. *Enzyme Research*, *2010*, 8.
- Ott, A., Fay, L. B., & Chaintreau, A. (1997). Determination and Origin of the Aroma Impact Compounds of Yogurt Flavor. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *45*, 850-858.
- Ott, C., Jacobs, K., Haucke, E., Navarrete Santos, A., Grune, T., & Simm, A. (2014). Role of advanced glycation end products in cellular signaling. *Redox Biology*, *2*, 411-429.
- Ozer, B., Avni Kirmaci, H., Oztekin, S., Hayaloglu, A., & Atamer, M. (2007). Incorporation of microbial transglutaminase into non-fat yogurt production. *International Dairy Journal*, *17*, 199-207.
- Panyam, D., & Kilara, A. (1996). Enhancing the functionality of food proteins by enzymatic modification. *Trends in Food Science & Technology*, *7*, 120-125.
- Pereira, R., Matia-Merino, L., Jones, V., & Singh, H. (2006). Influence of fat on the perceived texture of set acid milk gels: a sensory perspective. *Food Hydrocolloids*, *20*, 305-313.
- Piontek, K., Antorini, M., & Choinowski, T. (2002). Crystal structure of a laccase from the fungus *Trametes versicolor* at 1.90-Å resolution containing a full complement of coppers. *Journal of Biological Chemistry*, *277*, 37663-37669.
- Pokorný, J. (1990). Einfluß der Lipidveränderungen auf den Geschmack und das Aroma von Lebensmitteln. *Food / Nahrung*, *34*, 887-897.
- Polizeli, M. d. L. T. M. (2013). *Fungal enzymes*. Boca Raton: CRC Press.
- Popp, M. W.-L., & Ploegh, H. L. (2011). Making and Breaking Peptide Bonds: Protein Engineering Using Sortase. *Angewandte Chemie International Edition*, *50*, 5024-5032.
- Post, A. E., Ebert, M., & Hinrichs, J. (2009).  $\beta$ -casein as a bioactive precursor - Processing for purification. *Australian Journal of Dairy Technology*, *64*, 84-88.
- Reddy, N., Reddy, R., & Jiang, Q. (2015). Crosslinking biopolymers for biomedical applications. *Trends in Biotechnology*, *33*, 362-369.
- Riva, S. (2006). Laccases: blue enzymes for green chemistry. *Trends in Biotechnology*, *24*, 219-226.
- Rivera-Hoyos, C. M., Morales-Álvarez, E. D., Poutou-Piñales, R. A., Pedroza-Rodríguez, A. M., Rodríguez-Vázquez, R., & Delgado-Boada, J. M. (2013). Fungal laccases. *Fungal Biology Reviews*, *27*, 67-82.
- Rodríguez-Mateos, A., Millar, S. J., Bhandari, D. G., & Frazier, R. A. (2006). Formation of dityrosine cross-links during breadmaking. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *54*, 2761-2766.
- Rodríguez Couto, S., Sanromán, M., & Gübitz, G. M. (2005). Influence of redox mediators and metal ions on synthetic acid dye decolourization by crude laccase from *Trametes hirsuta*. *Chemosphere*, *58*, 417-422.
- Rodríguez Couto, S., & Toca Herrera, J. L. (2006). Industrial and biotechnological applications of laccases: A review. *Biotechnology Advances*, *24*, 500-513.
- Roos, N., Lorenzen, P. C., Sick, H., Schrezenmeir, J., & Schlimme, E. (2004). Cross-linking by transglutaminase changes neither the in vitro proteolysis nor the in vivo digestibility of caseinate. *Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte*, *55*, 261-276.
- Sakurai, T., & Kataoka, K. (2007). Structure and function of type I copper in multicopper oxidases. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *64*, 2642-2656.

- Sandoval-Castilla, O., Lobato-Calleros, C., Aguirre-Mandujano, E., & Vernon-Carter, E. J. (2004). Microstructure and texture of yogurt as influenced by fat replacers. *International Dairy Journal*, *14*, 151-159.
- Saricay, Y., Dhayal, S. K., Wierenga, P. A., & De Vries, R. (2012). Protein cluster formation during enzymatic cross-linking of globular proteins. *Faraday Discussions*, *158*, 51-63.
- Saricay, Y., Wierenga, P., & De Vries, R. (2013). Nanostructure development during peroxidase catalysed cross-linking of  $\alpha$ -lactalbumin. *Food Hydrocolloids*, *33*, 280-288.
- Schmid, R. D., & Urlacher, V. B. (2007). *Modern Biooxidation: Enzymes, Reactions and Applications*. Weinheim: Wiley-VCH.
- Schmidt, G., Krings, U., Nimtz, M., & Berger, R. G. (2011). A surfactant tolerant laccase of *Meripilus giganteus*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 1-10.
- Schorsch, C., Carrie, H., & Norton, I. T. (2000). Cross-linking casein micelles by a microbial transglutaminase: influence of cross-links in acid-induced gelation. *International Dairy Journal*, *10*, 529-539.
- Seguro, K., Kumazawa, Y., Kuraishi, C., Sakamoto, H., & Motoki, M. (1996a). The  $\epsilon$ -( $\gamma$ -Glutamyl)lysine moiety in crosslinked casein is an available source of lysine for rats. *Journal of Nutrition*, *126*, 2557-2562.
- Seguro, K., Nio, N., & Motoki, M. (1996b). Some Characteristics of a Microbial Protein Cross-Linking Enzyme: Transglutaminase. In *ACS Symposium Series* (Vol. 650, pp. 271-280).
- Selinheimo, E., Kruus, K., Buchert, J., Hopia, A., & Autio, K. (2006). Effects of laccase, xylanase and their combination on the rheological properties of wheat doughs. *Journal of Cereal Science*, *43*, 152-159.
- Selinheimo, E., Autio, K., Kruus, K., & Buchert, J. (2007a). Elucidating the mechanism of laccase and tyrosinase in wheat bread making. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *55*, 6357-6365.
- Selinheimo, E., NiEidhin, D., Steffensen, C., Nielsen, J., Lomascolo, A., Halaouli, S., Record, E., O'Beirne, D., Buchert, J., & Kruus, K. (2007b). Comparison of the characteristics of fungal and plant tyrosinases. *Journal of Biotechnology*, *130*, 471-480.
- Selinheimo, E. (2008). *Tyrosinase and laccase as novel crosslinking tools for food biopolymers*. Dissertation, Helsinki University of Technology.
- Selinheimo, E., Lampila, P., Mattinen, M. L., & Buchert, J. (2008). Formation of protein-oligosaccharide conjugates by laccase and tyrosinase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *56*, 3118-3128.
- Senge, B., & Blochwitz, R. (2011a). Förderung von Sauermilchprodukten II. *Deutsche Molkerei Zeitung*, *2*, 30-33.
- Senge, B., & Blochwitz, R. (2011b). Förderung von Sauermilchprodukten. *Deutsche Molkerei Zeitung*, *1*, 30-33.
- Sharma, R., Lorenzen, P. C., & Qvist, K. B. (2001). Influence of transglutaminase treatment of skim milk on the formation of  $\epsilon$ -( $\gamma$ -glutamyl)lysine and the susceptibility of individual proteins towards crosslinking. *International Dairy Journal*, *11*, 785-793.
- Sharma, V. K. (2012). *Oxidation of Amino Acids, Peptides, and Proteins: Kinetics and Mechanism*. Hoboken: John Wiley and Sons.
- Sheldon, R. A. (2011). Characteristic features and biotechnological applications of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs). *Applied Microbiology and Biotechnology*, *92*, 467-477.
- Shewry, P. R., & Tatham, A. S. (1997). Disulphide Bonds in Wheat Gluten Proteins. *Journal of Cereal Science*, *25*, 207-227.
- Simpson, B. K., Nollet, L. M. L., Toldrá, F., Benjakul, S., Paliyath, G., & Hui, Y. H. (2012). *Food Biochemistry and Food Processing: Second Edition*: Wiley-Blackwell.
- Singh, A. P., & Singh, T. (2014). Biotechnological applications of wood-rotting fungi: A review. *Biomass and Bioenergy*, *62*, 198-206.
- Singh, G., Bhalla, A., Kaur, P., Capalash, N., & Sharma, P. (2011). Laccase from prokaryotes: a new source for an old enzyme. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, *10*, 309-326.
- Singh, H. (1991). Modification of food proteins by covalent crosslinking. *Trends in Food Science & Technology*, *2*, 196-200.
- Smiddy, M. A., Martin, J. E. G. H., Kelly, A. L., De Kruif, C. G., & Huppertz, T. (2006). Stability of casein micelles cross-linked by transglutaminase. *Journal of Dairy Science*, *89*, 1906-1914.

- Solomon, E. I., Augustine, A. J., & Yoon, J. (2008). O<sub>2</sub> Reduction to H<sub>2</sub>O by the multicopper oxidases. *Dalton Trans.*, 3921-3932.
- Søndergaard, H., Grunert, K. G., & Scholderer, J. (2007). Consumer attitudes towards novel enzyme technologies in food processing. In R. Rastall (Ed.), *Novel Enzyme Technology for Food Applications* (pp. 85-97): Woodhead Publishing.
- Sonne, A., Busch-Stockfish, M., Weiss, J., & Hinrichs, J. (2014). Improved mapping of in-mouth creaminess of semi-solid dairy products by combining rheology, particle size, and tribology data. *LWT - Food Science and Technology*, 59, 342-347.
- Souci, S. W., Fachmann, W., & Kraut, H. (2008). *Food composition and nutrition tables* (7 ed.). Stuttgart: Medpharm Scientific Publishers.
- Sprecher, E. (1959). Über die Guttation bei Pilzen. *Planta*, 53, 565-574.
- Srebotnik, E., & Boisson, J. N. (2005). Peroxidation of linoleic acid during the oxidation of phenols by fungal laccase. *Enzyme and Microbial Technology*, 36, 785-789.
- Stadler, M., & Hoffmeister, D. (2015). Fungal natural products-the mushroom perspective. *Frontiers in Microbiology*, 6.
- Stadtman, E. R. (2006). Protein oxidation and aging. *Free Radical Research*, 40, 1250-1258.
- Stanic, D., Monogioudi, E., Dilek, E., Radosavljevic, J., Atanaskovic-Markovic, M., Vuckovic, O., Raija, L., Mattinen, M., Buchert, J., & Velickovic, T. C. (2010). Digestibility and allergenicity assessment of enzymatically crosslinked  $\beta$ -casein. *Molecular Nutrition and Food Research*, 54, 1273-1284.
- Steffensen, C. L., Andersen, M. L., Degn, P. E., & Nielsen, J. H. (2008). Cross-linking proteins by laccase-catalyzed oxidation: Importance relative to other modifications. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 12002-12010.
- Steffensen, C. L., Stensballe, A., Kidmose, U., Degn, P. E., Andersen, M. L., & Nielsen, J. H. (2009). Modifications of amino acids during ferulic acid-mediated, laccase-catalysed cross-linking of peptides. *Free Radical Research*, 43, 1167-1178.
- Strong, P. J., & Claus, H. (2011). Laccase: A Review of Its Past and Its Future in Bioremediation. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 41, 373-434.
- Struch, M., Linke, D., Mookoolall, A., Hinrichs, J., & Berger, R. G. (2015). Laccase-catalysed cross-linking of a yoghurt-like model system made from skimmed milk with added food-grade mediators. *International Dairy Journal*, 49, 89-94.
- Struch, M., Linke, D., Mookoolall, A., Hinrichs, J., & Berger, R. G. (2016). Dose dependent effects of a milk ion tolerant laccase on yoghurt gel structure. *LWT - Food Science and Technology*, 65C, 1144-1152.
- Sugumar, M., Giglio, L., Kundzicz, H., Saul, S., & Semensi, V. (1992). Studies on the enzymes involved in puparial cuticle sclerotization in *Drosophila melanogaster*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 19, 271-283.
- Tantoush, Z., Stanic, D., Stojadinovic, M., Ognjenovic, J., Mihajlovic, L., Atanaskovic-Markovic, M., & Cirkovic Velickovic, T. (2011). Digestibility and allergenicity of  $\beta$ -lactoglobulin following laccase-mediated cross-linking in the presence of sour cherry phenolics. *Food Chemistry*, 125, 84-91.
- Teixeira, L. S., Feijen, J., van Blitterswijk, C. A., Dijkstra, P. J., & Karperien, M. (2012). Enzyme-catalyzed crosslinkable hydrogels: emerging strategies for tissue engineering. *Biomaterials*, 33, 1281-1290.
- Tilley, K. A., Benjamin, R. E., Bagorogoza, K. E., Okot-Kotber, B. M., Prakash, O., & Kwena, H. (2001). Tyrosine cross-links: Molecular basis of gluten structure and function. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 2627-2632.
- Tunick, M. H. (2000). Rheology of Dairy Foods that Gel, Stretch, and Fracture1. *Journal of Dairy Science*, 83, 1892-1898.
- van den Brink, J., & de Vries, R. P. (2011). Fungal enzyme sets for plant polysaccharide degradation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 91, 1477-1492.
- Walsh, C. T., Garneau-Tsodikova, S., & Gatto, G. J. (2005). Protein Posttranslational Modifications: The Chemistry of Proteome Diversifications. *Angewandte Chemie International Edition*, 44, 7342-7372.
- Walstra, P. (1999). Casein sub-micelles: do they exist? *International Dairy Journal*, 9, 189-192.

- Watanabe, M., Suzuki, T., Ikezawa, Z., & Arai, S. (1994). Controlled Enzymatic Treatment of Wheat Proteins for Production of Hypoallergenic Flour. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 58, 388-390.
- Weidendorfer, K., Bienias, A., & Hinrichs, J. (2008). Investigation of the effects of mechanical post-processing with a colloid mill on the texture properties of stirred yogurt. *International Journal of Dairy Technology*, 61, 379-384.
- Wen, Y., Liu, N., & Zhao, X. H. (2012). Chemical composition and rheological properties of set yoghurt prepared from skimmed milk treated with horseradish peroxidase. *Food Technology and Biotechnology*, 50, 473-478.
- Wong, S. S. (1991). *Chemistry of protein conjugation and cross-linking*. Boca Raton: CRC Press.
- Wong, S. S., & Wong, L.-J. C. (1992). Chemical crosslinking and the stabilization of proteins and enzymes. *Enzyme and Microbial Technology*, 14, 866-874.
- Wong, S. S., & Jameson, D. M. (2012). *Chemistry of protein and nucleic acid cross-linking and conjugation* (2 ed.). Boca Raton: CRC Press.
- Xiong, Y. L., & Decker, E. A. (1995). Alterations of muscle protein functionality by oxidative and antioxidative processes. *Journal of Muscle Foods*, 6, 139-160.
- Xu, F. (1996). Oxidation of phenols, anilines, and benzenethiols by fungal laccases: Correlation between activity and redox potentials as well as halide inhibition. *Biochemistry*, 35, 7608-7614.
- Xu, F. (1997). Effects of Redox Potential and Hydroxide Inhibition on the pH Activity Profile of Fungal Laccases. *Journal of Biological Chemistry*, 272, 924-928.
- Xu, F., Berka, R. M., Wahleithner, J. A., Nelson, B. A., Shuster, J. R., Brown, S. H., Palmer, A. E., & Solomon, E. I. (1998). Site-directed mutations in fungal laccase: effect on redox potential, activity and pH profile. *Biochemical Journal*, 334 ( Pt 1), 63-70.
- Yin, H., Xu, L., & Porter, N. A. (2011). Free radical lipid peroxidation: Mechanisms and analysis. *Chemical Reviews*, 111, 5944-5972.
- Yokoyama, K., Nio, N., & Kikuchi, Y. (2004). Properties and applications of microbial transglutaminase. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 64, 447-454.
- Yoshida, H. (1883). Yoshida: Chemistry of lacquer (Urushi). *J. Chem. Soc., Trans.*, 43, 472-486.
- Yoshitake, A., Katayama, Y., Nakamura, M., Iimura, Y., Kawai, S., & Morohoshi, N. (1993). N-linked carbohydrate chains protect laccase III from proteolysis in *Coriolus versicolor*. *Journal of General Microbiology*, 139, 179-185.
- Zavarzina, A. G., Leontievsky, A. A., Golovleva, L. A., & Trofimov, S. Y. (2004). Biotransformation of soil humic acids by blue laccase of *Panus tigrinus* 8/18: An in vitro study. *Soil Biology and Biochemistry*, 36, 359-369.
- Zeeb, B., Fischer, L., & Weiss, J. (2014). Stabilization of food dispersions by enzymes. *Food & Function*, 5, 198-213.

## Lebenslauf

### PERSÖNLICHE DATEN

Marlene Struch  
geboren am 24.04.1987 in Halle/Saale

### SCHULBILDUNG

1993-1997                    Grundschule Lilienschule, Halle/Saale  
1997-1999                    Sekundarschule Sophie Scholl, Baalberge  
1999-2006                    Gymnasium Carolinum, Bernburg  
07/2006                      Abitur; Prüfungsfächer: Mathematik, Deutsch, Englisch, Chemie,  
Geschichte

### STUDIUM

10/2006 – 09/2009            Bachelorstudium Chemie, Technische Universität Dresden  
06/2009 – 09/2009            Wissenschaftliche Abschlussarbeit (Bachelor-Arbeit)  
„Immobilisierung einer Laccase aus *Trametes versicolor* an Chitosan  
und Chitosanfasern“  
Professur für Allgemeine Biochemie, Technischen Universität Dresden  
Akademischer Grad: Bachelor of Science  
10/2009 – 11/2011            Masterstudium Chemie, Technische Universität Dresden  
04/2011 – 11/2011            Wissenschaftliche Abschlussarbeit (Master-Arbeit)  
„Synthese und Charakterisierung quellfähiger Lignin-Derivate“  
Institut für Holz- und Pflanzenchemie, Technische Universität Dresden  
Akademischer Grad: Master of Science

### STUDIENBEGLEITENDE TÄTIGKEITEN

06/2009 – 10/2009            Wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Organische Chemie I der  
01/2010 – 03/2010            Technischen Universität Dresden  
Digitalisierung der Vorlesung „Metallorganische Reaktionen in der  
organischen Synthese“

### PROMOTION

Seit 02/2012                    Wissenschaftliche Mitarbeiterin des Instituts für Lebensmittelchemie der  
Leibniz Universität Hannover; Promotion im Bereich der Biotechnologie  
und Lebensmittelchemie