

Lipasen aus Speisepilzen für den Einsatz in der Käserei

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Naturwissenschaften

doctor rerum naturalium

Dr. rer. nat.

des Fachbereiches Biologie und Chemie

der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Lebensmittelchemikerin

Nadja Kreuter

2018

Dekan: Prof. Dr. J. Janek

1. Gutachter: Prof. Dr. Holger Zorn

Institut für Lebensmittelchemie und Lebensmittelbiotechnologie

Justus-Liebig-Universität Gießen

2. Gutachter: Prof. Dr. Peter Friedhoff

Institut für Biochemie

Justus-Liebig-Universität Gießen

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Ich stimme einer evtl. Überprüfung meiner Dissertation durch eine Antiplagiat-Software zu. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Datum

Unterschrift (Nadja Kreuter)

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei all denjenigen bedanken, die die Erstellung dieser Arbeit überhaupt erst möglich gemacht haben.

Zuallererst möchte ich mich ganz herzlich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Holger Zorn für die Bereitstellung des interessanten Themas und die wissenschaftliche Unterstützungen in jeder Phase der Arbeit bedanken. Ebenso danke ich Herrn Prof. Dr. Peter Friedhoff für die Übernahme des Zweitgutachtens sowie Frau Prof. Dr. Sylvia Schnell und Herrn Prof. Dr. Klaus Eder für den Beitritt zur Prüfungskommission.

Ein ganz herzliches Dankeschön geht auch an Herrn Edgar Weichhard, Herrn Wilhelm Fleischner und Frau Julia Manhard der Firma optiform GmbH, die als Projektpartner für die Bereitstellung des Referenzzyms opti-zym z10uc, die Herstellung vieler verschiedener Testkäse und jegliche andere Unterstützung immer zu Diensten waren.

Das Verbundprojekt wurde vom Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) im Rahmen der Initiative „KMU-innovativ: Biotechnologie-BioChance“ gefördert. Ohne diese finanzielle Unterstützung wäre die Arbeit nicht möglich gewesen.

Für die zahlreichen Messungen an der HPLC-ESI-MS/MS zur Sequenzierung der Enzyme möchte ich mich ganz herzlich bei Frau Pegah Khomehghir-Silz aus dem Institut für Anorganische und Analytische Chemie der JLU Gießen bedanken. Ebenso danke ich Dir, liebe Pegah, für die schönen Kaffeepausen und deine Freundschaft.

Ich möchte mich auch bei den fleißigen Korrekturlesern Dr. Maria Weiß, Julia Manhard und Dr. Martin Gand für die hilfreichen Tipps und Anregungen bedanken.

Egal um was es ging, Marco Binsch und Marcus Schulze haben sich immer die Zeit genommen offene Fragen zu klären und mir das richtige *handling* im Labor zu zeigen, vielen Dank für Eure Geduld mit mir! Ebenso danke ich Dr. Martin Rühl und Dr. Martin Gand für die Unterstützung bei molekuarbiologischen Fragen. Aber auch Dr. Marco A. Fraatz, Florian Birk, Tobias Trapp und Andreas Hammer waren jeder Zeit zur Stelle, wenn ich Hilfe an der GC brauchte.

Ich danke allen Mitarbeitern des Instituts für Lebensmittelchemie und –biotechnologie, insbesondere Madeleine Petri, Dr. Maria Weiß, Dr. Nicole Mika, Dr. Martina Zajul und

Michael Goldmann für die zahlreichen, gemeinsamen Mittagspausen. Danke für die tolle Zeit, auch außerhalb der Uni, ohne Euch wäre es halb so schön gewesen.

Meinem Freund David danke ich von ganzem Herzen für seine endlose Geduld, die vielen aufbauenden Worte und seine Liebe während der gesamten Promotion.

Mein größter und herzlichster Dank geht an meine Familie, insbesondere an meine Eltern Ulrike und Ingo, meinen Bruder Max sowie meine Großeltern Ernst, Elisabeth und Heinz. Ihr habt immer an mich geglaubt und mich in jeder Lebenslage unterstützt. Meinem Opa Ernst danke ich vor allem für seine finanzielle Unterstützung, seine Liebe und seinen Zuspruch. Du fehlst mir sehr!

Für meinen Opa Ernst!

Veröffentlichungen

Tagungsbeiträge

Kreuter N, Manhard J, Fleischner W, Weichhard E, Zorn H (2016) Entwicklung von Lipasen aus Speisepilzen für den Einsatz in der Käseindustrie. Lebensmittelchemie 71:3 45. Deutscher Lebensmittelchemikertag, Freising, Deutschland

Kreuter N, Manhard J, Fleischner W, Weichhard E, Zorn H (2016) Entwicklung von Lipasen aus Speisepilzen für den Einsatz in der Käseindustrie. Regionalverbandstagung Südwest der Lebensmittelchemischen Gesellschaft, Freiburg, Deutschland

Kreuter N, Manhard J, Fleischner W, Weichhard E, Zorn H (2018) Lipases from edible mushrooms for use in the dairy industry. 7th International Bioeconomy Conference Halle an der Saale, Deutschland

Patente

Zorn H, Kreuter N, Weichhard E, Fleischner W, Manhard J (2017) Lipasen aus Basidiomyceten für den Einsatz in der Käserei; Patent eingereicht (EP 17 183 833.7)

Zusammenfassung

Bestimmte Käsesorten, wie z.B. Provolone oder Feta, werden üblicherweise unter Verwendung von Lipasen aus der Zungenwurzel von Ziegen, Schafen oder Kälbern hergestellt, um deren charakteristisches Geschmacksprofil zu generieren. Aufgrund der wachsenden Bedeutung von kosher- bzw. halal-zertifizierten Produkten ist es interessant, Lipasen mit ähnlichen katalytischen Eigenschaften aus Speisepilzen (Basidiomyceten) zu gewinnen. Dafür waren ausschließlich Wildtyp-Stämme vorgesehen, um ein „natürliches“ und „gentechnikfreies“ Produkt zu gewinnen.

In einem Screening in Submerskultur wurden insgesamt 31 verschiedene Speisepilze auf die Sekretion geeigneter Lipasen getestet. Anhand von photometrischen Assays wurde das Esterase-/Lipase-Sekretionsprofil der Basidiomyceten substratspezifisch in Abhängigkeit von der Acyl-Kettenlänge verschiedener *p*-Nitrophenylester quantitativ erfasst. Die Selektion vielversprechender Produktionsorganismen erfolgte durch den Vergleich mit dem Hydrolyseprofil der Ziegenzungengrundlipase (Handelsprodukt „opti-zym z10uc“). Anschließend erfolgte eine Optimierung der Kulturparameter durch Einsatz verschiedener Nährmedien. Des Weiteren wurde die Sekretion der extrazellulären Lipasen durch Zusatz geeigneter Induktoren wie Butterschmalz, Butter und Quarkfett gesteigert.

In Kooperation mit dem Projektpartner optiform GmbH wurden Applikationstests durchgeführt. Dazu wurden aus jeweils 10 bzw. 3 Liter Milch Käselaike der Käsesorte Weichkäse vom Typ Feta unter Lipase-Zusatz erzeugt. Die Testkäse wurden für 30 Tage bei 10 bis 15 °C gereift und anschließend für weitere 12 Wochen bei 4 °C gelagert. Über den Reifungs- und Lagerungszeitraum hinweg wurden die generierten Käsespezialitäten jeweils im Vergleich zum Referenzprodukt Ziegenlipase sensorisch beurteilt. Begleitend erfolgt eine umfassende instrumentell-analytische Charakterisierung der durch die Lipasen freigesetzten Fettsäuren. Die produzierten Käse wurden mittels Festphasenmikroextraktion (SPME) in Kopplung mit der gaschromatographischen Analyse mit massenspektrometrischer Detektion auf die Anwesenheit von freien Fettsäuren hin untersucht.

Die Herstellung von Käselaike erfolgte mit folgenden Basidiomyceten: *Lentinus squarrosulus*, *Auricularia fuscusuccinea*, *Flammulina velutipes*, *Pleurotus citrinopileatus*, *Pleurotus eryngii*, *Pleurotus flabellatus* und *Lycoperdon pyriforme*, deren sekretierte Enzyme mittels unterschiedlicher Verfahren gereinigt und konzentriert wurden. Am erfolgreichsten in Bezug auf die sensorischen Eigenschaften und den Vergleich der freien Fettsäuren war die Umsetzung mittels *F. velutipes* und *P. citrinopileatus* nach Fällung mit Ammoniumsulfat und

Konzentrierung mittels Vivaflow200. Die anderen Kandidaten erwiesen sich als weniger geeignet für den Einsatz in Käse.

Die Isolierung der Lipasen aus dem Kulturüberstand der Basidiomyceten *F. velutipes* und *P. citrinopileatus* erfolgte mittels Schaumfraktionierung, Ammoniumsulfatfällung und anschließender zweistufiger chromatographischer Reinigung mittels *Fast Protein Liquid Chromatography* (FPLC) an einer schwachen Ionenaustauscher- und einer Größenausschlussäule.

Die gereinigten Enzympräparationen aus *F. velutipes* und *P. citrinopileatus* wurden anschließend biochemisch charakterisiert. Dies erfolgte mittels elektrophoretischer Methoden wie der isoelektrischen Fokussierung (IEF) und der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE). Des Weiteren wurden Zymogramme unter seminativen Bedingungen zur Visualisierung der Lipase-Aktivität angefertigt. Anhand der gereinigten Enzyme wurden Temperatur- und pH-Optima sowie die enzymkinetischen Parameter K_m und V_{max} bestimmt.

Zur molekularbiologischen Charakterisierung wurden die gereinigten Enzyme mittels Elektrospray-Tandem-Massenspektrometrie (ESI-MS/MS) ansequenziert. Parallel dazu erfolgte die Entnahme von Myzel jeweils zum Zeitpunkt maximaler spezifischer Enzymaktivität im Kulturüberstand. Das Myzel wurde anschließend zur RNA-Isolierung mittels RNeasy[®] Plant Mini Kit unter flüssigem Stickstoff aufgeschlossen. Es folgte die Erststrangsynthese mittels reverser Transkription der Gesamt-RNA in cDNA. Anhand der Peptiddaten wurden Primer abgeleitet, die zur Amplifizierung der für das jeweilige Zielenzym codierenden cDNA mittels Polymerasen-Kettenreaktion (PCR) eingesetzt wurden. Das Zielenzym aus *F. velutipes* konnte mit insgesamt neun verschiedenen Primern aus der genomischen DNA sequenziert werden. Aufgrund der höheren Aktivität gegenüber Substraten mit kurzkettigen Acyl-Resten kann das Enzym funktionell den Carboxylesterasen zugeordnet werden.

Abstract

The characteristic aroma profile of certain cheeses such as Provolone or feta is generated by addition of calf, kid coat, or lamb pregastric esterases to the cheese milk. Due to the demands of vegetarians and the fast-growing market of kosher and halal-certified products, alternative lipases derived from edible mushrooms (basidiomycetes) with the ability to create similar aroma profiles are highly sought-after. For this purpose, only wild-type strains are of interest in order to obtain a “natural” and “GMO-free” product.

In a broad screening, various mushrooms were tested in submerged cultures for the secretion of appropriate lipases. Based on photometric assays, the esterase/lipase secretion profiles of the basidiomycetes were quantified in a substrate-specific manner depending on the acyl chain length of various *p*-nitrophenyl esters and compared to the hydrolysis profile of the commercial lipase product from the root of tongue of goats (trade product “opti-zym z10uc”). The cultivation parameters of the most-promising mushrooms were subsequently optimized by using different nutrient media in order to increase the secretion of extracellular lipases. Furthermore, the secretion of extracellular lipases was elicited by adding suitable inducers such as concentrated butter, butter and fat of regular quark.

Application tests of promising enzymes were performed in cooperation with the project partner optiferm GmbH. Feta-type cheese was prepared from 10 or 3 litres of milk by the addition of different lipases. The cheeses were ripened for 30 days at 10 to 15 °C and then stored for another 12 weeks at 4 °C. During the whole ripening and storage process, the sensory properties of the cheese were analyzed and compared to those prepared with the reference product “opti-zym z10uc”. A GC-MS-based method was developed and the produced cheese samples were analysed for the presence of free fatty acids by solid phase microextraction coupled to gas chromatography using mass spectrometric detection.

The cheese samples were prepared using enzymes derived from the following basidiomycetes: *Lentinus squarrosulus*, *Auricularia fuscusuccinea*, *Flammulina velutipes*, *Pleurotus citrinopileatus*, *Pleurotus eryngii*, *Pleurotus flabellatus* and *Lycoperdon pyriforme*. The enzyme preparations were purified and concentrated by various methods. Most successful in terms of sensory properties and the release of free fatty acids were the extracellular enzymes from *F. velutipes* and *P. citrinopileatus* after precipitation with ammonium sulphate and concentration by means of Vivaflow200. Other candidates proved to be less suitable for application in cheese production.

The isolation of the lipases from the culture supernatant of basidiomycetes *F. velutipes* and *P. citrinopileatus* was performed by means of foam fractionation, ammonium sulfate precipitation and subsequent two-stage chromatographic purification by means of fast protein liquid chromatography (FPLC) on a weak anion exchange column and a size exclusion column.

Subsequently, the purified enzyme preparations from *F. velutipes* and *P. citrinopileatus* were biochemically characterized by electrophoretic methods such as isoelectric focussing (IEF) and sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). Furthermore, zymograms were prepared under seminative conditions to visualize the lipase activity. The purified enzymes were used to determine temperature and pH optima as well as the enzyme kinetic parameters K_m and v_{max} .

For molecular biological characterization, the purified enzymes were sequenced by electrospray tandem mass spectrometry (ESI-MS/MS). Parallel to this, mycelium samples were collected from the culture supernatant at the time of maximum specific enzyme activity. The mycelium was ground under liquid nitrogen for RNA isolation using the RNeasy[®] Plant Mini Kit.

This was followed by first strand synthesis by reverse transcription of the total RNA into cDNA. Based on the peptide data, primers were derived which were used to amplify the cDNA coding for the respective target enzyme by polymerase chain reaction (PCR). The target enzyme from *F. velutipes* could be sequenced from the genomic DNA applying a total of nine different primer pairs. Due to the higher activity towards substrates with short-chain acyl residues, the enzyme is functionally classified as carboxylesterase.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	VII
1 Einleitung	1
1.1 Biokatalysatoren	1
1.1.1 Vorkommen von Lipasen	2
1.1.2 Struktur und Funktion von Lipasen	3
1.1.3 Einsatz von Lipasen in der Lebensmittelindustrie	5
1.1.3.1 Prägastrische Esterasen.....	6
1.1.3.2 Einfluss von Lipasen auf den Käseprozess.....	6
1.2 Zielsetzung	8
2 Material und Methoden.....	9
2.1 Enzyme	9
2.2 Mikroorganismen	9
2.3 Molekularbiologische Materialien	12
2.3.1 Größenstandards.....	12
2.3.2 Kits	12
2.3.3 Oligonucleotide.....	13
2.4 Chemikalien.....	14
2.4.1 Referenzverbindungen und Substrate	14
2.4.2 Chemikalien und Lösungsmittel	15
2.4.3 Gase.....	18
2.5 Geräte	19
2.5.1 Chromatographen.....	19
2.5.2 Trennsäulen	20
2.5.3 Geräte	21
2.5.4 Datenbanken und Bioinformatiksoftware.....	25
2.6 Kulturführung.....	26
2.6.1 Zusammensetzung von Nährmedien und Lösungen	26
2.6.1.1 Nähragar und –medien für Vor- und Hauptkulturen	26
2.6.1.2 Nährmedien und Lösungen für Transformationen.....	28
2.6.2 Stammhaltung	29

2.6.3	Vorkultur	29
2.6.4	Hauptkultur	29
2.6.5	Probennahme	30
2.6.6	Kulturernte	30
2.6.7	Optimierung der Medienzusammensetzung	30
2.6.8	Zusatz geeigneter Induktoren zur Steigerung der Sekretion extra-zellulärer Lipasen/Esterasen	31
2.6.9	Maßstabsvergrößerung des Kulturvolumens	31
2.6.10	Bestimmung des pH-Werts	31
2.6.11	Bestimmung des Fettgehaltes nach Weilbull-Stoldt	31
2.7	Charakterisierung der Referenzsubstanz opti-zym z10uc	33
2.8	Photometrische Assays	33
2.8.1	Verwendete Puffer und Substratlösungen	33
2.8.2	Esteraseassay nach Purdy und Kolattukudy (1973)	36
2.8.3	Lipaseassay nach Winkler und Stuckmann (1979)	37
2.8.4	Bestimmung der Peptidase-Aktivität mittels Azocasein	37
2.8.5	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford	39
2.8.6	Bestimmung des pH-Optimums	40
2.8.7	Bestimmung des Temperaturoptimums	40
2.8.8	Bestimmung der Enzymstabilität	41
2.8.8.1	Bestimmung der Lagerstabilität	41
2.8.8.2	Temperaturstabilität	41
2.8.8.3	Salztoleranz	41
2.8.8.4	Inaktivierung des Enzyms	41
2.8.9	Bestimmung der Enzymkinetik	42
2.9	Proteinbiochemische Methoden	42
2.9.1	Proteinpräzipitation mittels isoelektrisch fokussierter, präparativer Schaumfraktionierung	42
2.9.2	Proteinpräzipitation mit Ammoniumsulfat	44
2.9.3	Proteinpräzipitation mit Ethanol	44
2.9.4	Konzentrierung und Umpufferung	45
2.9.5	Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC)	46
2.9.5.1	Anionenaustauschchromatographie (IEX)	47
2.9.5.2	Größenausschlusschromatographie (SEC)	48
2.9.5.3	Proteinstandards	49
2.9.6	Proteincharakterisierung mittels HPLC-ESI-MS/MS	50
2.9.6.1	Proteinverdau aus den Fraktionen der FPLC	50
2.9.6.2	Proteinverdau aus den ausgeschnittenen Gelbanden	51
2.9.6.3	ZipTip® Pipettenspitzen zum Konzentrieren und Reinigen von Proben für die Massenspektrometrie	52

2.9.6.4	Analyse mittels HPLC-ESI-MS/MS	52
2.10	Elektrophoretische Methoden	53
2.10.1	Probenvorbereitung	53
2.10.2	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	53
2.10.2.1	Denaturierende SDS-PAGE.....	55
2.10.2.2	Halbnative SDS-PAGE	55
2.10.2.3	Native PAGE	56
2.10.3	Isoelektrische Fokussierung (IEF).....	56
2.10.4	Agarose-Gelelektrophorese	57
2.10.5	Gelfärbung.....	58
2.10.5.1	Färbung mit kolloidaler Coomassie.....	59
2.10.5.2	Färbung mittels Coomassie-Färbelösung	59
2.10.5.3	Esteraseaktivitätsfärbung	60
2.11	Käseherstellung.....	61
2.11.1	Applikationstests an Käse.....	61
2.11.2	Sensorische Beurteilung der hergestellten Testkäse	64
2.11.3	Analyse der freien Fettsäuren des Käses mittels SPME-GC-MS/MS-O	66
2.11.4	Berechnung des Retentionsindex nach Kováts.....	67
2.12	Toxikologische Untersuchung.....	68
2.12.1	Probenvorbereitung für die toxikologische Untersuchung	68
2.12.2	Resazurin-Test	68
2.12.3	Ames-Fluktuationstest	69
2.13	Molekularbiologische Methoden.....	70
2.13.1	Primerableitung	70
2.13.2	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	70
2.13.3	Isolierung genomischer DNA	70
2.13.4	Isolierung der RNA	71
2.13.5	cDNA-Synthese	72
2.13.6	Polymerasekettenreaktion (PCR).....	72
2.13.6.1	Analytische PCR.....	73
2.13.6.2	Präparative PCR.....	74
2.13.7	Isolierung von DNA-Fragmenten.....	74
2.13.8	DNA-Sequenzierung.....	74
2.13.9	Klonierung von DNA	75
2.13.9.1	Ligation.....	75
2.13.9.2	Transformation in <i>E. coli</i> TOP10.....	75
2.14	Sterilisation und Entsorgung	76
2.14.1	Sterilisation von Arbeitsmaterialien	76
2.14.2	Sterilisation und Entsorgung von S1-Abfällen	76

2.14.3	Entsorgung von Lösungsmitteln und Chemikalien	76
3	Ergebnisse	77
3.1	Charakterisierung des Referenzzyms opti-zym z10uc.....	77
3.1	Kulturführung.....	82
3.1.1	Stammhaltung	82
3.1.2	Vorkultur	83
3.1.3	Hauptkultur	84
3.1.3.1	Verschiedene Nährmedien	84
3.1.3.2	Verschiedene Induktoren.....	84
3.2	Photometrische Assays	85
3.2.1	Esterase- und Lipaseaktivität.....	85
3.2.1.1	Verschiedene Nährmedien	85
3.2.1.2	Verschiedene Induktoren.....	89
3.2.1.3	Maßstabsvergrößerung des Kulturvolumens	93
3.2.2	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford.....	94
3.3	Reinigung und Konzentrierung von Enzympräparationen	96
3.3.1	Proteinreinigung mittels isoelektrisch fokussierter, präparativer Schaumfraktionierung.....	96
3.3.2	Proteinreinigung mittels Ammoniumsulfatfällung.....	98
3.3.3	Chromatographische Reinigung der Zielenzyme mittels FPLC	98
3.3.3.1	Anionenaustauschchromatographie.....	98
3.3.3.2	Größenausschlusschromatographie	100
3.3.4	Charakterisierung aktiver Fraktionen der FPLC mittels elektro-phoretischer Methoden	102
3.4	Biochemische Charakterisierung der Zielenzyme	107
3.4.1	Bestimmung des pH-Optimums	107
3.4.2	Bestimmung des Temperaturoptimums	107
3.4.3	Bestimmung der Salztoleranz	108
3.4.3.1	Einfluss von Natriumchlorid	108
3.4.3.2	Einfluss von Ammoniumsulfat.....	109
3.4.4	Bestimmung der Enzymstabilität.....	110
3.4.4.1	Temperaturstabilität.....	110
3.4.4.2	Lagerstabilität in Abhängigkeit von der Temperatur	111
3.4.5	Bestimmung kinetischer Parameter	112
3.5	Applikationstest am Käse.....	113
3.5.1	Aufarbeitung geeigneter Enzympräparationen für den Käsereiprozess.....	113
3.5.2	Bestimmung sensorischer Eigenschaften	114

3.5.3	Bestimmung der freien Fettsäuren der hergestellten Testkäse	119
3.6	Ergebnisse der toxikologischen Untersuchungen der Enzympräparationen.....	123
3.6.1	Probenvorbereitung für die toxikologische Untersuchung	123
3.6.2	Resazurin-Test	126
3.6.3	Ames-Fluktuationstest	130
3.7	Molekularbiologische Charakterisierung	133
3.7.1	Identifizierung der verwendeten Basidiomyceten	133
3.7.2	Proteinidentifizierung der Zielenzyme mittels HPLC-ESI-MS/MS	135
3.7.3	RNA-Isolierung und Transkription in cDNA	137
3.7.4	Amplifikation und Sequenzierung des Zielenzym aus <i>F. velutipes</i>	140
3.7.5	Amplifikation und Sequenzierung des Zielenzym aus <i>P. citrinopileatus</i>	145
3.7.6	Bioinformatische Analyse der Sequenzen.....	149
3.7.6.1	Zielenzym aus <i>F. velutipes</i>	149
3.7.6.2	Zielenzym aus <i>P. citrinopileatus</i>	149
4	Diskussion.....	150
4.1	Einsatz von Pilzen als Biokatalysatoren.....	151
4.2	<i>Flammulina velutipes</i>	153
4.3	<i>Pleurotus citrinopileatus</i>	153
4.4	Referenzenzym opti-zym z10uc.....	154
4.4.1	Hydrolyseprofil des Referenzenzym.....	154
4.4.2	Bestimmung der Molekülmasse des Referenzenzym mittels elektrophoretischer Methoden	155
4.4.3	Ermittlung des isoelektrischen Punktes des Referenzenzym	156
4.5	Screening geeigneter Basidiomyceten.....	156
4.5.1	Kultivierung der Basidiomyceten.....	156
4.5.2	Esterase- bzw. Lipaseaktivitäten in den Kulturüberständen	157
4.5.3	Aktivitätssteigerung durch Zusatz geeigneter Induktoren	159
4.6	Enzymreinigung.....	160
4.6.1	Verschiedene Reinigungsmethoden im Vergleich.....	160
4.6.2	Reinigung mittels präparativer Schaumfraktionierung	160
4.6.3	Reinigung mittels chromatographischer Methoden	162
4.6.4	Bestimmung der Molekülmassen der Zielenzyme mittels elektrophoretischer Methoden	165
4.6.5	Bestimmung der isoelektrischen Punkte der Zielenzyme	166
4.7	Biochemische Charakterisierung	166
4.7.1	Ermittlung der pH- und Temperaturoptima der Zielenzyme.....	167
4.7.2	Einfluss von Salzen auf die Aktivität der Zielenzyme	167

4.7.3	Verschiedene Stabilitätsuntersuchungen der Zielenzyme	168
4.7.4	Bestimmung der kinetischen Parameter K_M und v_{max} der Zielenzyme.....	169
4.8	Käseherstellung.....	170
4.8.1	Chemische Prozesse während der Käsureifung	170
4.8.2	Herstellung von Testkäse unter Einsatz verschiedener Lipasen	174
4.8.3	Sensorische Beurteilung der hergestellten Testkäse	174
4.8.4	Instrumentell-analytische Charakterisierung der hergestellten Testkäse mittels HS-SPME-GC-MS/MS.....	175
4.8.5	Durchführung der instrumentell-analytischen Charakterisierung	178
4.9	Toxikologische Beurteilung.....	180
4.10	Molekularbiologische Charakterisierung	182
4.10.1	Identifizierung der Zielenzyme aus <i>F. velutipes</i> und <i>P. citrinopileatus</i>	182
4.10.2	Sequenz- und modellorientierte Analyse des Zielenzym aus <i>F. velutipes</i> ..	184
4.10.3	Ermittlung einer Signalsequenz für das Zielenzym aus <i>F. velutipes</i>	187
4.10.4	Ermittlung des Glykosylierungsgrades des Zielenzym aus <i>F. velutipes</i>	188
5	Ausblick.....	192
6	Literatur	194
7	Anhang	209

Abkürzungsverzeichnis

A	Aktivität
AD	Außendurchmesser
ANOVA	<i>analysis of variance</i>
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	2'-Desoxyadenosin-5'-triphosphat
AU	<i>Arbitrary Unit</i>
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
CBS	<i>Centraalbureau voor Schimmelcultures</i>
cDNA	komplementäre DNA
cTTP	2'-Desoxythymidin-5'-triphosphat
d	Tage
Da	Dalton
dCTP	2'-Desoxycytidin-5'-triphosphat
DEAE	Diethylaminoethyl
dGTP	2'-Desoxyguanosin-5'-triphosphat
DNA	Desoxyribonucleinsäure (<i>desoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat: dATP, dCTP, dGTP, dTTP
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
DTT	Dithiothreitol
E	Extinktion
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
$\epsilon_{p\text{-Nitrophenol}, 405 \text{ nm}}$	Extinktionskoeffizient von <i>p</i> -Nitrophenol bei 405 nm
ESI	Elektronenspray-Ionisation
EtOH	Ethanol
FF	<i>Fast Flow</i>
FPLC	<i>Fast Protein Liquid Chromatography</i>
FVE-D	<i>Flammulina velutipes</i>
<i>g</i>	Erdbeschleunigung
GC	Gaschromatographie
gDNA	genomische DNA
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie
HS	<i>head space</i>
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IEX	<i>Ion Exchange Chromatography</i>
IMD	<i>Intermed Discovery</i>
JGI	<i>Joint Genome Institute</i>
kbp	Kilobasenpaare
K_{av}	Retentionskoeffizient
kDa	Kilodalton
KI	Kováts-Index
K_m	Michaelis-Menten-Konstante

KÜ	Kulturüberstand
<i>m/z</i>	Masse-Ladungsverhältnis
MEP	Malzextrakt Sojapepton
mRNA	Boten RNA
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie
MW	Molekulargewicht
MWCO	Molekulargewichtsgrenze
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
p.a	zur Analyse (<i>pro analysi</i>)
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PGE	Prägastrische Esterase
pH	<i>pondus Hydrogenii</i>
pI	Isoelektrischer Punkt
PCI	<i>Pleurotus citrinopileatus</i>
pNPA	<i>para</i> -Nitrophenylacetat
pNPB	<i>para</i> -Nitrophenylbutyrat
pNPH	<i>para</i> -Nitrophenylhexanoat
pNPO	<i>para</i> -Nitrophenyloctanoat
pNPP	<i>para</i> -Nitrophenylpalmitat
pNPV	<i>para</i> -Nitrophenylvalerat
RNA	Ribonucleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
rpm	<i>rounds per minute</i>
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEC	<i>Size Exclusion Chromatography</i>
SNL	Standard-Nährlösung
SPME	<i>Solid Phase Micro Extraction</i>
SV	Säulenvolumen
TEMED	N,N,N,N'-Tetramethylethyldiamin
TFA	Trifluoressigsäure
T _m	Schmelztemperatur
Tris	C,C,C-Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Triton X-100	4-(1,1,3,3-Tetramethylbutyl)phenyl-polyethylenglycol
Tween® 80	Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monooleat
U	Unit
UV	ultraviolett
V	Volumen
v/v	Volumen pro Volumen (bei Prozentangaben)
VE	vollentsalzt
V _{max}	maximale Umsetzungsgeschwindigkeit

1 Einleitung

Die im Käseprozess anfallende Molke wird industriell zunehmend nicht als Abfall- oder Nebenstrom, sondern als Wertstoff erachtet. Wurde sie früher entsorgt oder mit geringer Wertschöpfung vermarktet, werden heute verschiedene Inhaltsstoffe wie Molkenproteine, Lactose und Peptide gewonnen, veredelt und weltweit vertrieben. Aufgrund weltweit wachsender Märkte werden auch ethnische Gruppen wie der Islam und das Judentum, die klar definierte Vorgaben an ihre Lebensmittel festgelegt haben, erreicht. Daher müssen diese Lebensmittel den Status von kosher bzw. halal aufweisen. Diese Anforderungen werden auch an die Käseindustrie gestellt, da diese ihre Produkte weltweit vertreibt. Somit müssen alle eingesetzten Hilfsstoffe, wie Starterkulturen und Gerinnungsenzyme kosher und halal-zertifiziert sein. Chymosin, welches mikrobiell und fermentativ gewonnen wird, erfüllt diese Bedingungen bereits, wohingegen Naturlab dies nicht tut. Bisher eingesetzte mikrobielle Lipasen erfüllen nicht die gewünschten Vorgaben bezüglich ihrer Funktionalität. Mit diesen Lipasen hergestellte Käse werden mit zunehmender Reifedauer seifig und weichen daher von den sensorischen Ansprüchen ab. Enzyme aus Speisepilzen von Wildtyp-Stämmen sind für die Verwendung für die Lebensmittelherstellung von besonderem Interesse, da gute Ausbeuten ohne den Einsatz gentechnischer Optimierungen erzielt werden können.

1.1 Biokatalysatoren

In der Lebensmittelproduktion ist die Biotechnologie seit vielen Jahrtausenden im Einsatz. Dabei fungieren Mikroorganismen wie Pilze, Hefen und Bakterien als Biokatalysatoren. Diese werden für die Produktion fermentierter Lebensmittel wie Käse, Sauerteig, Wein, Bier oder Essig verwendet (Kirk *et al.*, 2002). Aber nicht nur im Bereich der Lebensmittelindustrie ist der Einsatz der Biotechnologie von großem Nutzen, sondern auch andere Bereiche, wie z.B. die Pharmaindustrie, sind immer mehr daran interessiert biotechnologisch zu produzieren (Ogawa und Shimizu, 1999; Tao und Xu, 2009).

Alle lebenden Organismen enthalten Biokatalysatoren, welche als Enzyme bezeichnet werden (Patel *et al.*, 2016). Mikroorganismen sind in der Natur weit verbreitet und sind in der Lage, unter extremen Lebensbedingungen zu existieren (Borges *et al.*, 2009). Es kann zwischen Ganz-Zellsystemen und isolierten Enzymen unterschieden werden, die aus

Bakterien, Hefen und Pilzen gewonnen werden können. In diesen Fällen zählen die Pilze zu den meist erforschten Ganz-Zellsystemen. Vor allem Basidiomyceten, welche zu den höheren Pilzen mit rund 31.500 bekannten Arten zählen (Kirk und Ainsworth 2008), sind von Bedeutung, denn sie produzieren ein breites Spektrum an sekundären Stoffwechselprodukten, die für die Industrie sehr nützlich sind (Quin *et al.*, 2013).

In lebenden Prozessen sind Biokatalysatoren für alle biochemischen Reaktionen verantwortlich und werden aus Gründen der Sicherheit, Energieeinsparung und Gesundheit immer häufiger eingesetzt (Wohlgemuth, 2010, Leresche und Meyer, 2006, Carvalho, 2011). Sie katalysieren Reaktionen unter milden Bedingungen, meist neutralem oder schwach saurem pH-Bereich und niedrigen Temperaturen (Hollmann *et al.*, 2011, Carvalho, 2011). Aufgrund des optimalen Temperaturbereichs von 20°C bis 40°C, bei dem die meisten Enzyme arbeiten, können unerwünschte Nebenreaktionen weitgehend unterdrückt werden (Loughlin, 2000). Ebenfalls von Vorteil sind die hohe Chemo-, Regio- und Stereoselektivität einiger Enzyme (Riva, 2001, Sweers und Wong, 1986, Loughlin, 2000, Schmid, Dordick *et al.*, 2001, Hudlicky und Reed 2009). Von Nachteil sind die aufwendigen Verfahren zur Reinigung und Isolierung der Enzyme vor ihrer Verwendung. Vielfach werden außerdem noch Co-Faktoren benötigt. Sehr häufig sind auch mehrere Enzyme an einer Reaktion beteiligt, was durch die begrenzte Verfügbarkeit mancher Enzyme die Anwendung erschwert (Carvalho, 2011).

1.1.1 Vorkommen von Lipasen

Lipasen sind Enzyme, die ubiquitär in allen lebenden Organismen vorkommen. In Eukaryonten können sie in Zellorganellen, oder auch außerhalb von Zellen vorliegen. Dabei spielen sie im Metabolismus, der Aufnahme und dem Transport von Lipiden eine Rolle. In Bakterien und niederen Eukaryonten treten Lipasen intrazellulär auf oder werden sekretiert, um Lipidsubstrate in der Umwelt abzubauen. Enzyme aus Pilzen und Bakterien haben das größte Potential als Biokatalysatoren in der Industrie eingesetzt zu werden. Sie sind meistens sehr robust, mittels Fermentation leicht herzustellen und einfach aus dem Kulturmedium zu gewinnen. Als Folge dessen können eine große Anzahl an mikrobiellen Enzymen von gewerblichen Produzenten erworben werden. Die meisten bakteriellen Lipasen stammen aus *Pseudomonas*-, *Burkholderia*-, *Alcaligenes*-, *Actinobacter*-, *Bacillus*- und *Chromobacterium*-Spezies (Lotti und Alberghina, 2007).

Dass vor allem Pilze in der Lage sind, Lipasen zu produzieren wurde in einigen verschiedenen Lebensräumen festgestellt. Aufmerksamkeit erlangten Pilzlipasen vor allem aufgrund ihrer Stabilität, Selektivität und ihrer breiten Substratspezifität. Zu den Gattungen der lipaseproduzierenden Pilze zählen vor allem *Mucor* (z.B. *M. miehei*), *Rhizopus* (z.B. *R. pusarrhizus*, *R. japonicus*, *R. niveus*), *Aspergillus sp.* (z.B. *A. niger*, *A. terreus*), *Candida* (z.B. *C. rugosa*), *Geotrichum*, *Rhizomucor*, *Humicola*, *Yarrowia* und *Penicillium sp.* (Yamane, 1987, Yadav *et al.*, 1998, Benjamin und Pandey, 1998, Gulati *et al.*, 1999, Tan *et al.*, 2003, Larios, 2004, Ellaiah *et al.*, 2004, Lotti und Alberghina, 2007).

1.1.2 Struktur und Funktion von Lipasen

Lipolytische Enzyme spielen eine wichtige Rolle bei der Umsetzung wasserunlöslicher Komponenten wie Lipiden (Beisson *et al.*, 2000). Lipasen werden der Enzym-Klasse der Hydrolasen zugeordnet (EC 3.1.1.3, Triacylglycerol Lipasen). Sie sind in der Lage, Triglyceride in Diglyceride, Monoglyceride, freie Fettsäuren und Glycerol zu spalten (Houde *et al.*, 2004, Ray, 2012). Den Lipasen wird eine enorme wissenschaftliche Aufmerksamkeit zu Teil, da sie nicht nur in der Lage sind Carboxylester-Bindungen zu hydrolysieren, sondern auch Veresterungen und Umesterungen in nicht wässrigen Medien zu katalysieren. Aufgrund dieser Vielseitigkeit finden Lipasen in vielen Bereichen wie in der Lebensmittel-, Pharma- und Waschmittelindustrie, um nur einige zu nennen, Anwendung (Houde *et al.*, 2004).

Sowohl Esterasen (EC 3.1.1.1, Carboxylesterasen) als auch Lipasen (EC 3.1.1.3) hydrolysieren Esterbindungen. Während Lipasen eine hohe Aktivität gegenüber Substraten im aggregierten Zustand zeigen, weisen Esterasen die höchste Aktivität gegenüber Substraten im gelösten Zustand auf (Fojan *et al.*, 2000). Somit sind Lipasen als einzige in der Lage, an der Grenzschicht zwischen Öl und Wasser zu arbeiten (Gupta *et al.*, 2003).

Unlösliche Lipidverbindungen, die in wässrigen Lösungen zur Aggregation neigen, zählen zu den natürlichen Substraten von Lipasen. Sarda und Desnuelle beschrieben einen deutlichen Anstieg der Lipaseaktivität, sobald die Substratkonzentration die Löslichkeitsgrenze übersteigt. Dabei handelt es sich um den größten Unterschied zu den Esterasen (Sarda und Desnuelle, 1958). Für die Aktivierung von Lipasen ist somit die Bildung einer Grenzfläche zwischen dem aggregierten Substrat und der wässrigen Lösung notwendig. Dieses Phänomen wird auch als Grenzflächenaktivierung bezeichnet und wird durch die dreidimensionale Struktur der Lipaseenzyme erklärt (Winkler *et al.*, 1990, Brady *et al.*, 1990). Studien zeigen, dass die aktive Seite des Enzyms von der Lösung durch eine

bewegliche Struktur, dem sogenannten „lid“ oder „flap“, zu Deutsch Deckel, abgeschirmt ist. Um ein aktives Enzym mit einem freien katalytischen Zentrum für das Substrat zu erhalten, muss dieser Deckel geöffnet werden. Zwischen einzelnen Enzymen kommt es zu Abweichungen des Öffnungsmechanismus, aber es führt in jedem Fall zur Ausbildung eines offenen, frei zugänglichen aktiven Zentrums und einer ausgeprägten hydrophoben Lipid-Bindungsstelle (Lotti und Alberghina, 2007). Allerdings trifft die Klassifizierung von lipolytischen Enzymen als wahre Lipase (EC 3.1.1.3) auf Grundlage der Grenzflächenaktivierung und des Vorhandensein einer Deckel-Struktur nicht in jedem Fall zu. Es wurden auch Lipasen beschrieben, die keinen Deckel haben oder einen Deckel haben, aber ohne Grenzflächenaktivierung arbeiten (Verger, 1997). Daher ist die Definition von Lipasen als Carboxylesterasen, die die Synthese und die Hydrolyse von langkettigen Acylglycerolen katalysieren, weitestgehend akzeptiert und trifft auf die Beschreibung aller bekannten Lipasen zu (Lotti und Alberghina, 2007).

Große Unterschiede bezüglich der Herkunft, zellulärer Lokalisation und Funktion der Lipasen resultieren in einem hohen Ausmaß an biochemischer Variabilität. Diese Vielfältigkeit spiegelt sich vor allem in den stark variierenden molekularen Massen, dem pH- und Temperaturoptimum, sowie posttranslationalen Modifikationen als auch in ihren Substrat- und Reaktionsspezifitäten wider. Ausgestattet mit einer großen Spanne von Optima und Spezifitäten können diese unter verschiedenen Prozessbedingungen eingesetzt werden. Molekulare Massen bekannter Lipasen reichen von ca. 20 kDa im Falle der kleinen, deckellosen Lipase A von *Bacillus subtilis* und *Bacillus cutinas* von *Fusarium solani pisi*, bis hin zu ca. 60 kDa für die größere Pilzlipasen aus z. B. *Geotrichum candidum*. Unabhängig davon weisen die meisten Lipasen dieselbe Architektur auf und zählen zu einer einzigen Proteindomäne. Die Spanne der Temperaturoptima, liegt in den meisten Fällen zwischen 30 °C und 60 °C. Das pH-Optimum der meisten Lipasen, die als Biokatalysatoren eingesetzt werden, liegt im neutralen und alkalischen Bereich, in manchen Fällen auch über einem pH-Wert von 9 wie z.B. bei *Pseudomonas*- und *Bacillus*- Lipasen. Weniger verbreitet sind Lipasen, die ihr Optimum bei einem sauren pH-Wert von 3 haben (Lotti und Alberghina, 2007). Gupta *et al.* (2004a) beschrieben Lipasen aus *Bacillus* sp., die über einen großen pH-Bereich aktiv sind. Ein weiterer Vorteil dieser Enzyme ist deren Stabilität, sie sind auch in organischen Lösungsmitteln aktiv und benötigen keine Co-Faktoren (Bornscheuer, 2002).

Das Potenzial der Lipasen für den Einsatz als Biokatalysatoren beruht außerdem auf ihrer Selektivität und Spezifität, welche die genaue Einstellung der Reaktionen ermöglichen. Dabei wird zwischen Regioselektivität (Position des Substratmoleküls an der Esterbindung, welche hydrolysiert oder ausgebildet wird), Chemoselektivität (Eigenschaften des Substrates) und Stereoselektivität unterschieden. Die meisten bekannten Lipasen sind 1,3- regiospezifisch,

nur wenige sind in der Lage eine Bindung an der S_N2 Position zu hydrolysieren und somit die vollständige Hydrolyse des Triglycerids zu freien Fettsäuren zu katalysieren. Bezüglich der Fettsäureselektivität sind Lipasen in der Lage, die Hydrolyse mittel- bis langkettige Fettsäureketten von C₄ bis C₁₈, selten bis C₂₂ mit unterschiedlicher Effizienz zu katalysieren (Lotti und Alberghina, 2007). In Abbildung 1.1 ist die Hydrolyse eines Triglycerids zu Glycerol und freien Fettsäuren durch Lipasen dargestellt.

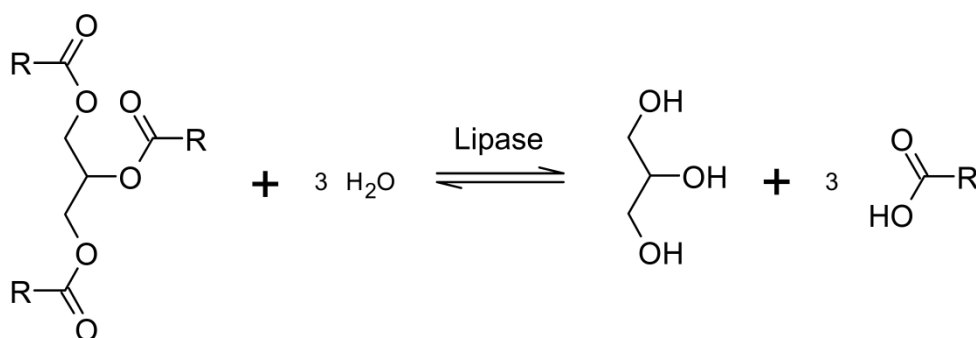


Abbildung 1.1 Hydrolyse von Triglyceriden durch Lipasen (modifiziert nach Singh und Mukhopadhyay, 2012)

1.1.3 Einsatz von Lipasen in der Lebensmittelindustrie

Lipasen werden verstärkt in der milchverarbeitenden Industrie eingesetzt, um Milchfette zu hydrolysieren. Durch intermolekulare Umesterung können Fette modifiziert werden, wodurch das Aroma verschiedener Käsesorten verändert werden kann. Gegenwärtige Anwendungen schließen auch die Beschleunigung der Käsereifung und der Lipolyse von Butter, Fett und Sahne mit ein. Freie Fettsäuren, die durch Lipasen aus Milchfett freigesetzt werden, sind in vielen Milchprodukten enthalten, so auch in Weichkäse mit dem charakteristischen pikanten Aroma. Zur Verbesserung des Käsearomas werden traditionell Lipasen aus tierischem Gewebe wie der Bauchspeicheldrüse von Rindern und Schweinen oder prägastrischem Gewebe von jungen Wiederkäuern wie Kitz, Lamm und Kalb genutzt (Ghosh *et al.*, 1996, Sharma *et al.*, 2001, Ray, 2012).

1.1.3.1 Prägastrische Esterasen

Enzyme, welche aus oralem Gewebe von Säugetieren sekretiert werden, werden als prägastrische Esterasen (PGE) bezeichnet. Dabei handelt es sich um die am weitesten verbreitete Bezeichnung für esterolytische bzw. lipolytische Enzyme. Weitere Bezeichnungen für Enzyme oralen Ursprungs sind glanduläre Enzyme, oral-glanduläres Präparat, orale Lipase, linguale Lipase, pharyngeale Lipase oder Speichellipase. Um das typische Aroma italienischer Käsesorten und Feta-Käse zu generieren und um die Aromabildung in anderen Käsesorten und käseähnlichen Produkten auszubilden, werden Präparate der prägastrischen Esterasen von Kalb, Ziegenkitz und Lamm kommerziell genutzt. Butterfett, welches durch prägastrische Esterasen modifiziert wurde, findet Anwendung in einer breiten Gruppe von verarbeiteten Lebensmitteln, um diesen ein milchproduktähnliches Aroma zu verleihen. Prägastrische Esterasen, noch nicht als solche bekannt, wurden von Käseherstellern in Italien seit Generationen eingesetzt, da das Enzym in Labpasten-Präparaten, welche zur Milchgerinnung eingesetzt wurden, enthalten war. Daraus hergestellte Käsesorten, vorzugsweise Provolone und Romano, wiesen ein charakteristisches pikantes Aroma mit einer pfeffrigen Note auf. Käse aus konventionell gewonnenem animalischem Lab, welches aus gereinigten Labmägen extrahiert oder durch Fermentation gewonnen wurde, wiesen kein typisches, pikantes Aroma auf (Nelson *et al.*, 1977).

1.1.3.2 Einfluss von Lipasen auf den Käsereiprozess

Die kommerziell erhältlichen prägastrischen Lipasen sind als flüssige Extrakte, als Paste und als vakuum- oder gefriergetrocknetes Pulver erhältlich (Caro *et al.*, 1995, Jooyandeh *et al.*, 2009). Jede dieser Arten der prägastrischen Lipasen bilden ihr eigenes, charakteristisches Aromaprofil aus: ein buttriges und leicht pfeffriges Aroma bei Lipasen aus Kälbern, ein scharfes, pikantes Aroma bei Lipasen aus Kitzen und ein starkes scharfes Aroma bei Lipasen aus Lämmern (Anon, 2008). Die Lipasen aus Bauchspeicheldrüsen stammen in der Regel aus dem Pankreas von Rindern, Schafen und Schweinen. Der Nachteil tierischer Lipasen ist, dass sie nicht für die Herstellung von vegetarischen und kosher- bzw. halal-zertifizierten Lebensmitteln eingesetzt werden können (Jooyandeh *et al.*, 2009).

Die Kombination einer Lipase aus Kälbermagen und einer prägastrische Lipase aus Ziegen half bei der Herstellung von Cheddar- oder Provolone-Käse, welche eine besser Qualität

aufwiesen als Käse, die nur mit einer prägastrischen Lipase hergestellt wurden (Lai *et al.*, 1997).

Efthymiou und Mattick (1964) beschrieben die Herstellung von Feta-Käse mit pasteurisierter Milch, Kulturen von *Streptococcus lactis* und *Lactobacillus casei*, einer prägastrischen Esterase (Capalase-KL) und flüssigem Lab. Das Aroma des Käses war angenehm salzig, essigsauer, mild und charakteristisch ranzig. Die Konsistenz des Käses war weich und cremig und hatte einen gut zu schneidenden Käsekörper. Für die Ausbildung des charakteristischen Aromas von Feta-Käse war ein Gemisch aus den Kulturen *S. lactis* mit entweder *L. casei* oder *L. acidophilus* nötig. Dem Käse ohne *Lactobacillus*-Kulturen fehlte es an Aroma und Weichheit des Käsekörpers, während der Käse ohne *Streptococcus*-Kulturen sehr löslich und schäumend war.

Das Aroma von Feta-Käse hoher Qualität unterschied sich vom bitteren, untypischen, ranzigen und unreinen Aroma anderer Produkte, welche durch Milchlipasen, Capalase-K (PGE vom Kitz) oder Italase (PGE vom Kalb) hergestellt wurden. Durch eine Homogenisierung wurden diese Fehler sogar verstärkt. Das gewünschte ranzige Aroma entwickelte sich in Käse, welche mit Capalase-KL (PGE vom Kitz und Lamm) und Capalase-L (PGE vom Lamm) hergestellt wurden. Die freien Fettsäuren von C₂ bis C₁₀ waren laut chemischen Analysen für das ranzige Aroma von Feta-Käse verantwortlich. Ein unangenehmes, ranziges Aroma entwickelte sich hingegen in Käse mit hohen Gehalten an C₁₂ oder höheren Fettsäuren (Efthymiou und Mattick, 1964).

1.2 Zielsetzung

Ziel der Arbeit war es, spezielle Lipasen aus Speisepilzen zu isolieren, um diese als Ersatz für die bisher eingesetzten animalischen Lipasen aus Ziege, Lamm und Kalb im Käseprozess einzusetzen.

Anhand eines Screenings in Submerskultur sollten verschiedene essbare Basidiomyceten auf das Vorhandensein geeigneter Lipasen untersucht werden. Mittels photometrischer Assays wurde das Esterase-/Lipase-Sekretionsprofil der Basidiomyceten substratspezifisch quantitativ im Kulturüberstand erfasst. Die Selektion geeigneter Kandidaten erfolgte durch den Vergleich mit dem Hydrolyseprofil der Ziegenzungengrundlipase (opti-zym z10uc), welche zuvor biochemisch charakterisiert werden sollte. Dazu sollte eine Optimierung der Medienzusammensetzung und durch Zusatz geeigneter Induktoren eine Steigerung der Sekretion extrazellulärer Esterasen/Lipasen erfolgen. Die Isolierung der Zielenzyme sollte anschließend mittels verschiedener Reinigungsmethoden wie der Schaumfraktionierung, Ammoniumsulfatfällung und einer Reinigung mittels *Fast Protein Liquid Chromatography* (FPLC) erfolgen.

Ausgewählte Lipasen sollten in Kooperation mit dem Projektpartner optiform GmbH im Käseprozess eingesetzt werden. Die hergestellten Testkäse sollten anschließend nach verschiedenen Lagerperioden im Vergleich zum Referenzprodukt, hergestellt mittels Ziegenzungengrundlipase, sensorisch beurteilt werden. Die Charakterisierung der durch die Lipasen freigesetzten Fettsäuren im Käse sollte instrumentell-analytisch mittels Festphasenmikroextraktion (SPME) in Kopplung mit der gaschromatographischen Analyse mit massenspektrometrischer Detektion durchgeführt werden.

Aussichtsreiche Lipasen aus Basidiomyceten sollten mittels chromatographischer und elektrophoretischer Methoden eingehend biochemisch charakterisiert und zur molekularbiologischen Charakterisierung der gereinigten Enzyme mittels Elektrospray-Tandem-Massenspektrometrie (ESI-MS/MS) ansequenziert werden. Dazu erfolgte eine RNA-Isolierung aus dem Myzel mit anschließender Erststrangsynthese mittels reverser Transkription der Gesamt-RNA in cDNA. Anhand der Peptidaten sollten Primer abgeleitet werden, die zur Amplifizierung der codierenden cDNA für das Zielenzym zur Polymerasen-Kettenreaktion (PCR) eingesetzt werden sollten.

2 Material und Methoden

2.1 Enzyme

Die in dieser Arbeit verwendeten Enzyme sind in Tabelle 2.1 aufgeführt.

Tabelle 2.1 Verwendete Enzyme

Enzym	Verwendung	Hersteller
M-MLV Reverse Transcriptase	cDNA-Synthese	Invitrogen™ Thermo Fisher Scientific Life Technologies GmbH, Darmstadt
PrimeScript™ Reverse Transcriptase	cDNA-Synthese	Takara Bio Inc, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich
Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase	PCR	New England BioLabs® GmbH, Frankfurt am Main
Q5® High-Fidelity DNA Polymerase	PCR	New England BioLabs®
TaKaRa Ex Taq® DNA Polymerase	PCR	Takara Bio Inc
RNase-Free DNase	DNA-Verdau	Qiagen N.V., Hilden
RNase OUT	RNase Inhibitor	Invitrogen™
RNase A	RNase Inhibitor	Invitrogen™
ExpressLink™ T4 DNA Ligase	aus Zero Blunt® PCR Cloning Kit	Invitrogen™

2.2 Mikroorganismen

Die für das Screening verwendeten Mikroorganismen (Tabelle 2.2) wurden über das Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ Braunschweig) und Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS, Utrecht, Niederlande)

sowie von Intermed Discovery (IMD) bezogen und in die Stammsammlung des Instituts für Lebensmittelchemie und Lebensmittelbiotechnologie der JLU Gießen aufgenommen.

Tabelle 2.2 Verwendete Mikroorganismen

Stammnummer	Organismus	Kürzel	Herkunft
5	<i>Pleurotus sapidus</i>	PSA	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Braunschweig Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS), Utrecht, NL DSMZ
16	<i>Lentinula edodes</i>	LED	
39	<i>Lentinus squarrosulus</i>	LSQU	
43	<i>Panellus serotinus</i>	PSER	DSMZ
59	<i>Hypholoma capnoides</i>	HCA	DSMZ
60	<i>Kuehneromyces mutabilis</i>	KUM	DSMZ
61	<i>Lycoperdon pyriforme</i>	LYP	DSMZ
67	<i>Fistulina hepatica</i>	FHE	DSMZ
79	<i>Laetiporus sulphureus</i>	LSU	DSMZ
87	<i>Armillaria bulbosa</i>	ABU	DSMZ
100	<i>Pleurotus eryngii</i>	PER	DSMZ
103	<i>Hericiium erinaceus</i>	HER	IMD
106	<i>Auricularia fuscossuccinea</i>	AFU	DSMZ
114	<i>Pleurotus citrinopileatus</i>	PCI	DSMZ
115	<i>Pleurotus flabellatus</i>	PFLA	DSMZ
127	<i>Hericiium cirrhatum</i>	HCI	CBS
128	<i>Hericiium coralloides</i>	HCO	CBS
136	<i>Polyporus umbellatus</i>	PUM	CBS

160	<i>Flammulina velutipes</i>	FVE-D	DSMZ
161	<i>Hypsizygus tessulatus</i>	HTE	DSMZ
162	<i>Clitocybe geotropa</i>	CGE	CBS
166	<i>Agrocybe aegerita</i>	AAE	Sylvan Inc., Horst, NL
168	<i>Flammulina velutipes</i>	FVE-F	Falk Amelung (FAM), AG Prof. Dr. Zorn, Justus-Liebig- Universität Gießen
171	<i>Lactarius deliciosus</i>	LDE	CBS
186	<i>Armillaria melea</i>	AMEL	DSMZ
187	<i>Pleurotus ostreatus</i>	POS-2	Yoichi Honda, Kyoto University
194	<i>Kuehneromyces mutabilis</i>	KMU-F	FAM
201	<i>Piptoporus betulinus</i>	PBE	FAM
202	<i>Macrolepiota procera</i>	MPR	FAM
221	<i>Phallus impudicus</i>	PIM	FAM
229	<i>Armillaria gallica</i>	AGAL	FAM

2.3 Molekularbiologische Materialien

2.3.1 Größenstandards

Die in dieser Arbeit verwendeten Größenstandards, Kits und Oligonukleotide sind in Tabelle 2.3, Tabelle 2.4 und Tabelle 2.5 aufgelistet.

Tabelle 2.3 Verwendete Größenstandards

Bezeichnung	Hersteller
Proteingrößenstandards	
Unstained Protein Molecular Weight Marker	Thermo Fisher Scientific Life Technologies GmbH, Darmstadt
PageRuler Unstained Protein Ladder	Thermo Fisher
SERVA Native Marker Liquid Mix	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
IEF Marker 3-10, Liquid Mix	Serva
DNA-Größenstandards	
100 bp-DNA-Ladder	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
1 kbp-DNA-Ladder	Carl Roth

2.3.2 Kits

Tabelle 2.4 Verwendete kommerzielle Kits

Kit	Verwendung	Hersteller
RNeasy [®] Plant Mini Kit	RNA Isolierung	Qiagen N.V., Hilden
NucleoSpin [®] Gel and PCR-Clean-up	Isolierung und Reinigung von DNA aus Agarosegel-Banden	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Weilmünster
Zero Blunt [®] PCR Kloning Kit	Klonieren und Transformieren	Invitrogen [™] Thermo Fisher Scientific Life Tehnologies GmbH, Darmstadt
RNase-Free DNase Set	DNA Verdau	Qiagen
Serva Gel [™] N Native Starter Kit	native PAGE	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Größenstandard	Gelfiltrationschromatographie	Bio Rad

2.3.3 Oligonucleotide

Tabelle 2.5 Verwendete Oligonucleotide

Nr.	Name	Sequenz	T _m [°C]	Hersteller
<i>Transcribed Spacer Region (ITS-Region)</i>				
8364	ITS1	5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'		eurofins Genomics GmbH, Ebersberg
8366	ITS4	5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'	58	eurofins
8367	ITS5	5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAG-3'	58	eurofins
Amplifizierung von cDNA bzw. gDNA von <i>Flammulina velutipes</i>				
79	Poly dT Primer	5'- TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT- 3'	48	eurofins
NKr 1	Fvelu_lip_fw	5'-ATGACTAGGGCGCCATTAC-3'	49	biomers. net GmbH, Ulm
NKr 2	Fvelu_lip_rv	5'-TCAAATGGCCCATGGG-3'	50	biomers
NKr 3	NKr_Lip_rev1	5'-TCTTCCGAAGTCGGACC-3'	47	biomers
NKr 4	NKr_Lip_for1	5'-CAACTTCTGTGTTGCGT-3'	54	biomers
NKr 5	NKr_Lip_rev2	5'-TTGATCCCAAAGTGGCGGC-3'	63	biomers
NKr 6	NKr_Lip_for2	5'-CACTGCGATCCTTCTGGAAC-3'	52	biomers
NKr 7	FVE-D_NKr7_for	5'-CCTCAGAACCTTATATTGCAGG-3'	55	biomers
NKr 8	NKr8_LIP_for	5'-GTTACATATATCTCTGGCAGCG-3'	50	biomers
NKr 9	NKr_LIP_rev	5'-GGCCATATACGTATGCTTCGA-3'	53	biomers
Amplifizierung von cDNA bzw. gDNA von <i>Pleurotus citrinopileatus</i>				
NKr 10	poly T	5'-TTTTTTTTTTTTTTTTTT-3'	38	biomers
NKr 11	NKr_PCI_consfor1	5'-GCATTACGATGGATCCAG-3'	45	biomers
NKr 12	PCI_c1+2_for	5'-ATGTTCTTCGTTCTACAGGT-3'	43	biomers
NKr 13	PCI_c1_rev1	5'-TCATAGTGGGTTGGCAAGAG-3'	50	biomers
NKr 14	PCI_c2_rev1	5'-TCAAAGTGGATTTGCTAGAG-3'	45	biomers
NKr 15	PCI_cons_rev1	5'-CTGGATCCATCGTAATGC-3'	45	biomers

NKr 16	PCI_for1_gDNA	5'-TTGGGCTCTTCGCCATTC-3'	53	biomers
NKr 17	PCI-for2_gDNA	5'-CAGCATTTGGCCCTGCTT-3'	54	biomers
NKr 18	PCI-for3_gDNA	5'-TCCAAGCTTCCTGTGGCAGT-3'	55	biomers
NKr 19	PCI-for4_gDNA	5'-TCCATACAGCTTGGCGAGC-3'	54	biomers
NKr 20	PCI-rev1_gDNA	5'-CATGATTCCCATCGTTTCGC-3'	54	biomers
NKr 21	PCI-rev2_gDNA	5'-CGTAAGAAAAACGCCGTCG-3'	54	biomers
NKr 22	PCI-rev3_gDNA	5'-GGAAAGCCCACGTGTTCTGT-3'	54	biomers
NKr 23	PCI-rev4_gDNA	5'-TTCGGCCAGTTGATTCCG-3'	54	biomers

2.4 Chemikalien

2.4.1 Referenzverbindungen und Substrate

In Tabelle 2.6 sind verwendete Referenzverbindungen sowie Substrate aufgeführt.

Tabelle 2.6 Verwendete Referenzverbindungen und Substrate

Substrat	Bemerkung/Reinheit	Hersteller
α -Naphthylacetat	BioChemica	AppliChem
α -Naphthylbutyrat	98+%	Alfa Aesar, Karlsruhe
p -Nitrophenylacetat	esterase substrate	Sigma Aldrich, St. Louis
p -Nitrophenylbutyrat		Santa Cruz Biotechnology, Dallas
p -Nitrophenylhexanoat	> 98%	TCI, Tokyo
p -Nitrophenyloctanoat	$\geq 95,0\%$	Sigma Aldrich, St. Louis
p -Nitrophenylpalmitat		Sigma Aldrich, St. Louis
p -Nitrophenylvalerat		Sigma Aldrich, St. Louis
opti-zym z10uc	Natürliche, pulverförmige Ziegenlipase	optiferm GmbH, Oy-Mittelberg
Piccantase [®] KLC		DSM, Heerlen
Italase [®] C		DSM, Heerlen

2.4.2 Chemikalien und Lösungsmittel

Verwendete Chemikalien und Lösungsmittel sind in Tabelle 2.7 aufgelistet.

Tabelle 2.7 Verwendete Chemikalien und Lösungsmittel

Chemikalie	Reinheit/Bemerkung	Hersteller
Aceton	Techn.	-
Acetonitril	HPLC, Gradient Grade	VWR International GmbH, Darmstadt
Agar-Agar Kobe I	reinst	Carl Roth
Agarose	für die Gelelektrophorese	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf
Albumin Fraktion V	> 98%, pulv., bovine Albumin Fraktion V	Carl Roth
Aluminiumsulfat-Hydrat	krist.	Carl Roth
L-Asparagin-Monohydrat	≥99%,CELLPURE®	Carl Roth
Ameisensäure	98%, p.a.	VWR
Ammoniumbicarbonat	≥99%	Sigma Aldrich
Ammoniumnitrat	98% zur Analyse	Acros Organics (Fisher), Schwerte
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	für die Molekularbiologie	AppliChem GmbH, Darmstadt
Ammoniumsulfat	≥ 99%, Enzymqualität	Carl Roth
Ammoniumsulfat-Hydrat	≥99,5%, p.a.	Carl Roth
Azocasein	-	Sigma Aldrich
Bromphenolblau Natriumsalz	für die Elektrophorese	Carl Roth
Buttersäure	99%	Alfar Aesar GmbH& Co K.G, Karlsruhe
Calciumchlorid-Dihydrat	zur Analyse	AppliChem
Citronensäure	≥99,5%, Ph. Eur.	Carl Roth
Coomassie Blue G 250	-	AppliChem
Coomassie Blue R 250	-	AppliChem
Decansäure	99%, zur Synthese	Carl Roth
Desoxycholsäure-Natriumsalz	≥ 93%, für die Biochemie	Carl Roth
Desoxynucleosidtriphosphat	≥99%	Sigma-Aldrich

dNTPs: dATP, dCTP, dGTP, cTTP		
Diammoniumperoxodisulfat	für die Molekularbiologie	AppliChem
Dichlormethan	≥99,5%	Carl Roth
Dikaliumhydrogenphosphat	≥99% p.a.	Carl Roth
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat	zur Analyse	Bernd Kraft GmbH, Duisburg
Dithiothreitol (DTT)	für die Mikrobiologie	AppliChem
Eisen(III)-chlorid-Hexahydrat	p.a.	AppliChem
Essigsäure	Rotipuran [®] , 100% p.a.	Carl Roth
Ethanol	HPLC-Grade Rotipuran [®]	Carl Roth
	≥99,8% p.a.	
Ethanol	≥99,5%, reinst	Carl Roth
Ethylendiamintetraessigsäure-Dinatriumsalz-Dihydrat (EDTA)	p.a.	Applichem
Fast Blue RR Salt	kristallin	Sigma Aldrich, St. Louis
D-(+)-Glucose-Monohydrat	für die Mikrobiologie	Carl Roth
Glycerol	100%	Merck
Glycin	≥99%, p.a.	Carl Roth
<i>Gummi arabicum</i>	reagent grade	Sigma Aldrich, St. Louis
Hefeextrakt	Molecular Genetics	ChemAlert [®]
Hexan	wasserfrei, AnalaR	VWR
	NORMAPUR [®] zur Analyse	
Hexansäure	99%	Alfa Aesar
IEF Anode Buffer	powder (Running Buffer KIT)	Serva Electrophoresis, Heidelberg
IEF Cathode Buffer	powder (Running Buffer KIT)	Serva Electrophoresis, Heidelberg
IEF Gel	ServaGel [™] IEF 3-10	Serva Electrophoresis, Heidelberg
IEF Probenauftragspuffer	IEF sample buffer (2x) sterile filtered	Serva Electrophoresis, Heidelberg
Iodacetamid	≥ 99%	AppliChem
Isopropanol	≥99,8%, p.a.	Carl Roth
Kaliumacetat	Reinst, Ph. Eur.	AppliChem
Kaliumdihydrogenphosphat	≥ 99%, p.a., ACS	Carl Roth

Kartoffel-Extrakt	für Mikrobiologie	Fluka Analytical
Kupfer(II)-sulfat-Pentahydrat	min. 99%	Alfa Aesar
LB-Medium (Lenox)	für Mikrobiologie	Carl Roth
LB-Agar (Lenox)	für Mikrobiologie	Carl Roth
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	≥99%	Carl Roth
Malzextrakt	für Mikrobiologie	Fluka Analytical (Sigma), Buchs
Mangan(II)-sulfat-Monohydrat	99%	Alfa Aesar
β-Mercaptoethanol	99%, p.a.	Sigma-Aldrich
Methanol	≥99,8%, HPLC grade	VWR
Midori Green Advance	-	Nippon Genetics Europe GmbH
Midori Green Direct	-	Nippon Genetics
Natriumacetat, wasserfrei	≥99% p.a.	Carl Roth
Natriumchlorid	>99,8%	Carl Roth
Natriumdodecylsulfat	Ph. Eur.	Merck
Natriumhydroxid	≥99% p.a.	Carl Roth
Natriumhypochlorit	13% Technical Grade	AppliChem
Octansäure	≥99,5%, zur Synthese	Carl Roth
Pepton aus Soja	für Mikrobiologie	Fluka Analytical
Phosphorsäure	Rotipuran® 85%, p.a., ACS, ISO	Carl Roth
RapiGest™ SF Surfactant		Waters GmbH, Eschborn
Rinderserumalbumin (BSA)	>98%, für die Molekularbiologie	Carl Roth
Roti-Nanoquant® 5x	5x Konzentrat	Carl Roth
Rotiphorese® Gel 40	Gebrauchsfertige, gasstabilisierte, wässrige 40% Acrylamid-, Bisacrylamid- Stammlösung im Verhältnis 37,5:1	Carl Roth, Karlsruhe
Salzsäure	37% Rotipuran® p.a.	Carl Roth
N,N,N,N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	≥99%	AppliChem
Trichloressigsäure	≥ 99%, p.a.	Carl Roth, Karlsruhe
Tris-Hydrochlorid	PUFFERAN® ≥99%	Carl Roth
C,C,C-Tris(hydroxymethyl)- aminomethan (Tris-Base)	PUFFERAN® ≥99%	Carl Roth

Triton® X100	reinst.	Carl Roth, Karlsruhe
Trypsin		Promega GmbH, Mannheim
Trypton	100%	AppliChem
Tween® 80	Ph. Eur.	Carl Roth
Zinksulfat-Heptahydrat	p.a.	AppliChem

2.4.3 Gase

In Tabelle 2.8 sind die verwendeten Gase aufgeführt.

Tabelle 2.8 Verwendete Gase

Gas	Qualität	Lieferant
Helium	5.0	Praxair, Düsseldorf
Sauerstoff	2.5	Praxair
Sauerstoff	4.0	Praxair
Stickstoff	5.0	Praxair
Wasserstoff	5.0	Praxair

2.5 Geräte

2.5.1 Chromatographen

Die verwendeten Chromatographen, die entsprechenden Trennsäulen sowie die verwendeten Festphasenextraktionseinheiten sind in Tabelle 2.9, Tabelle 2.10 und Tabelle 2.11 aufgeführt.

Tabelle 2.9 Verwendete Chromatographen

Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC)		
Gerät	NGC™ Chromatography System	BioRad BioLogic Duo Flow
Hersteller	Bio-Rad Laboratories GmbH, München	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Detektion	UV-Detektion 280 nm	UV-Detektion bei 280 nm
Fraktionssammler	BioRad BioLogic BioFrac Fraction Collector	BioRad BioLogic BioFrac Fraction Collector
Datenaufnahme	ChromLab 3.1	BioLogic Duo Flow
Gaschromatographen (GC)		
Gerät	Agilent 7890A, Agilent Technologies,	
Hersteller	Agilent Technologies Deutschland GmbH & Co. KG, Waldbronn	
Detektion	Massenspektrometer Agilent Technologies 5975C VL MSD with triple-Axis Detector	
Bediensoftware	MassHunter GC/MS Aquisition B.07.01.1805	
Auswertesoftware	MassHunter Workstation Software Qualitative Analysis Version B.06.00	
Datenbank	NIST Mass Spectral Search Programm Version 2.0g	
Autosampler	MPS Multi Purpose Sampler Gerstel, CTC Analytics AG Zwingen, CH	
Software Autosampler	Maestro Configuration 1.4.4.19	

2.5.2 Trennsäulen

Tabelle 2.10 Verwendete Trennsäulen

	Säule/Zubehör	Funktion	Hersteller
FPLC-Säulen	HiLoad™ 16/60	Gelfiltration	GE Healthcare
	Superdex™ 200 prep grade		Bio-Sciences AB, Uppsala, S
	ENrich™ SEC 650	Gelfiltration	BioRad
	XK 26 Column	Leersäule	GE Healthcare
	DEAE Sepharose™ Fast Flow	Schwacher Anionentauscher	GE Healthcare
GC-Säulen	VF-WAXms; 30 m x 250 µm x 0,25 µm	Polare Trennsäule	Agilent Technologies Deutschland GmbH & Co. KG, Waldbronn

Tabelle 2.11 Verwendete Festphasenextraktionseinheiten

Extraktionszubehör	Material	Hersteller
SPME-Fiber	DVB/PDMS (rosa)	Supelco
SPME-Fiber	DVB/CAR/PDMS (grau)	Supelco

2.5.3 Geräte

In Tabelle 2.12 und Tabelle 2.13 sind die verwendeten Geräte sowie verwendete Datenbanken und Software aufgeführt.

Tabelle 2.12 Verwendete Geräte

Gerät	Modell	Hersteller	Zugehörige Software
Autoklav (groß)	Laboklav 160 MSL	SHP Steriltechnik AG, Detzel Schloss/Satuelle	
Autoklav (klein)	Laboklav 25 B	SHP Steriltechnik	
Brutschrank	IPP 5000	Memmert GmbH & Co.KG, Schwabach	
Dispergiergerät	T 25 digital Ultra- Turrax [®]	IKA [®] -Werke GmbH & Co.KG, Staufen	
Eismaschine	EF 103 easy-fit	Scotsman [®]	
Feinwaage	BP 211D	Sartorius Lab Instruments GmbH & Co. KG, Göttingen	
Filtriereinheit	Ultrasette [™] tangential Flow Device	Pall Deutschland Holding GmbH % Co. KG, Dreieich	
Filtriereinheit	Vivaflow 200	Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen	
Filtriereinheit	Macrosep [®] Advance Centrifugal Device 10 MWCO	Pall	
Filtriereinheit	Microsep [®] Advance Centrifugal Device 10 MWCO	Pall	
Filtriereinheit	Amicol Ultra-0.5 Ultracel-PL Membran, 10 kDA	Merck Chemikals GmbH, Darmstadt	

Flowmeter (0 – 7 L·h ⁻¹)	10A6242A	ABB Asea Brown Boveri Ltd., Zürich	
Gelelektrophoresekammer	Mini-Protean [®] Tetra System	Bio-Rad Laboratories GmbH, München	
Gelelektrophoresekammer	PerfectBlue Mini S	PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen	
Gelscanner	DeVision DBOX mit UV- Transilluminator	Decon Science Tec GmbH, Hohengandern	DeVision G
Gelscanner	Bio 5000 MICROTEK	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg	ScanWizard Bio
Grobwaage	Atilon AccuLab	Sartorius	
Heizblock	Accublock [™] Mini	Labnet International Inc., Edison, NJ, USA	
IEF- Gelelektrophoresekammer	multiphor II	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg	
Inkubationsschüttler	MULTITRON [®] Version 2	Infors GmbH, Einsbach	
Inkubationsschüttler	gyro-rocker SSL3	Cole-Parmer GmbH, Wertheim	
Kälte-Umwälzthermostat	Minichiller [®]	Peter Huber Kältemaschinenbau GmbH, Offenburg	
Magnetrührer	RH basic 2	IKA [®]	
Magnetrührer	LAB DISC	VWR International GmbH, Darmstadt	
Mikroplattenleser	Biotek Synergy 2	BioTek Germany, Friedrichshall	Gen5 1.07; Gen5 2.01
Mikrowelle	MWG 1227CB	C. Bomann GmbH, Kempten	
Muffelofen	B 130	Nabertherm GmbH, Lilienthal	
Multipipette	Research pro 1200	Eppendorf AG, Hamburg	

Multipipette	Research pro 100	Eppendorf	
Nanophotometer	NanoPhotometerTM Pearl	Implen GmbH, München	
PCR-Cycler	T100TM Thermal Cycler	Bio-Rad	
PCR-Werkbank	Ultraviolet sterilizing PCR Workstation	PeqLab	
Peristaltikpumpe	Masterflex® L/STM easy-load ecolomy drive	Cole-Parmer	
pH-Meter	Seven Easy	Mettler-Toledo International Inc., Greifensee, CH	
Pipettensatz	PeqPette	PeqLab	
Pipettensatz	Transferpette®S: 10 mL; 1000 µL; 200 µL; 20 µL	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim	
Real-time PCR Detektionssystem	CFX Connect™ Real- Time System	Bio-Rad	Bio-Rad CFX Manager 3.0
Reinstwasseranlage	Sartorius arium 611VF	Sartorius	
Soxtherm-Apparatur	-	Gerhardt GmbH & Co.KG	
Spannungsquelle	Power Supply EV231	PeqLab	
Spannungsquelle	Power Supply EV262	PeqLab	
Spektralphotometer	Specord 50	Analytik Jena AG, Jena	WinASPECT
Sterilwerkbank	HERAsafe KS 18	Thermo Fisher Scientific Life Tehnologies GmbH, Darmstadt	
Temperiereinheit für Spektralphotometer	Ministat 125	Peter Huber	
Tischzentrifuge	Mini centrifuge NG002R	Nippon Genetics Europe, Düren	
Tischzentrifuge	Mini centrifuge	Nippon	

	NG002G	
Tischzentrifuge	Microfuge® 22R	Beckman Coulter
	Microcentrifuge	GmbH, Krefeld
Tischzentrifuge	Allegra® X-15R	Beckman Coulter
	Benchtop Centrifuge	
Ultratiefkühlschrank	Forma 900 Series	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham
Vakuum Controller	PC 3004 Vario, CVC 3000	Vacuubrand GmbH & Co.KG, Wertheim
Vortexmixer	Mixer UZUSIO VTX- 3000L	LMS Laboratory & Medical Supplies GmbH & Co. KG, Brigachtal

2.5.4 Datenbanken und Bioinformatiksoftware

Tabelle 2.13 Verwendete Software und Datenbanken

Name	Funktion	Internetadresse
NCBI BLAST	Datenbank	Blast.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST.cgi
Primer Design Oligo Property Scan	Primerkonstruktion	eurofins.de
MultAlin	Nucleotid Alignments	http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/
JGI BLAST	Datenbank	genome.jgi.doe.gov
OriginPro 9.3	Datenvisualisierung	originlab.com
ExPASy SwissModel*	3D-Modell Berechnung	swissmodel.expasy.org
Proteome Discoverer™ 1.4	Peptiddaten-Analyse	Thermo Fisher Scientific GmbH, Bremen, Germany
Geneious 9.1.8	Sequenzanalyse	https://www.geneious.com/
ExPASy ProtParam	Sequenzanalyse	https://web.expasy.org/protparam/
ExPASy Prosite	Proteindomänen, - familien	https://prosite.expasy.org/
InterProScan (EMBL-EBI)	Proteindomänen, - familien	http://www.ebi.ac.uk/interpro/search/sequence- search
NetNGlyc 1.0	N-Glykosylierungsstellen	http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/
NetOGlyc 4.0	O-Glykosylierungsstellen	http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/
SignalP 4.1	potentielle Signalsequenzen	http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/

*(Arnold *et al.*, 2006, Bordoli *et al.*, 2009, Biasini *et al.*, 2014)

2.6 Kulturführung

2.6.1 Zusammensetzung von Nährmedien und Lösungen

2.6.1.1 Nähragar und –medien für Vor- und Hauptkulturen

Die für Vor- und Hauptkulturen eingesetzten Nähragar und –medien sind in Tabelle 2.14 bis Tabelle 2.18 aufgeführt.

Tabelle 2.14 Zusammensetzung des MEP-Agars

Chemikalie	Konzentration [g L ⁻¹]
Agar Agar	15,0
Malzextrakt	30,0
Sojapepton	3,0

Der MEP-Agar wurde mit 1 M NaOH auf einen pH von 5,6 eingestellt und anschließend 20 min bei 121 °C autoklaviert.

Tabelle 2.15 Zusammensetzung des Malzextraktpepton-Nährmediums (MEP)

Chemikalie	Konzentration [g L ⁻¹]
Malzextrakt	30,0
Sojaprotein	3,0

Das Malzextraktpepton-Nährmedium wurde mit 1 M NaOH auf einen pH von 5,6 eingestellt und anschließend 20 min bei 121 °C autoklaviert.

Tabelle 2.16 Zusammensetzung des Kartoffel-Glucose-Nährmediums (KG)

Chemikalie	Konzentration [g L ⁻¹]
Kartoffel-Extrakt	4,0
Glucose	20,0

Das Kartoffel-Glucose-Nährmedium wurde mit 1 M NaOH auf einen pH von 6,2 eingestellt und anschließend 20 min bei 121 °C autoklaviert.

Tabelle 2.17 Zusammensetzung der Standardnährlösung (SNL)

Chemikalie	Konzentration [g L ⁻¹]
Asparagin * 1 H ₂ O	4,5
Glucose * 1 H ₂ O	30,0
Hefeextrakt	3,0
KH ₂ PO ₄	1,5
MgSO ₄ * 1 H ₂ O	0,5
Spurenelementlösung	1 mL*L ⁻¹

Das SNL-Nährmedium wurde mit 1 M NaOH auf einen pH von 6,0 eingestellt und anschließend 20 min bei 121 °C autoklaviert.

Tabelle 2.18 Zusammensetzung der Spurenelementlösung

Chemikalie	Konzentration [g L ⁻¹]
CuSO ₄ * 5 H ₂ O	0,005
EDTA	0,400
FeCl ₂ * 6 H ₂ O	0,080
MnSO ₄ * 1 H ₂ O	0,030
ZnSO ₄ * 7 H ₂ O	0,090

2.6.1.2 Nährmedien und Lösungen für Transformationen

Die Zusammensetzungen der Nährmedien die für Transformationen zum Einsatz kamen sind in Tabelle 2.19 und Tabelle 2.20 aufgeführt.

Tabelle 2.19 Zusammensetzung des Lysogeny-broth-Nährmediums (LB)

Chemikalie	Konzentration [g L ⁻¹]
Trypton	10,0
Hefeextrakt	5,0
NaCl	10,0

Das Lysogeny-broth-Nährmedium wurde mit 1 M NaOH auf einen pH von 7,0 eingestellt und anschließend 20 min bei 121 °C autoklaviert.

Für die Herstellung eines LB_{Kanamycin}-Mediums wurde das Antibiotikum erst nach dem Autoklavieren je nach Bedarf hinzugefügt. Für die Herstellung von LB_{Kanamycin}-Agarplatten wurden die Bestandteile aus Tabelle 2.19 eingewogen und zusätzlich 15,0 g L⁻¹ Agar-Agar hinzugefügt und autoklaviert. Erst nach dem Abkühlen auf ca. 50 °C wurde das Antibiotikum hinzugefügt. Die Endkonzentration des Kanamycins betrug 50 µg mL⁻¹.

Die Kanamycin-Stammlösung (25 mg mL⁻¹) wurden mit Reinstwasser hergestellt, anschließend steril filtriert, aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

Tabelle 2.20 Zusammensetzung des SOC-Mediums

Chemikalie	Konzentration [g L ⁻¹]
Trypton	20,0
Hefeextrakt	5,0
NaCl	0,6
KCl	0,2
MgCl ₂ * 6 H ₂ O	2,0
MgSO ₄ * 1 H ₂ O	1,5
Glucose	4,0

2.6.2 Stammhaltung

Ausgehend von der Stammsammlung des Instituts für Lebensmittelchemie und Lebensmittelbiotechnologie wurden die Pilzstämme auf Malzextraktpepton-Agarplatten (MEPA) kultiviert. Zur Herstellung der Platten wurden die Medienbestandteile (Tabelle 2.14) eingewogen, mit Reinstwasser *ad* 1 L aufgefüllt, mit 1 M NaOH auf pH 5,6 eingestellt und für 20 min bei 121 °C autoklaviert.

Auf die Agarplatten wurde mit einem sterilen Spatel mittig ein 1 cm² großes, homogen mit Pilzmyzel bewachsenes Agarstück aufgesetzt, die Petrischale mit Parafilm verschlossen und bei 24 °C im Brutschrank inkubiert. Die zu ca. 80% bewachsenen Agarplatten wurden anschließend bei 4 °C gelagert und regelmäßig nach gleichem Verfahren überimpft.

2.6.3 Vorkultur

Für die Vorkulturführung wurde Malzextraktpepton-Medium verwendet. Dazu wurden die einzelnen Medienbestandteile (Tabelle 2.15) eingewogen, mit 1 M NaOH auf pH 5,6 eingestellt und *ad* 1 L aufgefüllt. Je 100 mL des Mediums wurden in 250-mL-Erlenmeyerkolben überführt und mit einem Cellulosestopfen sowie Alufolie verschlossen. Die Sterilisation der Medien erfolgte für 20 min bei 121 °C im Autoklaven.

Ein ca. 1 cm² großes, homogen bewachsenes Agarstück wurde mit Hilfe eines sterilen Spatels in 100 mL des Malzextraktpepton-Mediums überführt und mittels Ultra-Turrax-Dispergiergerät für 30 s bei 10.000 U*min⁻¹ homogenisiert. Die Vorkultur wurde unter Lichtausschluss bei 24 °C im Inkubationsschüttler (150 rpm) inkubiert. Die Vorkulturdauer erfolgte nach Beobachtung der Wachstumsdauer auf der Malzextraktpepton-Agarplatte (MEPA).

2.6.4 Hauptkultur

Die Hauptkulturführung erfolgte in verschiedenen Medien (2.6.7). Je 100 mL Medium wurden in 250-mL-Erlenmeyerkolben überführt, mit einem Cellulosestopfen und Alufolie verschlossen und autoklaviert (20 min, 121 °C). Nach dem Homogenisieren der Vorkultur mittels Ultra-Turrax-Dispergiergerät (30 s, 10.000 U*min⁻¹) wurden für die Hauptkultur jeweils

10 mL der Vorkultur (10% des Hauptkulturmediums) in einen der 250-mL-Erlenmeyerkolben überführt. Die Kulturen wurden auf einem Schüttler unter Lichtausschluss bei 24 °C und 150 rpm 32 Tage lang inkubiert.

2.6.5 Probennahme

In regelmäßigen Abständen wurden steril Proben entnommen und die Esterase-/Lipase-Aktivitäten mittels photometrischer Assays bestimmt. Dazu wurde jeweils 1 mL Probe aus der Submerskultur entnommen und zentrifugiert (14.000 U min⁻¹, 18.000 g, 5 min, 4 °C). Der Überstand wurde abgetrennt und für die jeweiligen Assays eingesetzt. Das Myzel wurde in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend bis zur Isolierung der genomischen DNA sowie der Gesamt-RNA bei -80 °C gelagert.

2.6.6 Kulturernte

Die Ernte der Submerskulturen erfolgte am Tag des Aktivitätsmaximums des jeweiligen Basidiomyceten mittels Filtration über einen Büchnertrichter; dabei wurde der Kulturüberstand in einer Saugflasche aufgefangen und bis zur Weiterverarbeitung bei -20 °C eingefroren. Das Myzel wurde verworfen.

2.6.7 Optimierung der Medienzusammensetzung

Zur Optimierung der Enzymexpression wurden für die Hauptkulturführung verschiedene Nährmedien getestet: Malzextrakt-Sojapepton-Medium (MEP), Standardnährlösung (SNL) und Kartoffel-Glucose-Medium (KG) (Tabelle 2.15, Tabelle 2.16, Tabelle 2.17).

2.6.8 Zusatz geeigneter Induktoren zur Steigerung der Sekretion extrazellulärer Lipasen/Esterasen

Dem Hauptkulturmedium wurden verschiedene Induktoren zur Steigerung der Sekretion extrazellulärer Esterasen bzw. Lipasen zugesetzt. Bei den Induktoren handelte es sich um Fett aus Quark (extrahiert nach Weibull-Stoldt aus Speisequark: 50% Fett i. Tr.), Butterschmalz und Butter (deutsche Markenbutter, mild gesäuert). Dazu wurden dem MEP-Medium vor dem Autoklavieren 0,5% (v/v) des jeweiligen Induktors hinzugefügt.

2.6.9 Maßstabsvergrößerung des Kulturvolumens

Für die Hauptkultur wurde eine Maßstabsvergrößerung des Kulturvolumens von 100 mL auf bis zu 400 mL erforderlich, um hinreichende Mengen an sekretierten Enzymen für die Applikationstests zu erhalten. Die Kultivierung erfolgte analog zu Hauptkultur 2.6.4.

2.6.10 Bestimmung des pH-Werts

Mit Hilfe eines kalibrierten pH-Meters wurde der pH-Wert in den Kulturüberständen unmittelbar nach der Ernte der Hauptkulturen bestimmt.

2.6.11 Bestimmung des Fettgehaltes nach Weibull-Stoldt

Die gut homogenisierte Probe wurde in einem Becherglas eingewogen und mit 150 mL Salzsäure (4 M) versetzt. Des Weiteren wurden einige Glasperlen zugefügt und mit aufgesetztem Uhrglas bis zum Sieden erhitzt. Die Aufschlusslösung wurde mindestens 30 min am schwachen Sieden gehalten. Dabei war darauf zu achten, dass sich das Flüssigkeitsvolumen nicht änderte.

Danach wurde die Aufschlusslösung mit ca. 100 mL heißem Wasser versetzt und durch zwei vorher angefeuchtete Faltenfilter filtriert. Die Filter und der Rückstand wurden sorgfältig unter Nachspülen von Uhr- und Becherglas neutral gewaschen. Nach dem Trocknen der Filter im

Trockenschrank bei 105 °C wurden diese in Extraktionshülsen überführt und mittels Soxtherm-Apparatur, in zuvor konstant gewogenen Kolben, mit Petrolether extrahiert. Im Anschluss an die Extraktion wurde das überschüssige Lösungsmittel durch Trocknen entfernt und der Rückstand bis zum Massenanstieg gewogen.

Aus 50%-igem Speisequark wurde das Fett nach der Homogenisierung mittels Weibull-Stoldt extrahiert, um es Hauptkulturen zuzusetzen (s. 2.6.4).

Die Parameter des Programms für die Extraktion an der Soxtherm-Apparatur sind in Tabelle 2.21 festgehalten.

Tabelle 2.21 Parameter der Fettextraktion

Parameter	Zeit/Temperatur/Intervall
T-Klasse	200 °C
Extraktionstemperatur	150 °C
Absenintervall	4 min
Absenkimpuls	2 s
Kochphase	30 min
Abdestillieren AA	5 x
Extraktionszeit	1 h 30 min
Abdestillieren AB	4 x
Abdestillieren AC	5 min

Der Fettgehalt F [$\text{g} \cdot (100 \text{ g})^{-1}$] wurde nach Gleichung 2.1 berechnet.

$$F = \frac{m_2 - m_1}{E} \cdot 100 \quad (2.1)$$

mit m_1 : Masse des leeren, getrockneten Gefäßes mit Steinchen [g]

m_2 : Masse des Gefäßes mit Steinchen und Fett nach der Trocknung [g]

E : Probeneinwaage [g]

Der Fettgehalt in Trockenmasse errechnet sich nach Gleichung 2.2

$$\text{Fett i. Tr.} = \frac{100 \cdot F}{\text{Trockenmasse}} \quad (2.2)$$

2.7 Charakterisierung der Referenzsubstanz opti-zym z10uc

Als Referenzsubstanz wurde das Enzym opti-zym z10uc von der Firma optiform GmbH zur Verfügung gestellt. Dabei handelte es sich um eine pulverförmige Ziegenlipase. Diese war nicht gefärbt oder gebleicht sowie frei von Konservierungsstoffen und Aromen. Sie wird aus den Drüsen junger Zicklein gewonnen und anschließend versetzt mit Natriumchlorid, Molkenpulver und Milchpulver zum Verkauf angeboten.

Das Referenzenzym wurde in photometrischen Assays sowie elektrophoretischen Methoden eingesetzt.

2.8 Photometrische Assays

2.8.1 Verwendete Puffer und Substratlösungen

Die Zusammensetzungen verwendeter Puffer und Substratlösungen sind in Tabelle 2.22, Tabelle 2.23, Tabelle 2.24, Tabelle 2.25 und Tabelle 2.26 aufgelistet.

Tabelle 2.22 Zusammensetzung des Kaliumphosphatpuffers (80 mM, pH = 7,0)

	Lösung A	Lösung B
Substanz	KH_2PO_4	K_2HPO_4
Molarität [mM]	80	80
Einwaage [g L^{-1}]	10,89	13,93
Volumen [mL] (pH = 7,0)	390	610

Die Herstellung der Lösungen A und B erfolgte separat. Dazu wurden die aufgeführten Chemikalien eingewogen und jeweils in 1 L Reinstwasser gelöst. Durch das Mischen in einem Verhältnis von 39:61 wurde ein pH-Wert von 7,0 eingestellt. Für die länger-kettigen Substrate *p*-Nitrophenylbutyrat, -hexanoat, -octanoat und -valerat wurde dem Puffer 0,5% Triton X-100 zugefügt. Das größere Volumen wurde gegebenenfalls mit Zusatz von

Triton X-100 vorgelegt und der pH-Wert durch Zugabe der zweiten Hauptkomponente eingestellt.

Bei der Herstellung des Hochsalzpuffers zur Proteinreinigung mittels schwachem Anionentauscher war jeweils darauf zu achten, dass Natriumchlorid bereits vor der pH-Wert-Einstellung hinzugegeben wurde.

Der SEC-Puffer bestand aus einem 50 mM Kaliumphosphatpuffer (mit 0,15 M NaCl, pH 7,0). Die zur FPLC verwendeten Puffer wurden zunächst membranfiltriert und im Ultraschallbad entgast (30 min, *degas*).

Tabelle 2.23 Zusammensetzung des Sörensenphosphatpuffers (50 mM, pH = 8,0) (modifiziert nach Gomori *et al.*, 1955)

	Lösung A	Lösung B
Substanz	KH ₂ PO ₄	K ₂ HPO ₄
Molarität [mM]	50	50
Einwaage [g L ⁻¹]	6,81	8,71
Volumen [mL] (pH = 8,0)	90	910
Zusätze		
Natriumdesoxycholat [g L ⁻¹]		2,2
<i>Gummi arabicum</i> [g L ⁻¹]		1,1

Die Herstellung der Lösungen A und B erfolgte separat. Dazu wurden die aufgeführten Chemikalien eingewogen und jeweils in 1 L Reinstwasser gelöst. Durch das Mischen in einem Verhältnis von 9:91 wurde ein pH-Wert von 8,0 eingestellt. Anschließend wurden die Emulgatoren Natriumdesoxycholat und Gummi Arabicum zugefügt und gelöst.

Tabelle 2.24 Zusammensetzung des Tris-HCl-Puffers (100 mM, pH = 6,0)

	Lösung A	Lösung B
Substanz	Tris-HCl	Tris
Molarität [mM]	100	100
Einwaage [g L ⁻¹]	15,76	12,11

Die Herstellung der Lösungen A und B erfolgte separat. Dazu wurden die aufgeführten Chemikalien eingewogen und jeweils in 1 L Reinstwasser gelöst. Zur Lösung A wurde vor Auffüllen *ad* Marke der pH-Wert mit Lösung B gleicher Molarität eingestellt.

Tabelle 2.25 Zusammensetzung des Natriumcarbonatpuffers (100 mM)

	Lösung A	Lösung B
Substanz	Na ₂ CO ₃	NaHCO ₃
Molarität [mM]	100	100
Einwaage [g L ⁻¹]	10,6	8,4

Die Herstellung der Lösungen A und B erfolgte separat. Dazu wurden die aufgeführten Chemikalien eingewogen und jeweils in 1 L Reinstwasser gelöst. Zur Lösung A wurde vor Auffüllen *ad* Marke der pH-Wert mit Lösung B gleicher Molarität eingestellt (x Lösung A + (100 – x) Lösung B).

Tabelle 2.26 Substrate mit jeweiliger Abkürzung und Molarität der Stammlösung für den Esterase- bzw. Lipaseassay

Substanz	Abkürzung	Molarität [mM]	Lösungsmittel
<i>p</i> -Nitrophenylacetat	pNPA	17,5	Ethanol (>95%)
<i>p</i> -Nitrophenylbutyrat	pNPB	17,5	Ethanol (>95%)
<i>p</i> -Nitrophenylhexanoat	pNPH	17,5	Ethanol (>95%)
<i>p</i> -Nitrophenyloctanoat	pNPO	17,5	Ethanol (>95%)
<i>p</i> -Nitrophenylvalerat	pNPV	17,5	Ethanol (>95%)
<i>p</i> -Nitrophenylpalmitat	pNPP	8	Isopropanol

Die Stammlösungen wurden aliquotiert und bei -20 °C gelagert. Am jeweiligen Messtag wurden die Substratlösungen auf die entsprechende Konzentration für den jeweiligen Assay mit dem entsprechenden Puffer verdünnt und eingesetzt.

2.8.2 Esteraseassay nach Purdy und Kolattukudy (1973)

Die Esteraseaktivität wurde anhand der Umsetzung der fünf Substrate *p*NPA, *p*NPB, *p*NPV, *p*NPH und *p*NPO gemessen (Purdy and Kolattukudy, 1973). Dazu wurden jeweils 17,5 mM Substratstammlösungen mit dem entsprechenden Puffer auf eine Endkonzentration von 3,5 mM (1:5) verdünnt. Die Zusammensetzungen der benötigten Kaliumphosphatpuffer (Kaliumphosphatpuffer 80 mM pH 7,0 (1) für das Substrat *p*NPA und Kaliumphosphatpuffer 80 mM pH 7,0 mit 0,5% Triton X-100 (2) für die Substrate *p*NPB, *p*NPV, *p*NPH und *p*NPO) sind in Tabelle 2.22 aufgeführt.

Der jeweilige Puffer wurde in die Kavitäten einer Mikrotiterplatte (96 Well) vorgelegt, die Probe in Dreifachbestimmung zugegeben und die Reaktion durch Zugabe des entsprechenden Substrats (3,5 mM) gestartet (Tabelle 2.26). Zusätzlich zu den Proben wurden Blindwerte mit Puffer anstelle enzymhaltiger Proben mitgeführt. Die Extinktion wurde bei 405 nm und 30°C über einen Zeitraum von 10 min gemessen (Tabelle 2.27).

Tabelle 2.27 Pipettierschema des Esteraseassays

Lösung	Volumen [μ L]
Kaliumphosphatpuffer (80 mM, pH 7,0)	130
<ul style="list-style-type: none"> • bei <i>p</i>NPA ohne Zusatz von Triton X-100 • bei <i>p</i>NPB, <i>p</i>NPV, <i>p</i>NPH, <i>p</i>NPO mit 0,5% Triton X-100 	
Kulturüberstand	20
Substratlösung (3,5 mM)	50

Die Berechnung der Enzymaktivität erfolgte nach Gleichung 2.3

$$A = \frac{\Delta E \cdot V_{\text{Ges}} \cdot F}{V_{\text{Probe}} \cdot \epsilon_{\text{p-Nitrophenol, 405 nm}} \cdot d} \quad (2.3)$$

mit	A:	Enzymaktivität in U L^{-1}
	ΔE :	Extinktionsänderung in min^{-1}
	V_{Ges} :	Gesamtvolumen im Assay in mL
	V_{Probe} :	Volumen des Kulturüberstandes im Assay in mL
	F:	Verdünnungsfaktor
	$\epsilon_{\text{p-Nitrophenol, 405 nm}}$:	Extinktionskoeffizient von <i>p</i> -Nitrophenol bei 405 nm 0,00985 $\text{L } \mu\text{mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Falk Amelung) im Esteraseassay bzw. 0,0183 $\text{L } \mu\text{mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Schüttmann, 2011) im Lipaseassay
	d:	Schichtdicke im Well in cm: 0,64 cm bei 200 μ L Gesamtvolumen bzw. 0,8 cm bei 250 μ L Gesamtvolumen in der 96 Well-Mikrotiterplatte

Ein U entspricht dabei der Enzymmenge, die 1 μmol *p*-Nitrophenylester pro Minute bei pH 7,0 und 30 °C hydrolysiert.

2.8.3 Lipaseassay nach Winkler und Stuckmann (1979)

Die Bestimmung der Lipaseaktivität erfolgte nach (Winkler and Stuckmann, 1979) mit dem Substrat *p*-Nitrophenylpalmitat (*p*NPP). Zur Herstellung der Substratlösung (8 mM) wurde *p*-Nitrophenylpalmitat in Isopropanol für 10 min im Ultraschallbad suspendiert (vgl. Tabelle 2.26). Das suspendierte Substrat wurde anschließend 1:20 mit Sörensenphosphatpuffer (50 mM, pH 8,0) (Tabelle 2.23) versetzt und die Suspension für 10 min ins Ultraschallbad gestellt. Anschließend wurde die Suspension für 10 min bei 37 °C inkubiert. Das Pipettierschema zur Bestimmung der Lipaseaktivität ist in Tabelle 2.28 festgehalten.

Tabelle 2.28 Pipettierschema zur Bestimmung der Lipaseaktivität

Lösung	Volumen [μL]
Kulturüberstand	50
Substratlösung (verdünnt mit Sörensenphosphatpuffer)	200

Die Zugabe der Substratlösung führt zum Start der Reaktion. Die Messung der Extinktionsänderung erfolgte direkt nach Substratzugabe an einem Mikroplattenleser über einen Zeitraum von 10 min bei 405 nm und 37 °C.

Die Berechnung der Enzymaktivität erfolgte nach Gleichung 2.3.

Dabei entspricht 1 U der Enzymmenge, die bei 37 °C und pH 8,0 1 μmol *p*-Nitrophenylpalmitat pro min umsetzt.

2.8.4 Bestimmung der Peptidase-Aktivität mittels Azocasein

Zur Bestimmung der Peptidaseaktivität wurde der Azocaseinassay nach (Kilcawley *et al.*, 2002) durchgeführt. Die Ansätze erfolgten in 1,5 mL-Reaktionsgefäßen (Tabelle 2.29). Dabei wurden 80 μL Kulturüberstand mit 320 μL Azocasein-Reagenzlösung, die zuvor auf 37 °C temperiert wurde, versetzt. Die Azocasein-Reagenzlösung setzte sich aus 240 μL Tris-

HCl-Puffer (100 mM, pH 6,0) und 80 µL einer 0,5%-igen wässrigen Azocasein-Lösung zusammen (Tabelle 2.24). Der Reaktionsansatz wurde bei 37 °C über einen Zeitraum von 15 min inkubiert und das nicht umgesetzte Azocasein anschließend mit 600 µL einer 3%-igen Trichloressigsäure (TCA) gefällt. Direkt im Anschluss wurden die Reaktionsgefäße für 10 min auf Eis gestellt und anschließend für 10 min bei 4 °C und 14.000 rpm (18.000 g) zentrifugiert. Der klare Überstand wurde in 1 cm-Küvetten überführt und die Extinktion bei 366 nm gemessen.

Parallel wurde ein Blindwert mitgeführt, welcher vor Beginn der Reaktion für 15 min in einem siedenden Wasserbad inkubiert wurde, um die Peptidaseaktivität in der Probe zu inaktivieren.

Tabelle 2.29 Pipettierschema zur Bestimmung der Peptidaseaktivität

Lösung	Volumen [µL]
Kulturüberstand	80
Azocasein-Reagenzlösung	320
15 min Inkubation bei 37°C	
3%-ige Trichloressigsäure	600
10 min auf Eis stellen Zentrifugation bei 4°C und 14000 rpm (18000 g) für 10 min Messung des klaren Überstandes bei 366 nm	

Die Peptidaseaktivität errechnete sich nach Gleichung 2.4

$$AU \text{ mL}^{-1} = \frac{\Delta E_{366 \text{ nm}} \cdot 60 \text{ min}}{V_{\text{Kulturüberstand}} \cdot 15 \text{ min} \cdot 0,01} \quad (2.4)$$

Mit AU: Arbitrary Unit
 $\Delta E_{366 \text{ nm}}$: Extinktion (Probe) – Extinktion (Blindwert)
 $V_{\text{Kulturüberstand}}$: 0,08 mL

Dabei entspricht eine Arbitrary Unit (AU) der Enzymmenge, die unter festgelegten Bedingungen eine Extinktionsänderung von 0,01 pro h erzeugt.

2.8.5 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Die Bestimmung der Proteinkonzentration nach (Bradford, 1976) beruht auf der Anlagerung des Triphenylmethanfarbstoffs Coomassie Brilliant Blau-G250 an die kationischen und unpolaren Seitenketten von Aminosäuren. Der kationische Zustand des Farbstoffs wird so in einen anionischen Zustand überführt und die Absorption ändert sich von 450 nm zu 590 nm. Die Absorptionsänderung ist proportional zur Proteinkonzentration (Carl Roth 2013).

Die Durchführung des Assays erfolgte in Mikrotiterplatten am Plattenleser. Die Arbeitslösung Roti-Nanoquant wurde 1:5 mit Reinstwasser verdünnt. Anschließend wurde eine BSA-Stammlösung (BSA = Bovines Serum-Albumin) mit einer Konzentration von $400 \mu\text{g mL}^{-1}$ angesetzt. Aus der Stammlösung wurde die in Tabelle 2.30 aufgeführte Verdünnungsreihe angesetzt.

Tabelle 2.30 Pipettierschema für die Standard-Verdünnungsreihe

BSA [$\mu\text{g mL}^{-1}$]	μL aus BSA-Verdünnung	$\mu\text{L H}_2\text{O}_{\text{dd}}$
0	-	200
3,125	200 aus $6,25 \mu\text{g mL}^{-1}$	200
6,25	200 aus $12,5 \mu\text{g mL}^{-1}$	200
12,5	200 aus $25 \mu\text{g mL}^{-1}$	200
25	200 aus $50 \mu\text{g mL}^{-1}$	200
50	200 aus $100 \mu\text{g mL}^{-1}$	200
100	200 aus $200 \mu\text{g mL}^{-1}$	200
200	200 aus $400 \mu\text{g mL}^{-1}$	200

Für die Messung wurden jeweils $50 \mu\text{L}$ der Proben und der Standard-Verdünnungsreihe in Mikrotiterplatten pipettiert. Anschließend wurden jeweils $200 \mu\text{L}$ der zuvor verdünnten Arbeitslösung Roti[®]-Nanoquant hinzupipettiert. Die Inkubation erfolgte für 10 min bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Extinktionen bei zwei unterschiedlichen Wellenlängen (450 nm und 590 nm) gemessen. Die Auswertung erfolgte über die Auftragung der Quotienten $\text{Extinktion}_{450 \text{ nm}}/\text{Extinktion}_{590 \text{ nm}}$ gegen die bekannten Konzentrationen der BSA-Verdünnungsreihe. Anhand der Kalibriergeraden konnten die Proteinkonzentration der Proben ermittelt werden.

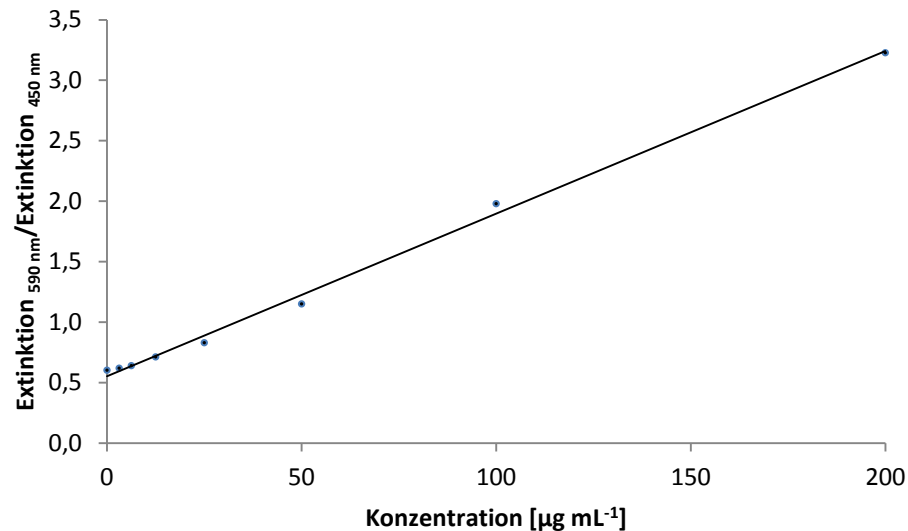


Abbildung 2.1: Kalibriergerade zur Proteinbestimmung mittels Bradford. Gleichung der Regressionsgeraden: $y = 0,0134x + 0,5526$, $R^2 = 0,9969$

2.8.6 Bestimmung des pH-Optimums

Die Bestimmung des pH-Optimums erfolgte mittels gereinigter Enzymlösungen der Basidiomyceten *Pleurotus citrinopileatus* und *Flammulina velutipes*. Dazu wurde der Esterase-Assay (s. 2.8.2) mit den Substraten *p*-Nitrophenylhexanoat und -octanoat durchgeführt. Als Puffer wurden Kaliumphosphat (80 mM)- und Natriumcarbonat-Puffer (100 mM) mit variierenden pH-Werten zwischen 5 und 11 eingesetzt.

2.8.7 Bestimmung des Temperaturoptimums

Zur Bestimmung des Temperaturoptimums wurden der verwendete Puffer sowie der Mikroplattenleser auf die entsprechende Temperatur vortemperiert. Die gereinigten Enzymlösungen der Basidiomyceten *Pleurotus citrinopileatus* und *Flammulina velutipes* wurden im Esterase-Assay (2.8.2) eingesetzt. Durch die Zugabe der Substrate *p*-Nitrophenylhexanoat bzw. -octanoat wurde die Reaktion gestartet. Die Aktivitäten wurden zwischen 25 °C und 65 °C in 5 °C-Schritten gemessen.

2.8.8 Bestimmung der Enzymstabilität

Die Stabilität der gereinigten Enzymlösungen der Basidiomyceten *Pleurotus citrinopileatus* und *Flammulina velutipes* wurden mittels Esterase-Assay (s. 2.8.2) unter Einsatz der Substrate *p*-Nitrophenylhexanoat bzw. -octanoat bestimmt.

2.8.8.1 Bestimmung der Lagerstabilität

Die gereinigten Enzymlösungen wurden aliquotiert und bei 4 °C, -20 °C und -80 °C für 120 Tage gelagert. Die Proben für die Lagerung bei -20 °C und -80 °C wurden mittels flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Aktivitätsbestimmung erfolgte nach 0, 60, 94 und 121 Tagen.

2.8.8.2 Temperaturstabilität

Die Enzymlösungen wurden in Kaliumphosphatpuffer (80 mM, pH 8,5) entsprechend verdünnt und anschließend über einen Zeitraum von 24 h bei 24 °C, 37 °C und 60 °C gelagert. Die Messung der Enzymaktivität erfolgte nach 1 h, 2 h, 4 h und 24 h.

2.8.8.3 Salztoleranz

Zur Bestimmung der Salztoleranz wurden dem Kaliumphosphatpuffer (80 mM, pH 8,5) unterschiedliche Konzentrationen an Natriumchlorid bzw. Ammoniumsulfat (0 bis 1 M) zugesetzt und anschließend die Aktivität bestimmt.

2.8.8.4 Inaktivierung des Enzyms

Für die weitere Verwendung der Molke ist es entscheidend, dass das für den Käseprozess eingesetzte Enzym bei einer bestimmten Temperatur inaktiviert werden kann. Dazu wurde die Enzymlösung in Kaliumphosphatpuffer (80 mM, pH 8,5) entsprechend verdünnt und

anschließen für 30 s bzw. 10 min bei 72 °C inkubiert. Die Aktivitätsmessung erfolgte im Anschluss mittels Esterase-Assay.

2.8.9 Bestimmung der Enzymkinetik

Die Michaelis-Menten-Konstante (K_M), sowie die maximale Umsatzgeschwindigkeit (v_{max}) der gereinigten Enzymlösungen der Basidiomyceten *Pleurotus citrinopileatus* und *Flammulina velutipes* wurden für die Substrate *p*-Nitrophenylhexanoat bzw. -octanoat untersucht. Gemessen wurde die Reaktionsgeschwindigkeit bei konstanter Enzymkonzentration und variierender Substratkonzentration. Durch Auftragung der Reaktionsgeschwindigkeit direkt gegen die Substratkonzentration, konnte eine Hyperbel an die Messpunkte angelegt werden und die Parameter K_M und v_{max} direkt abgelesen werden.

2.9 Proteinbiochemische Methoden

2.9.1 Proteinpräzipitation mittels isoelektrisch fokussierter, präparativer Schaumfraktionierung

Zur Reinigung der Esterasen bzw. Lipasen aus Submerskulturen der Basidiomyceten wurde der enzymhaltige Kulturüberstand zerschäumt. Die Apparatur zum Zerschäumen setzt sich im Wesentlichen aus einer Glasfritte, einer Säule, einem U-Rohr und eine Saugflasche zusammen. Für die Schaumfraktionierung wurde der Kulturüberstand in den unteren Teil einer doppelwandigen Glassäule gefüllt und über die Glasfritte (Porenweite P3: 16 – 40 µm) Druckluft in die Säule eingeleitet. Der aufsteigende, mit Zielenzym beladene Schaum wurde über das U-Rohr in einen Kolben geleitet und durch Anlegen von Vakuum wieder verflüssigt, um das Enzym in konzentrierter Lösung zu erhalten.

Für die Schaumfraktionierung wurden zwei unterschiedliche Glassäulen verwendet. Die Unterschiede lagen in der Länge und in dem Volumen. Der Außendurchmesser (AD) wurde konstant gehalten (Tabelle 2.31).

Tabelle 2.31 Länge, Außendurchmesser (AD) und Volumen der kleinen und der großen Schaumfraktionierungssäule

	Kleine Säule	Große Säule
Länge [cm]	73	88
AD [cm]	5,3	5,3
Volumen [mL]	115	140

In Abbildung 2.2 ist der Aufbau der Schaumfraktionierungsapparatur dargestellt.

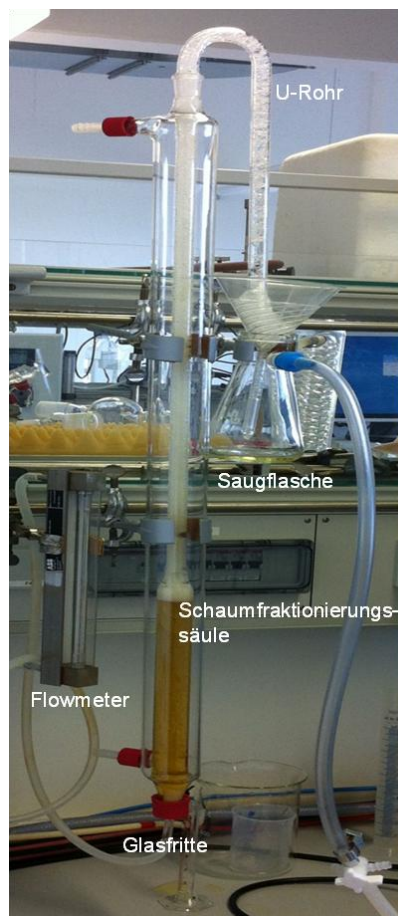


Abbildung 2.2 Aufbau der Schaumfraktionierungsapparatur

Die Bilanzierung der Schaumfraktionierung erfolgte anhand der folgenden Gleichungen (2.5, 2.6 und 2.7) (Linke *et al.*, 2005).

$$\text{Proteinausbeute} = \frac{\text{Masse Protein } (\mu\text{g}) \text{ im Schaum}}{\text{Masse Protein } (\mu\text{g}) \text{ in der Vorlage}} * 100\% \quad (2.5)$$

$$\text{Wiederfindung der Aktivität} = \frac{\text{Aktivität (U) im Schaum}}{\text{Aktivität (U) in der Vorlage}} * 100\% \quad (2.6)$$

$$\text{Anreicherungsfaktor} = \frac{\text{Aktivität (U L}^{-1}\text{) im Schaum}}{\text{Aktivität (U L}^{-1}\text{) in der Vorlage}} \quad (2.7)$$

2.9.2 Proteinpräzipitation mit Ammoniumsulfat

Der jeweilige Kulturüberstand der verschiedenen Basidiomyceten wurde in ein Becherglas überführt und in einem Eisbad unter Rühren mit einer definierten Menge Ammoniumsulfat versetzt. Die Zugabe des Salzes erfolgte in regelmäßigen Abständen in kleinen Portionen. Sobald das Ammoniumsulfat vollständig in Lösung gegangen war, wurde bis zur Einstellung des Gleichgewichts für weitere 2 h gerührt. Anschließend wurden die gefällten Proteine abzentrifugiert (4.000 rpm, 3.283 g, 30 min, 4 °C). Das erhaltene Pellet wurde in einem definierten Volumen Reinstwasser bzw. Puffer aufgenommen und gelöst. Analog wurde bei einer fraktionierten Fällung vorgegangen. Dabei wurde der Überstand nach jeder Sättigungsstufe zentrifugiert und vom Pellet abgetrennt und für die nächste Sättigungsstufe erneut eingesetzt.

2.9.3 Proteinpräzipitation mit Ethanol

Der jeweilige Kulturüberstand der verschiedenen Basidiomyceten wurde in ein Becherglas überführt und in einem Eisbad unter Rühren mit einer definierten Menge des auf -20 °C gekühlten Ethanols (Tabelle 2.32) versetzt. Die Zugabe des Ethanols erfolgte tropfenweise, nach der vollständigen Zugabe wurden die Proben für 2 h bei -20 °C gelagert. Anschließend wurden die gefällten Proteine abzentrifugiert (4.000 rpm, 3.283 g, 30 min, 4 °C). Das erhaltene Pellet wurde in einem definierten Volumen Reinstwasser bzw. Puffer aufgenommen und gelöst.

Tabelle 2.32 Benötigtes Volumen an Ethanol für eine Fällung mit 15 mL Überstand

Ethanolkonzentration [%] (v/v)	Volumen an Ethanol [mL]
10	1,7
20	3,8
30	6,4
40	10,0
50	15,0
60	22,5
70	35,0
80	60,0

2.9.4 Konzentrierung und Umpufferung

Zur Konzentrierung, Umpufferung und zum Entsalzen der entsprechenden Enzympräparation wurden dem Volumen entsprechend Macrosep[®]- Microsep[™]- oder Nanosep[®]-Zentrifugationseinheiten (Pall, Dreieich) mit einer Ausschlussgröße (MWCO) von 10 kDa eingesetzt. Vor der ersten Verwendung wurden die Zentrifugationseinheiten jeweils dreimal mit Reinstwasser konditioniert, indem sie bei 4 °C und 4.000 rpm (3.283 g) zentrifugiert wurden.

Bestandteile mit höheren molekularen Massen als 300 kDa wurden mittels Ultrasette[™] Lab Tangentialflussfiltrationskassette aus dem Kulturüberstand abgetrennt. Um die restliche Probe aus der Filtrationseinheit zurück zu gewinnen, wurde Puffer über den Zulauf angesogen. (Membraneinheit: Omega[™] Membran, modifiziertes Polyethersulfon mit geringer Proteinbindung).

Die Konzentrierung großer Kulturvolumina erfolgte mittels Vivaflow200-Einheit (MWCO 10 kDa) mit einer Polyethersulfon-Membran. Zur Konzentrierung der Probe befanden sich Zulauf und Rücklauf im Probengefäß, während das Filtrat gesondert gesammelt wurde. Die Einheit wurde mit einer Flussrate von 300 mL min⁻¹ solange betrieben, bis die Probe auf das Zielvolumen eingengt war. Die Reinigung der Membran erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

2.9.5 Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC)

Die Reinigung der zuvor gefällten Proteine erfolgte über zwei Reinigungsstufen mittels FPLC (2.5.1, 2.5.2). Zur Zweistufenreinigung wurde die Ionenaustauschchromatographie als 1. Reinigungsstufe und die Größenausschlusschromatographie als 2. Reinigungsstufe eingesetzt.

Als Laufmittel wurden zwei verschiedene Kaliumphosphatpuffer verwendet (Laufpuffer A, 50 mM, pH 7,0 und Laufpuffer B, 50 mM, pH 7,0 mit 1 M NaCl) (Tabelle 2.22). Als Säule diente im ersten Reinigungsschritt eine Diethylaminoethyl Sepharose *Fast Flow* Säule (DEAE-FF). Dabei handelt es sich um einen schwachen Anionenaustauscher. Im zweiten Reinigungsschritt wurden die aktivsten Fraktionen der DEAE-FF-Auftrennung konzentriert, umgepuffert und mittels Größenausschlusschromatographie (SEC) gereinigt. Als Laufmittel wurde ein Kaliumphosphatpuffer (50 mM, pH 7,0 mit 0,15 M NaCl) (Tabelle 2.22) eingesetzt. Die Proteinkonzentration sowie die Esterase- bzw. Lipaseaktivität der einzelnen gesammelten Fraktionen wurden mittels Bradford- und Esterase- bzw. Lipase-Assay (s. 2.8) bestimmt.

2.9.5.1 Anionenaustauschchromatographie (IEX)

Sowohl die mittels fraktionierter Ammoniumsulfatfällung erhaltenen Proteine als auch die direkt eingesetzten, konzentrierten und umgepufferten Kulturüberstände wurden einer Proteinreinigung mittels FPLC-IEX unterzogen (Tabelle 2.33). Zuanfang wurde Tris-HCl-Puffer verwendet, insbesondere zur Gewinnung der Enzympräparate für die Käseherstellung und in Anlehnung an den verwendeten Puffer im Assay wurden Kaliumphosphatpuffer eingesetzt.

Tabelle 2.33 Standardparameter für die Proteinreinigung mittels Ionenaustauschchromatographie (SV: Säulenvolumen)

Ionenaustauschchromatographie	
FPLC	NGC Chromatographie System
Säule	XK 26 (GE Healthcare Life Sciences, Freiburg)
Säulenmaterial	DEAE-FF (Diethylaminoethyl Sepharose <i>Fast Flow</i>)
Säulenvolumen	20 mL/175 mL/140 mL
Startpuffer (A)	50 mM Tris-HCl-Puffer pH 7,0 bzw. 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,0
Elutionsspuffer (B)	50 mM Tris-HCl-Puffer mit 1 M NaCl, pH 7,0 bzw. 50 mM Kaliumphosphatpuffer mit 1 M NaCl, pH 7,0
Flussrate	2 – 4 mL min ⁻¹
Programm	Probenaufgabe Elution: 1 SV: 100% A, 0% B 2 SV: 100% A bis 0% A, 0% B bis 100% B 1 SV: 0% A, 100% B 2 SV: 100% A, 0% B
Detektion	UV-Detektor
Wellenlänge	280 nm
Proben	Kulturüberstand (nach Ammoniumsulfatfällung, konzentriert und auf den Startpuffer umgepuffert)
Probenaufgabe	über Pumpe A (Position 4)
Probenvolumen	10 mL bzw. 90 mL
Fraktionsanzahl	55 bzw. 24
Fraktionsgröße	30 mL

2.9.5.2 Größenausschlusschromatographie (SEC)

Die vereinigten, konzentrierten und umgepufferten IEX-Fractionen wurden mittels SEC weiter gereinigt (Tabelle 2.34).

Tabelle 2.34 Standardparameter für die Proteinreinigung mittels FPLC-SEC (SV: Säulenvolumen)

Größenausschlusschromatographie	
FPLC	Biologic Duo Flow
Säule	HiLoad 16/60 Superdex 200 pg (GE Healthcare Life Sciences, Freiburg)
Säulenmaterial	quervernetzte Agarose + Dextran
Säulenvolumen	24 mL bzw. 120 mL
Elutionspuffer	50 mM Kaliumphosphatpuffer mit 0,15 M NaCl, pH 7,0
Flussrate	0,8 mL min ⁻¹
Programm	Elution: 2 SV
Detektion	UV-Detektor
Wellenlänge	280 nm
Proben	aktivste Fraktionen der 1. Reinigungsstufe (konzentriert und auf den Startpuffer umgepuffert)
Probenaufgabe	100 µL bzw. 1 mL-Probenschleife
Probenvolumen	100 µL – 1 mL (gesamtes Probenkonzentrat)
Fraktionsanzahl	38 bzw. 62
Fraktionsgröße	1 mL bzw. 4 mL

2.9.5.3 Proteinstandards

Mittels Größenausschlusschromatographie ließen sich die molekularen Massen der Probenproteine unter Verwendung eines Proteinstandards (Tabelle 2.35, Abbildung 7.1) bestimmen.

Tabelle 2.35 Komponenten des Proteinstandards der SEC

Protein	Molekülmasse [Da]
Thyroglobulin (Rind)	670.000
γ -Globulin (Rind)	158.000
Ovalbumin (Huhn)	44.000
Myoglobin (Pferd)	17.000
Vitamin B ₁₂	1.350

Der Retentionskoeffizient K_{av} der Proteine wurde nach Gleichung 2.8 berechnet.

$$K_{av} = \frac{V_e - V_0}{V_t - V_0} \quad (2.8)$$

- Mit V_e : Elutionsvolumen des Proteins [mL]
 V_0 : Ausschlussvolumen [mL]
 V_t : Gesamtvolumen der Säule [mL] (120 mL)

Anhand einer graphischen Auftragung der berechneten Retentionskoeffizienten gegen die Logarithmen der molekularen Massen wurde eine Kalibriergerade erstellt (Abbildung 2.3), sodass die molekularen Massen der Probenproteine mittels linearer Regression berechnet werden konnten.

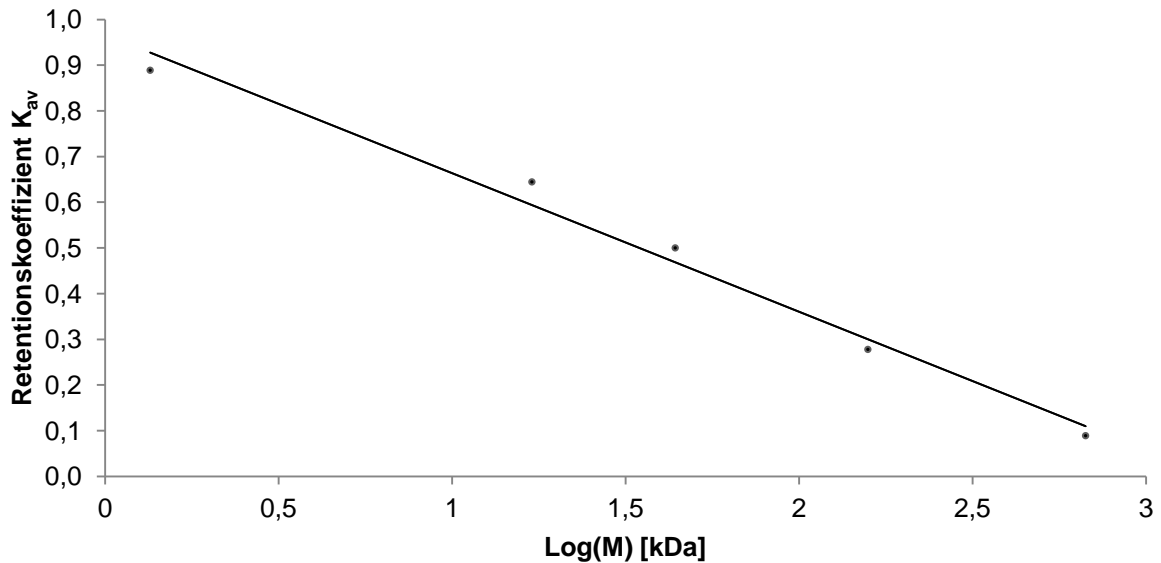


Abbildung 2.3 Auftragung der Retentionskoeffizienten K_{av} gegen die Logarithmen der molekularen Massen der Standardproteine. Gleichung der Regressionsgeraden:
 $y = -0,3032x + 0,9669$, $R^2 = 0,9846$

2.9.6 Proteincharakterisierung mittels HPLC-ESI-MS/MS

Die mittels FPLC gereinigten Fraktionen von *Flammulina velutipes* und *Pleurotus citrinopileatus* mit detektierter Esteraseaktivität wurden am Institut für Anorganische und Analytische Chemie nach Verdau mit Trypsin mittels LC-MS/MS mit Elektrospray-Ionisation (ESI) sequenziert.

2.9.6.1 Proteinverdau aus den Fraktionen der FPLC

Für den Verdau der Proteine wurde die Proteinlösung zunächst mit RapiGest™ SF versetzt (auf 15 µg Protein etwa 10 µL). Die Lösung wurde für 20 min auf 80 °C erhitzt und anschließend auf Raumtemperatur abgekühlt. Daraufhin wurden 5 µL einer 10 mM Dithiothreitol-Lösung dazugegeben, für 20 min auf 60 °C erhitzt und anschließend wieder auf Raumtemperatur abgekühlt. Im Anschluss wurden 5 µL einer 200 mM Iodacetamid-Lösung zugefügt und für 30 min bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss inkubiert. Zuletzt wurden 1,5 µL Trypsin (1 µg µL⁻¹) dazugegeben und bei 37 °C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Proteine mittels ZipTip®-Pipettenspitzen gereinigt und konzentriert.

2.9.6.2 Proteinverdau aus den ausgeschnittenen Gelbanden

Die entsprechenden Banden wurden mit einem sterilen Skalpell aus einem halbnativen SDS-PAGE-Gel ausgeschnitten und jeweils in ein zuvor autoklaviertes 1,5 mL-Reaktionsgefäß überführt. Zum Entfärben der Banden wurden diese zweimal für ca. 15 min mit Wasser gewaschen. Im Anschluss wurde 50%-iger Ethanol auf die Bande gegeben und für 30 min auf einem Schüttler gewaschen. Das Ethanol wurde durch eine 50%-ige Methanol-Lösung ersetzt.

Die Banden wurden mit jeweils 400 µL Acetonitril (100%) versetzt und 20 min geschüttelt. Anschließend wurde der Überstand abgenommen und in einer Vakuumzentrifuge für 15 min getrocknet. Es wurden 200 µL einer 10 mM DTT-Lösung zugefügt und für 45 min bei 55 °C inkubiert. Der Überstand wurde abgenommen und es wurden 200 µL einer 55 mM Iodacetamid-Lösung zugefügt und für 30 min unter Lichtausschluss inkubiert. Das Iodacetamid wurde entfernt und die Bande mit 400 µL einer Waschlösung (bestehend aus 50% (v/v) Acetonitril in 25 mM NH_4HCO_3) versetzt und für 15 min bei Raumtemperatur geschüttelt. Dieser Schritt wurde zweimal wiederholt. Anschließend wurden die Banden dehydriert, indem 400 µL Acetonitril (100%) für 10 min hinzugefügt wurden und nach Abnehmen des Überstandes in einer Vakuumzentrifuge für 15 min getrocknet wurde. Die Banden wurden mit jeweils 100 µL einer 0,5 mM Trypsin-Lösung in 25 mM NH_4HCO_3 für eine Stunde auf Eis inkubiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Banden mit 75 µL 25 mM NH_4HCO_3 überdeckt. Die Banden wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Banden wurden mit 50 µL einer 5%-igen Ameisensäurelösung für 15 min bedeckt, anschließend wurden 50 µL Acetonitril (100%) hinzugefügt und weitere 15 min auf einem Schüttler extrahiert. Die Lösung wurde abgenommen und mit dem zuvor abgenommenen Überstand vereint. Dieser Schritt wurde wiederholt. Der Überstand wurde für 1,5 h in einer Vakuumzentrifuge getrocknet. Der Rückstand wurde in 30 µL einer 3%-igen Acetonitril-Lösung aufgenommen.

2.9.6.3 ZipTip® Pipettenspitzen zum Konzentrieren und Reinigen von Proben für die Massenspektrometrie

Zum Ansäuern der Probe wurde diese mit 1 µL Ameisensäure versetzt. Eine ZipTip®-Pipette wurde mit 10 µL Acetonitril (100%) benetzt (5-mal). Anschließend wurde die ZipTip®-Pipette mit 10 µL 0,1%-iger TFA-Lösung equilibriert (5-mal). Die Säule wurde wie folgt beladen: 10 µL der angesäuerten Analytlösung wurden 10-mal aufgezogen und in dasselbe Eppendorf-Cap wieder abgeben. Mit einer 0,1 %-igen TFA-Lösung wurden Verunreinigungen von der Säule gespült (3-mal). Der Analyt wurde mit Acetonitril/H₂O (1:1) (1% FA) von der Säule eluiert (3-mal mit 5 µL) und in ein neues Eppendorf-Cap geben. Wiederholung der Prozedur (3-mal): Die Pipettenspitze wurde dazu 5-mal mit 10 µL Acetonitril/H₂O (1:1) und 5-mal mit Acetonitril (100%) gespült und der Vorgang ab dem Equilibrieren der Säule mit 0,1%-iger TFA-Lösung fortgeführt.

2.9.6.4 Analyse mittels HPLC-ESI-MS/MS

Der tryptische Verdau in den Fraktionen erfolgte mittels Trypsin als Protease nach einem Protokoll von Waters. Nach dem Verdau wurden die Proteine mittels ZipTip®-Pipettenspitzen (Merck KGaA Darmstadt, Deutschland) gereinigt und konzentriert. Die Peptid-Mischung wurde anschließend unter Vakuum getrocknet und in Wasser mit 3% Acetonitril und 0,1% Ameisensäure resuspendiert. Die Messung erfolgte mittels Nano-ESI-MS/MS an einem UltiMate™ 3000 System von Dionex mit einer Kinetex C18-Säule (Phenomenex, 2,6 µm, 100 Å, i.d. 2,1 mm, Länge 100 mm) gekoppelt an ein Q *Exactive Orbitrap* Massenspektrometer (Thermo Fisher Scientific GmbH, Bremen, Germany). Es wurde ein Mehrstufengradient beginnend mit 2% Eluent B (Eluent A: Wasser, 5% Acetonitril und 0,1% Ameisensäure; Eluent B: Acetonitril, 5% Wasser und 0,1% Ameisensäure) verwendet. In 79 Minuten wurde der Eluent B von 2% auf 40% erhöht. Anschließend wurde der Eluent B in 5 min auf 50%, dann in 3 min auf 98% erhöht und für weitere 8 min bei 98% gehalten. Dann wurde der Gradient in 3 min auf 2% Eluent B heruntergefahren. Die Flussrate während der Messung betrug 0,25 mL min⁻¹. Die MS-Datenerfassung erfolgte in einem Massenbereich von *m/z* 350-1.800 bei einer Auflösung von 140.000 bei *m/z* 200. Die zehn größten Peaks wurden mittels *higher-energy collision dissociation* (HCD) fragmentiert, dabei wurde eine *dynamic exclusion* von 15 s gewählt, damit nicht dieselben Peaks fragmentiert wurden. Die Datenauswertung erfolgte mittels Proteome Discoverer™ 1.4 (Thermo Fisher Scientific GmbH, Bremen, Germany).

2.10 Elektrophoretische Methoden

2.10.1 Probenvorbereitung

Zum Konzentrieren, Entsalzen und Umpuffern der FPLC-Fractionen wurden diese zunächst mit Hilfe von Amicon Ultra-0,5-Centrifugal Filter Devices 10K (MWCO 10 kDa) nach den Angaben des Herstellers konzentriert und umgepuffert (s. 2.9.4).

2.10.2 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur SDS-PAGE (Laemmli, 1970) wurden Gele bestehend aus Sammel- und Trenngel gegossen (Tabelle 2.36). Die Acrylamid-Konzentration betrug im Sammelgel 6% und im Trenngel 12%. Gele der halbnativen und denaturierenden SDS-PAGE unterschieden sich lediglich in der Zusammensetzung von Lower Tris- und Upper Tris-Puffer (Tabelle 2.39, Tabelle 2.40). Weiterhin wurden zur SDS-PAGE Probenauftragspuffer und Laufpuffer eingesetzt (Tabelle 2.37, Tabelle 2.38).

Tabelle 2.36 Zusammensetzung des Sammelgels und Trenngels

Chemikalie	Sammelgel (6%)	Trenngel (12%)
H ₂ O	1,8 mL	2,7 mL
Upper Tris (pH=6,8)	750 µL	-
Lower Tris (pH=8,8)	-	1,5 mL
Rotiphoerese [®] Gel 40	450 µL	1,8 mL
APS	10 µL	15 µL
TEMED	4 µL	7,5 µL

Tabelle 2.37 Zusammensetzung des Probenauftragspuffers

Chemikalie	Menge (halbnativ)	Menge (denaturierend)
1 M Tris-HCl, pH = 6,8	1,0 mL	1,0 mL
SDS-Lösung (20%)	1,0 mL	2,0 mL
Bromphenolblau	20,0 mg	20,0 mg
Glycerol	2,2 mL	2,2 mL
Wasser (reinst)	<i>ad</i> 8,0 mL	<i>ad</i> 8,0 mL

Tabelle 2.38 Zusammensetzung des Laufpuffers

Chemikalie	Menge (halbnativ)	Menge (denaturierend)
Tris	30,3 g	30,3 g
Glycin	144,2 g	144,2 g
SDS	5,0 g	10,0 g
Wasser (reinst)	<i>ad</i> 1 L	<i>ad</i> 1 L

Zur Verwendung bei der Elektrophorese wurden die Laufpuffer 1:10 verdünnt.

Tabelle 2.39 Zusammensetzung des Lower-Tris-Puffers

Chemikalie	Menge (halbnativ)	Menge (denaturierend)
Tris	181,7 g	181,7 g
SDS	2,0 g	4,0 g
Wasser (reinst)	<i>ad</i> 1 L	<i>ad</i> 1 L

Der Lower-Tris-Puffer wurde mit 1 M NaOH auf einen pH von 8,8 eingestellt.

Tabelle 2.40 Zusammensetzung des Upper-Tris-Puffers

Chemikalie	Menge (halbnativ)	Menge (denaturierend)
Tris	60,55 g	60,55 g
SDS	2,00 g	4,00 g
Wasser (reinst)	<i>ad</i> 1 L	<i>ad</i> 1 L

Der Upper-Tris-Puffer wurde mit 1 M NaOH auf einen pH von 6,8 eingestellt.

Tabelle 2.41 Zusammensetzung der Ammoniumperoxodisulfat-Lösung (APS)

Chemikalie	Menge
Ammoniumperoxodisulfat	400 g
Wasser (reinst)	<i>ad</i> 1 L

Die Lösung wurde aliquotiert und bei -20°C gelagert.

Tabelle 2.42 Zusammensetzung der Dithiothreitol-Lösung (DTT)

Chemikalie	Menge
Dithiothreitol	154,25 g
Wasser (reinst)	<i>ad</i> 1 L

Die Lösung wurde aliquotiert und bei -20°C gelagert.

2.10.2.1 Denaturierende SDS-PAGE

Das Trenngel wurde nach Tabelle 2.36 zusammenpipettiert und nach dem Gießen mit Ethanol überschichtet. Anschließend wurde das Ethanol abgegossen und das Sammelgel hergestellt (Tabelle 2.36), welches über das Trenngel gegossen wurde. Ein Kamm mit 10 – 15 Taschen wurde eingesetzt.

Das auspolymerisierte Gel wurde in die Elektrophoresekammer von Bio-Rad Laboratories GmbH eingeklemmt und diese mit 1:10 verdünntem Laufpuffer bis zur vollständigen Bedeckung des Gels befüllt. Anschließend wurde der Kamm aus dem Gel entfernt und die Geltaschen mit Laufpuffer gespült. 15 µL Probe wurden vor dem Auftragen mit 5 µL eines denaturierenden Probenauftragspuffer und 3 µL einer 1 M DTT-Lösung versetzt und für 10 min im siedenden Wasserbad denaturiert. Anschließend wurden die Proben auf Eis abgekühlt und in die Geltaschen pipettiert. Als Marker wurden 10 µL des PageRuler Unstained Protein Ladder der Firma Life Technologies GmbH verwendet. Zur Auftrennung wurde zunächst eine Spannung von 10 mA pro Gel angelegt. Nach dem Übergang der Proteine vom Sammel- in das Trenngel, wurde die Spannung auf 20 mA pro Gel erhöht. Sobald der Farbstoff des Probenauftragspuffers aus dem Gel hinauslief, wurde die Elektrophorese beendet. Anschließend wurden die Gele aus der Kammer genommen und in eine entsprechende Färbelösung gelegt (s. 2.10.5).

2.10.2.2 Halbnative SDS-PAGE

Im Gegensatz zur denaturierenden SDS-PAGE wurden die Proben für die halbnative SDS-PAGE nicht in einem siedenden Wasserbad denaturiert. Die Proben wurden nicht mit DTT versetzt und es wurde ein halbnativer Probenauftragspuffer eingesetzt. Die Trennung erfolgte analog zu 2.10.2.1. Jede Probe wurde zweimal auf dem Gel aufgetragen, um das Gel nach der elektrophoretischen Trennung in der Mitte teilen zu können, sodass sowohl eine Coomassiefärbung als auch eine Aktivitätsfärbung durchgeführt werden konnte (s. 2.10.5).

2.10.2.3 Native PAGE

Für die native PAGE wurden fertige Polyacrylamidgele (Acrylamidkonzentration 3-12%, Quervernetzungskonzentration 2,6%, 1 mm Schichtdicke) verwendet. Die Durchführung der PAGE erfolgte gemäß den Herstellerangaben. Pro Tasche wurden 5 µg Protein aufgetragen. Leere Taschen wurden mit Probenauftragspuffer beladen. Als Marker wurden 5 µL des Serva Native Marker Liquid Mix verwendet. Die Elektrophoresebedingungen der Native PAGE sind in Tabelle 2.43 festgehalten. Die Elektrophorese wurde unter Kühlung mittels eines Minichillers® bei 4 °C durchgeführt.

Tabelle 2.43 Elektrophoresebedingungen der nativen PAGE

Zeit [min]	Spannung [V]
30	50
120	200

Jede Probe wurde zweimal auf das Gel aufgetragen, um das Gel nach der elektrophoretischen Trennung in der Mitte teilen zu können, sodass sowohl eine Coomassiefärbung als auch eine Aktivitätsfärbung durchgeführt werden konnten (s. 2.10.5).

2.10.3 Isoelektrische Fokussierung (IEF)

Für die IEF wurden fertige Polyacrylamidgele mit immobilisiertem pH-Gradienten (pH 3-10) und einer Schichtdicke von 1 mm verwendet. Die SERVAGel™ der Firma Serva Electrophoresis GmbH wurden in die Elektrophoresekammer (PEQ Lab Biotechnologie GmbH) eingespannt und laut Herstellerangaben vorbereitet und die isoelektrische Fokussierung durchgeführt. Zur Probenvorbereitung wurden 20 µL der verschiedenen konzentrierten Enzymlösungen mit 10 µL Probenauftragspuffer (IEF *sample buffer* (2x) der Firma SERVA) versetzt und anschließend in die Taschen des Gels pipettiert. Als Marker wurden 5 µL des SERVAGel™ IEF Markers verwendet. Die Bedingungen der IEF sind in Tabelle 2.44 festgehalten. Die Elektrophorese wurde unter Kühlung mittels eines Minichillers® bei 4 °C durchgeführt.

Tabelle 2.44 Elektrophoresebedingungen der isoelektrischen Fokussierung

Zeit [min]	Spannung U [V]
60	50
60	200
30	500

Jede Probe wurde zweimal auf das Gel aufgetragen, um das Gel nach der elektrophoretischen Trennung in der Mitte teilen zu können, sodass sowohl eine Coomassiefärbung als auch eine Aktivitätsfärbung durchgeführt werden konnten (s. 2.10.5).

2.10.4 Agarose-Gelelektrophorese

Nach Beendigung der PCR (s. 2.13.6) wurden die erhaltenen Produkte mittels Agarosegel-Elektrophorese aufgetrennt (McDonnell *et al.*, 1977; Southern, 1979). Die Konzentration des Gels war dabei von der Größe der zu trennenden DNA-Fragmente abhängig. Fragmente > 2 kb wurden in 1 – 1,5%-igen Gelen und < 2 kb wurden in 1,5 – 3%-igen Gelen aufgetrennt. In Tabelle 2.45 ist die Zusammensetzung des für die Elektrophorese eingesetzten 50x TAE-Puffers aufgeführt.

Tabelle 2.45 Zusammensetzung des 50-fachen TAE-Puffers

Komponente	Konzentration
Tris-Base	242,0 g L ⁻¹
0,5 M EDTA, pH 8	100,0 mL L ⁻¹
Essigsäure	57,1 mL L ⁻¹

Vor der Verwendung wurde der Puffer 1:50 mit Reinstwasser verdünnt (1x TAE-Puffer). Die entsprechende Menge Agarose wurde eingewogen und in 1x TEA-Puffer suspendiert. Für kleine Gele wurden 56 mL und für große Gele 168 mL benötigt. Die Suspension wurde in der Mikrowelle bis zum vollständigen Lösen der Agarose erhitzt. Anschließend wurde die Lösung auf einem Rührer gerührt und auf ca. 60 °C abgekühlt, um sie dann in einen Gelschlitten zu gießen. Nach dem Gießen wurde ein Kamm eingesetzt. Nach ca. 30 Minuten war das Gel ausgehärtet und konnte mit 1x TAE-Puffer überschichtet werden. Die Proben der

analytischen PCR wurden mit 1 μ L Midori Green Direct versetzt und direkt auf das Gel aufgetragen. Bei den Proben der präparativen PCR wurde nur eine Probe mit dem Farbstoff, alle anderen wurden ohne Farbstoff, dafür 1:10 mit 10x DNA-Ladepuffer (Tabelle 2.46) versetzt, aufgetragen und anhand der gefärbten Fragmente die entsprechende Bande ausgeschnitten.

Tabelle 2.46 10x DNA-Ladepuffer

Komponente	Menge
Bromphenolblau	25 mg
EDTA 0,5 M	200 μ L
Glycerol	3,5 mL
SDS 10%	500 μ L
Xylencyanol	25 mg
Reinstwasser	<i>ad</i> 10 mL

Abhängig von der Gelgröße wurde für die Elektrophorese eine Spannung zwischen 80 und 120 V angelegt. Mit Hilfe eines Größenstandards (100 bp DNA extended DNA-Leiter für PCR-Amplifikate; 1 kbp DNA-Leiter für Restriktionsverdau, Carl Roth) konnten die Größen der DNA-Fragmente abgeschätzt werden. Die Gele wurden mittels der Anlage DeVision DBOX (Decon Science Tec., Hohengandern), ausgestattet mit einem UV-Transilluminator (312 nm), einer Kamera und der Software DeVision G Vers. 2.0 betrachtet und dokumentiert.

2.10.5 Gelfärbung

Denaturierende SDS-PAGE-Gele wurden mittels kolloidaler Coomassie- bzw. Coomassie-Färbelösung gefärbt. Halbnative SDS-PAGE-Gele und IEF-Gele wurden in zwei Teile geteilt, um sowohl eine Färbung mit kolloidalem Coomassie bzw. Coomassie-Färbelösung als auch eine Esteraseaktivitätsfärbung durchführen zu können. Zur Dokumentation wurden die gefärbten Gele eingescannt.

2.10.5.1 Färbung mit kolloidaler Coomassie

Zur Färbung der Proteinbanden wurde das Gel in eine kolloidale Coomassie-Färbelösung (Kang *et al.*, 2002) gelegt (Tabelle 2.47). Während SDS-PAGE-Gele über Nacht auf dem Orbitalschüttler inkubiert wurden, war zur Färbung der IEF-Gele eine Inkubation von 30 min ausreichend. Anschließend wurden die Gele vor der Dokumentation zur Entfärbung des Hintergrundes in Reinstwasser gelegt.

Tabelle 2.47 Zusammensetzung der kolloidalen Coomassie-Färbelösung

Chemikalie	Menge
Aluminiumsulfat-Hydrat	50,0 g
Ethanol	100,0 mL
Coomassie Brilliant Blue G-250	0,2 g
ortho-Phosphorsäure 85%	23,5 mL
Wasser (reinst)	<i>ad</i> 1 L

Zunächst wurde das Aluminiumsulfat-Hydrat in Wasser gelöst und das Ethanol dazugeben. Nach Zugabe von Coomassie Brilliant Blue G-250 wurde die Lösung über Nacht gerührt und zum Lichtschutz mit Alufolie umwickelt. Am nächsten Tag wurde die Phosphorsäure zugegeben.

2.10.5.2 Färbung mittels Coomassie-Färbelösung

Vor der Färbung mit Coomassie-Färbelösung wurden die im Gel befindlichen Proteine zunächst mit Fixierlösung (Tabelle 2.48) fixiert, anschließend über Nacht mit Coomassie-Färbelösung (Tabelle 2.49) gefärbt und das Gel schließlich mittels Entfärbelösung (Tabelle 2.50) entfärbt. Um Reste der Färbereagenzien zu entfernen, wurden die Gele vor der Dokumentation in Reinstwasser gelegt.

Tabelle 2.48 Zusammensetzung der Fixierlösung

Chemikalie	Menge
Ethanol	500 mL
Essigsäure	100 mL
Wasser (reinst)	<i>ad</i> 1 L

Tabelle 2.49 Zusammensetzung der Coomassie-Färbelösung

Chemikalie	Menge
Ethanol	400 mL
Essigsäure	100 mL
Coomassie Brilliant Blue R-250	290 mg
Wasser (reinst)	ad 1 L

Tabelle 2.50 Zusammensetzung der Entfärbelösung

Chemikalie	Menge
Ethanol	250 mL
Essigsäure	80 mL
Wasser (reinst)	ad 1 L

2.10.5.3 Esteraseaktivitätsfärbung

Für die Aktivitätsfärbung wurden zwei Färbelösungen eingesetzt, welche getrennt voneinander hergestellt und auf Eis gelagert wurden (Tabelle 2.51). Das Gel wurde zunächst in Lösung 1 gelegt und sofort mit Lösung 2 überdeckt. Anschließend folgte die Färbung für maximal 30 min auf einem Orbitalschüttler bei 20 rpm. Um Reste der Färbereagenzien zu entfernen, wurden die Gele vor der Dokumentation in Reinstwasser gelegt. Die Färbung wurde für halbnative SDS-Gele und IEF-Gele angewandt.

Tabelle 2.51 Lösungen zur Esteraseaktivitätsfärbung

	Substanz	Menge
Lösung 1	<i>Fast Blue RR</i>	50 mg in 100 mL Kaliumphosphatpuffer (80 mM, pH7,0)
Lösung 2	α -Naphthylacetat bzw. -butyrat	10 mg in 1 mL Aceton

2.11 Käseherstellung

2.11.1 Applikationstests an Käse

In Kooperation mit dem Projektpartner optiform GmbH wurden Applikationstests an Käse durchgeführt. Diese wurden an der Molkereischule des LAZBW (Landwirtschaftlichen Zentrum Baden-Württemberg) in Wangen (Applikationstest 1 bis 3) und in den Produktionsräumen der optiform GmbH (Applikationstest 4 bis 7) durchgeführt. Eingesetzt wurden pro Probe jeweils 10 L bzw. 3 L Milch. Insgesamt wurden jeweils bis zu sechs verschiedene Testkäse der Sorte Weichkäse vom Typ Feta hergestellt. Dazu wurde frische Vollmilch (Stich Feinkäserei GmbH, frische Vollmilch, 3,5% Fett, pasteurisiert, homogenisiert) mit Sahne auf einen Fettgehalt von 4,2% eingestellt, ein definiertes Volumen in Versuchswannen überführt und auf 33 °C temperiert. Daraufhin erfolgte die Zugabe der Milchsäurebakterien-Kultur Lyofast M036L sowie die Zugabe der entsprechenden Lipase. Als Referenz diente eine Produktion ohne Zugabe von Lipasen und je ein Standard mit Ziegenlipase opti-zym z10uc und Piccantase® KLC, einer rekombinanten prägastrischen Esterase der Firma DSM. Anschließend begann die Vorreifezeit für insgesamt 45 min. Nach Ablauf der Vorreifezeit wurden versetzt in Zeitabständen von 5 min Calcium (opti-calc) und Lab (Mikrolab: opti-lase, 220 IMCU) zu den einzelnen Versuchswannen hinzugefügt. Darauf folgten die Gerinnungszeit sowie die Dickungszeit. Nach der Dicklegung der Milch folgte das Schneiden der Gallerte mit Käseharfen in ca. haselnussgroße Bruchstücke. Der Bruch wurde in regelmäßigen Abständen mit der Hand verzogen und nach dem Austritt der Molke in entsprechende, vorgewärmte Formen überführt. Die Formen wurden zum gleichmäßigen Austreten der Molke in regelmäßigen Abständen gewendet. Anschließend erfolgte das Einlegen der Käse in ein Salzbad (20%-ig, pH 5,2 eingestellt mit 80% Milchsäure) sowie das Abtropfen.

Nach 24 h wurden die Käse für 1 min in ein Natamycin-Tauchbad (opti-cid) getaucht und ebenfalls zum Abtropfen gestellt. Je Versuchswanne und -bedingung konnten zwei Formen mit Käsebruch abgefüllt werden, woraus zwei ca. 200 g schwere Fetalaibe entstanden, die geviertelt, in Folie eingeschweißt und entsprechend eingelagert wurden. Das Versuchsprotokoll wurde so angepasst, dass geschmacklich einwandfreie Referenzkäse hergestellt werden konnten, die wiederum eine Beurteilung der anderen Proben und des Effekts der unterschiedlichen Lipasen ermöglichten.

Die Reifezeit betrug 30 d bei 10 bis 15 °C, anschließend wurden die Proben für weitere 12 Wochen bei 4 °C gelagert. Über den Reifungs- und Lagerungszeitraum hinweg wurden

die generierten Käsespezialitäten jeweils im Vergleich zu mit dem Referenzprodukt Ziegenlipase hergestellten Käse sensorisch beurteilt. Begleitend erfolgte eine umfassende instrumentell-analytische Charakterisierung der durch die Lipasen freigesetzten Fettsäuren. Die produzierten Käse wurden mittels Festphasenmikroextraktion (SPME) in Kopplung mit der gaschromatographischen Analyse mit massenspektrometrischer Detektion auf die Anwesenheit von freien Fettsäuren hin untersucht. In Tabelle 2.52 sind die verwendeten Zusätze während des Käsereiprozesses und in Tabelle 2.53 sind die verwendeten Organismen und die Reinigung der Enzyme für den Einsatz im Käsereiprozess aufgeführt.

Tabelle 2.52 Verwendete Zusätze während des Käsereiprozesses

Substanz	Charge/MHD	Menge
Lyofast M036L	C145779A;02/2018	1 Beutel mit 1UC 100 L ⁻¹ Milch in 0,5 L physiologischer Kochsalzlösung (0,9% + 4,5 g NaCl) aufgelöst und 15 mL (= 0,03 UC 3 L ⁻¹ Milch) pipettiert
opti-calc	OK160905010120	Je 0,3 mL (= 10 ml 100 L ⁻¹ Milch) in Falcon abgefüllt, mit 20 mL H ₂ O _{dest} aufgefüllt. Zugabe gemeinsam mit Kultur zur Milch
Mikrolab: opti-lase, 220 IMCU	22MC171016; 10/2017	Je 0,51 mL (= 17 ml 100 L ⁻¹ Milch) in Falcon abgefüllt, mit 20 mL H ₂ O _{dest} aufgefüllt
opt-izym z10uc	A015897A; 05/2017	1 g Lipase in 25 mL H ₂ O _{dest} gelöst und 2,63 ml (= 0,35 g 10 L ⁻¹ Milch) pipettiert
Natamycin: opti-cid	010320160203; 03/02/2018	Dosage 1000 ppm = 2 g Natamycin-Pulver in 1 L Wasser gelöst (Fetalaibe werden nach dem Trocknen und Schneiden in Natamycin-Tauchbad getaucht (1 min) und anschließend nochmal getrocknet)

Tabelle 2.53 Verwendete Organismen und Reinigung der Enzyme für den Einsatz im Käseprozess

Organismus	Abk.	Reinigung	Dosierung 10 L ⁻¹ Milch
1. Applikationstest			
<i>Lentinus squarrosulus</i>	LSQU	Ultrafiltration	0,2 g; 0,5 g
<i>Auricularia fuscusuccinea</i>	AFU		0,2 g; 0,5 g
2. Applikationstest			
<i>Flammulina velutipes</i>	FVE-F	Ultrafiltration	0,2 g; 0,5 g
<i>Pleurotus citrinopileatus</i>	PCI		0,2 g; 0,5 g
3. Applikationstest			
<i>Pleurotus citrinopileatus</i>	PCI	mittels Schaum- fraktionierung	50 mL 100 mL 150 mL
Organismus	Abk.	Reinigung	Dosierung 3 L ⁻¹ Milch
4. Applikationstest			
<i>Pleurotus eryngii</i>	PER	FPLC	4 mL
<i>Flammulina velutipes</i>	FVE-D		6 mL
5. Applikationstest			
<i>Flammulina velutipes</i>	FVE-D	Ammoniumsulfatfällung	50 mL
<i>Pleurotus citrinopileatus</i>	PCI		50 mL
6. Applikationstest			
<i>Pleurotus flabellatus</i>	PFLA	Ammoniumsulfatfällung	50 mL
<i>Lycoperdon pyriforme</i>	LYP		50 mL
7. Applikationstest			
<i>Flammulina velutipes</i>	FVE-D	Ammoniumsulfatfällung	20 mL
		Ethanol-fällung	7 mL
<i>Pleurotus citrinopileatus</i>	PCI	Ammoniumsulfatfällung	5 mL 10 mL

2.11.2 Sensorische Beurteilung der hergestellten Testkäse

Die Verkostungen der hergestellten Käselaibe (s. 2.11.1) fanden sowohl am Institut für Lebensmittelchemie und -biotechnologie der JLU Gießen als auch bei der Firma optiform GmbH statt. Insgesamt nahmen 3 - 10 Personen teil. Die wahrgenommenen sensorischen Eindrücke wurden in Aussehen (Farbe), Geruch, Geschmack und Textur (Konsistenz) unterteilt. Für eine möglichst einheitliche Bewertung der Proben wurde den Teilnehmern eine Tabelle mit möglichen sensorischen Merkmalseigenschaften für Feta-Käse zur Verfügung gestellt (Tabelle 2.54). Die Verkostungen der Proben erfolgten in insgesamt vier Runden: Runde 1: Lagerung des Käses für 30 Tage bei 13 °C; Runde 2: Lagerung des Käses für 30 Tage bei 13 °C + 4 Wochen bei 4 °C; Runde 3: Lagerung des Käses für 30 Tage bei 13 °C + 8 Wochen bei 4 °C; Runde 4: Lagerung des Käses für 30 Tage bei 13 °C + 12 Wochen bei 4 °C.

Tabelle 2.54 Mögliche sensorische Merkmalseigenschaften für Feta-Käse

Aussehen (Farbe)	Geruch	Geschmack	Textur (Konsistenz)
weiß	neutral (leer, fade, dumpf)	neutral (geschmacklos, mild, leer, fade, dumpf)	kompakt (fest, zäh, hart)
cremefarben	intensiv	intensiv	weich (randweich)
elfenbeinfarben	aromatisch	aromatisch	geschmeidig (cremig)
gelb	sauer (säuerlich, essigsauer)	pikant (kräftig, würzig, herzhaft)	elastisch (gummiartig)
mattgelb	scharf	räß (streng)	batzig (klebrig, pappig, schmierig, speckig)
mattglänzend	milchig	salzig (salzscharf)	glatt (rau, schwammig)
marmoriert	sahnig	scharf (beißend, stechend, pfeffrig)	wachsartig
gleichmäßig	süßlich (malzig)	sauer (molkensauer)	körnig (feinsandig, tonig, kreidig)
einheitlich	gärig (gasig, hefig)	süßlich (malzig)	mürbe (bröselig)
zweifärbig	muffig (stinkig, fischig)	bitter (molkenbitter)	brüchig, mehlig)
weißfleckig	seifig	herb	inhomogen
	ranzig	ammoniakalisch	fettig
	bockig (Ziegenbock, Kuhstall, Silage)	metallisch	
	buttrig (Butteraroma)	alt	
	schweißig (Buttersäuregeruch)	nussig	
	ammoniakalisch	rahmig (sahnig)	
	stechend (streng)	fettig (leimig)	
	rauchig (brandig)	seifig	
	erdig	ranzig	
	nach Parmesan etc.	bockig	
	Fremdgeruch	buttrig (Butteraroma)	
		Buttersäuregeschmack	
		schwefelhaltig	
		gärig (gasig, hefig)	
		faulig (muffig, fischig, stinkig)	
		brandig (rauchig)	
		Rotschmiere	
		charakteristisch	
		nicht typisch	
		unrein	
		Fremdgeschmack	

2.11.3 Analyse der freien Fettsäuren des Käses mittels SPME-GC-MS/MS-O

Freie Fettsäuren in den Käseproben wurden mittels Festphasenmikroextraktion (SPME) in Kopplung mit der gaschromatographischen Analyse mit massenspektrometrischer Detektion sowie mittels GC-MS-Olfaktometrie untersucht. Im Rahmen einer Optimierung wurde die Extraktion zu Beginn mittels Divinylbenzen/Carboxen/Polydimethylsiloxan-Faser und anschließend mittels einer Polydimethylsiloxan/Divinylbenzen-Faser aus dem Kopfraum des 20-mL-Headspace-Vials durchgeführt. Dazu wurden jeweils 3 g Käse in ein 20 mL Headspace-Vial eingewogen und zur SPME-GC-MS/MS-O Untersuchung eingesetzt. Die Parameter sind in Tabelle 2.55 dargestellt.

Tabelle 2.55 Parameter der SPME-GC-MS/MS-O zur Analyse der freien Fettsäuren des Käses

SPME-GC-MS/MS-O	
Gaschromatograph	7890 GC System, Agilent Technologies
Trennsäule	Agilent Technologies J&W Scientific VF-Waxms 30 m Länge; 250 µm Durchmesser; 0,25 µm Filmdicke
Trägergas	Helium
Fluss	1,2 mL·min ⁻¹ (konstant)
Faserbeschichtung	Supelco; DVB/Car/PDMS (Divinylbenzen/Carboxen/Polydimethylsiloxan); PDMS/DVB (Polydimethylsiloxan/Divinylbenzen)
Inkubationszeit	10 min
Schüttelgeschwindigkeit	250 rpm
Extraktionsdauer	40 min
Extraktionstemperatur	55 °C
Eindringtiefe Vial	27 mm
Eindringtiefe Injektor	54 mm
Desorptionsdauer	60 s
Ausheiztemperatur der Faser	250 °C
Pause vor/nach Ausheizen	9 bzw. 15 min
Eindringtiefe Ausheizen Faser	43 mm
Splitverhältnis	splitlos bzw. 5:1
Transfertemperatur	55 °C
Injektor	Split/Splitless (ALS)

Injektortemperatur	250 °C
Liner	Supleco SPME-Liner
Temperaturprogramm	40 °C (3 min); 5 °C·min ⁻¹ auf 240 °C (12 min); insgesamt 55 min
Temperatur Transfer Line	250 °C
Detektor	Agilent 5975 C MSD Triple-Axis Detektor
Temperaturen	Ionenquelle: 230 °C, Maximum 250 °C Quadrupol: 150 °C, Maximum 200 °C
Ionisation	EI 70 eV
Massenbereich	Totalionenscan: <i>m/z</i> 33 bis 300
Schwelle	100
Software	Chemstation E02.00.493
Datenbank	NIST 2008 MS

2.11.4 Berechnung des Retentionsindex nach Kováts

Um in der Gaschromatographie systemunabhängige Vergleiche von Analytsubstanzen der Literatur mit ermittelten Retentionszeiten anstellen zu können, wurden Retentionsindices nach Kováts bestimmt. Dabei wird die Retentionszeit des Analyten mit den Retentionszeiten einer Standardalkanreihe ins Verhältnis gesetzt. Die Retentionszeiten wurden an einer polaren Säule ermittelt. Der verwendete Standard der Alkanreihe enthielt alle homologen n-Alkane von C₈ bis C₂₆ (40 mg L⁻¹ in Hexan). Die Berechnung der Retentionsindices bzw. Kováts-Indices nach dem Prinzip von (Kováts, 1958) erfolgte nach Gleichung 2.9.

$$KI = 100 * N + 100 * Z \frac{\log_{t_{rA}} - \log_{t_{rN}}}{\log_{t_{rn}} - \log_{t_{rN}}} \quad (2.9)$$

mit N: Anzahl der C-Atome des nach dem Analyten eluierenden Alkans
n: Anzahl der C-Atome des vor dem Analyten eluierenden Alkans
z: Differenz zur Zahl der C-Atome des nach dem Analyten eluierenden Alkans
A: Analyt
t': Nettoretentionszeit [min] = Bruttoretentionszeit [min] – Totzeit [min]

Zum Vergleich wurden die in den Käseproben detektierten Fettsäuren Essig-, Butter-, Capron-, Capryl- und Caprinsäure als Mischstandard in Hexan angesetzt und die Retentionszeiten mittels GC-MS/MS bestimmt. Für die Standardsubstanzen wurden ebenfalls Retentionsindices nach Kováts berechnet.

2.12 Toxikologische Untersuchung

2.12.1 Probenvorbereitung für die toxikologische Untersuchung

Für die toxikologische Untersuchung wurden die vielversprechendsten Basidiomyceten *Flammulina velutipes* und *Pleurotus citrinopileatus* analog zur Herstellung für den Einsatz im Käseprozess kultiviert und aufgearbeitet (siehe 2.6) und im Rahmen eines Unterauftrags an Prof. Dr. Dr. Dieter Schrenk aus dem Institut für Lebensmittelchemie und Toxikologie an der TU Kaiserslautern weitergeleitet. Zusätzlich wurde von *F. velutipes* und *P. citrinopileatus* jeweils ein Blindwert hergestellt, indem die aufgearbeiteten Enzympräparationen durch Erhitzen in einem siedenden Wasserbad für 15 min inkubiert wurden.

2.12.2 Resazurin-Test

Zur Prüfung der Enzympräparate auf zytotoxische Eigenschaften wurden primäre Rattenhepatozyten in Kultur als Testsystem verwendet. Dazu wurden die Enzympräparate in sechs verschiedenen Konzentrationen (0,1 Vol%, 0,5 Vol%, 1 Vol%, 2 Vol%, 5 Vol% und 10 Vol%) über 24 h, 48 h und 72 h im Vergleich zur Kontrolle inkubiert. Die Zellvitalität der Hepatozyten wurde mittels Resazurin-Reduktionstest mit mikroskopischer Inspektion, die Membranintegrität der Hepatozyten mittels Laktatdehydrogenase-Leakage-Test bestimmt. Die Aussaat der Zellen erfolgte in kollagenierten 24-Loch-Platten. Als Kulturmedium diente *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM, wenig Glucose), 10% FKS, 1% Penicillin/Streptomycin.

Als Negativkontrolle diente Kulturmedium, als Positivkontrolle wurde 0,1% Triton-X100 eingesetzt.

Zur Prüfung der genotoxischen Wirkung wurden V 79-Zellen in Kultur mit fünf verschiedenen Konzentrationen der Enzympräparate über 24 h und 48 h inkubiert und ein HPRT-Mutations-test durchgeführt.

Nach einer Inkubation von 24 h, 48 h und 72 h wurde die Vitalität der Zellen getestet. Anschließend wurden die Zellen 90 min mit Resazurin inkubiert und die entstandene Menge Resorufin mittels Fluoreszenzmessung detektiert. Für die Medienkontrolle wurde der Wert auf 100% gesetzt, Mittelwerte und Standardabweichungen wurden dazu in Relation gesetzt.

2.12.3 Ames-Fluktuationstest

Zur Ermittlung der Mutagenität wurde ein Fluktuationstest nach Ames in zwei Stämmen von *Salmonella* Typhimurium (TA 98 für Leserasterverschiebung; TA 100 für Basenpaar-substitutionen) durchgeführt. Die Durchführung der Tests erfolgte sowohl mit als auch ohne S9-Mix aus Rattenleber zur metabolischen Aktivierung der Testsubstanzen. Der verwendete S9-Mix wurde aus Aroclor 1254 induzierten Rattenlebern hergestellt. Dazu wurde eine Dreifachbestimmung, im Vergleich zu bidestillierten Wasser als Negativkontrolle, durchgeführt.

2.13 Molekularbiologische Methoden

2.13.1 Primerableitung

Anhand der zuvor sequenzierten Aminosäuresequenz wurde die daraus erhaltene cDNA-Sequenz der möglichen Lipase aus *F. velutipes* mit der Sequenz einer *putative carotinoid ester lipase* aus *F. velutipes* verglichen. Aus diesen Daten wurden Primer zur Amplifizierung abgeleitet. Durch erhaltene Sequenzabschnitte wurden weitere Primer zur vollständigen Sequenzierung der cDNA und gDNA abgeleitet. In gleicher Weise wurden Primer zur Sequenzierung der cDNA und gDNA von *P. citrinopileatus* abgeleitet.

2.13.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Messung der DNA- und RNA-Konzentrationen erfolgte mittels NanoPhotometer™ Pearl. Dabei wurden die Extinktionen E bei 260 nm, 280 nm und 230 nm bestimmt. Die Nukleinsäurekonzentration wird über die Extinktion bei 260 nm ermittelt. Die Reinheit der Lösung wird über den Quotienten der Extinktionen bei 260 nm und 280 nm bestimmt. Hat der Quotient E_{260}/E_{280} einen Wert von 1,8, dann liegt eine reine DNA-Lösung vor, liegt der Wert bei 2,0, dann liegt eine reine RNA-Lösung vor. Die Trübung wird über die Extinktion bei 230 nm bestimmt.

2.13.3 Isolierung genomischer DNA

Die Kultivierung der Basidiomyceten erfolgte wie unter Kulturführung (2.6) beschrieben. Am Tag der maximalen Esterase- bzw- Lipaseaktivität wurden die Kulturen geerntet und das Myzel vom Überstand getrennt. Anschließend wurde das Myzel unter flüssigem Stickstoff gemörsert und ca. 4 Microspatel des gemörserten Myzels in ein 1,5 mL-Reaktionsgefäß überführt. Der Rest des Myzels wurde bei -20 °C eingefroren. In das Reaktionsgefäß wurden 500 µL eines Lysispuffers (Tabelle 2.56) pipettiert, gevortext und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Tabelle 2.56 Zusammensetzung des Lysispuffers zur Isolierung genomischer DNA

Chemikalie	Stocklösung	Eingesetztes Volumen [mL]
400 mM Tris HCl pH 8.0	1 M	4 mL
60 mM EDTA pH 8,0	200 mM	3 mL
150 mM NaCl	1 M	1,5 mL
1% SDS	10%	1 mL
steriles Reinstwasser	/	0,5 mL

Anschließend wurden 150 µL einer 3 M Kaliumacetat-Lösung (pH 4,8) zugefügt, gevortext und für 10 min bei 14.000 rpm (18.000 g) bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues 1,5 mL-Reaktionsgefäß überführt und mit dem gleichen Volumen Isopropanol (ca. 600 µL) versetzt und gemischt. Das Gemisch wurde erneut für 10 min bei Raumtemperatur und 14.000 rpm (18.000 g) zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 500 µL Ethanol (70%) aufgenommen, gewaschen und 1 min zentrifugiert (14.000 rpm, 18.000 g, RT). Der Überstand wurde erneut verworfen und das Pellet in einer Vakuumzentrifuge für 5 min vom restlichen Lösungsmittel befreit. Das getrocknete Pellet wurde anschließend in 50 µL bzw. 100 µL (bei größeren, sichtbaren Pellets) sterilem Reinstwasser resuspendiert. Mittels NanoPhotometer™ wurde die DNA-Konzentration (2.13.2) bestimmt. Die Lagerung der genomischen DNA erfolgte bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C.

2.13.4 Isolierung der RNA

Die Isolierung von RNA erfolgte mit Myzel, welches zum Zeitpunkt maximaler spezifischer Enzymaktivität im Kulturüberstand entnommen und unter flüssigem Stickstoff gemörsert wurde. Die Isolierung erfolgte nach den Angaben des Herstellers des RNeasy® Plant Mini Kit unter Einsatz des RLC-Puffers (Quiagen, Venlo, Niederlande). Abweichend vom Protokoll erfolgte der DNase-Verdau 60 min statt 15 min. Während der Isolierung wurden ausschließlich autoklavierte und ausgeglühte Materialien und Lösungsmittel verwendet, um eine Kontamination mit RNasen zu vermeiden. Die Konzentrationsbestimmung der RNA erfolgte wie unter Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren (2.13.2) beschrieben mittels NanoPhotometer™. Als Qualitätskontrolle bezüglich der Reinheit der RNA wurden die isolierten Proben auf ein Agarosegel (2.10.4) aufgetragen. Anhand der 28S- und 18S-Banden im Gel konnte die Qualität der RNA eabgeschätzt werden. Die Lagerung der isolierten Gesamt-RNA erfolgte bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C.

2.13.5 cDNA-Synthese

Für die cDNA-Synthese wurde M-MLV reverse Transkriptase von Invitrogen (Carlsbad, USA) eingesetzt. Des Weiteren kam die PrimeScript™ Reverse Transkriptase von Takara (Clontech Laboratories, Inc., A Takara Bio Company, USA) zum Einsatz.

Dabei wurde jeweils nach den Angaben des Herstellers verfahren. Ein vollständiger RNA-Verdau erfolgte mittels RNase A. Die Konzentrationsbestimmung der cDNA erfolgte wie unter Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren (2.13.2) beschrieben mittels NanoPhotometer™. Die Lagerung der cDNA erfolgte bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C.

2.13.6 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Zur Amplifizierung gewünschter gDNA- und cDNA-Abschnitte wurde die PCR eingesetzt. Als Polymerasen wurde die Phusion®-Polymerase bzw. die Q5® High Fidelity DNA Polymerase (New England, Biolabs, Ipswich, USA) verwendet. Die Zusammensetzung des Master-Mixes (Tabelle 2.57, Tabelle 2.58), sowie das Temperaturprogramm (Tabelle 2.59, Tabelle 2.60) richteten sich nach den Angaben des Herstellers der Polymerasen.

Tabelle 2.57 Zusammensetzung des Master-Mixes pro 20 µL PCR-Ansatz mit Phusion® High-Fidelity DNA-Polymerase

Komponente	Volumen [µL]	Endkonzentration
5x GC Reaktionspuffer	4,0	1x
10 mM dNTPs	0,4	200,0 µM
10 µM Forward Primer	1,0	0,5 µM
10 µM Reverse Primer	1,0	0,5 µM
Phusion® High-Fidelity DNA-Polymerase	0,2	0,02 U µL ⁻¹
Template DNA	variabel	50 – 250 ng pro 20,0 µL PCR
DMSO, 100% (optional)	0,6	3%
Magnesiumchlorid, 50 mM (optional)	0,6	1,5 mM
Nuklease-freies Reinstwasser	ad 20	

Tabelle 2.58 Zusammensetzung des Master-Mixes pro 20 μ L PCR-Ansatz mit Q5[®] High-Fidelity DNA Polymerase

Komponente	Volumen [μ L]	Endkonzentration
5x Q5 Reaktionspuffer	4,0	1x
10 mM dNTPs	0,4	200,0 μ M
10 μ M Forward Primer	1,0	0,5 μ M
10 μ M Reverse Primer	1,0	0,5 μ M
Q5 [®] High-Fidelity DNA Polymerase	0,2	0,02 U μ L ⁻¹
Template DNA	variabel	< 1000 ng
5X Q5 High GC Enhancer (optional)	4,0	1x
Nuklease-freies Reinstwasser	<i>ad 20</i>	

2.13.6.1 Analytische PCR

Um die optimale Hybridisierungstemperatur der abgeleiteten Primer zu erhalten, wurde eine Temperaturgradienten-PCR durchgeführt. Dabei wurde bei 5 °C unter der vom Hersteller angegebenen Schmelztemperatur der Primer angesetzt. Die Zusammensetzung war analog zu Tabelle 2.57, allerdings wurden 10 μ L statt 20 μ L angesetzt.

Tabelle 2.59 Temperaturprogramm einer PCR-Reaktion mit Phusion[®] High-Fidelity DNA-Polymerase

Schritt-Nr.	Schritt	Temperatur [°C]	Zeit
1	Initiale Denaturierungsphase	98	5,0 min
2	Denaturierung	98	30 s
3	Primer Annealing	Gradient: 45 °C bis 69 °C	30 s
4	Elongation	72	10 – 30 s pro kb
	Zurück zu Schritt Nr. 2 für 30-40 Zyklen		
5	Finale Elongation	72	5 min
6	Lagerung	8	∞

Tabelle 2.60 Temperaturprogramm einer PCR-Reaktion mit Q5[®] High-Fidelity DNA Polymerase

Schritt-Nr.	Schritt	Temperatur [°C]	Zeit
1	Initiale Denaturierungsphase	98	30 s
2	Denaturierung	98	10 s
3	Primer Annealing	Gradient: 45 °C bis 69 °C	30 s
4	Elongation	72	20 – 30 s pro kb
Zurück zu Schritt Nr. 2 für 25-35 Zyklen			
5	Finale Elongation	72	2 min
6	Lagerung	8	∞

2.13.6.2 Präparative PCR

Für die präparative PCR wurden 200 µL des Mastermixes angesetzt, um größere Mengen an DNA zu erhalten. Die PCR-Produkte wurden nach der Isolierung der entsprechenden Bande aus dem Agarosegel aufgearbeitet und sequenziert.

2.13.7 Isolierung von DNA-Fragmenten

Die relevanten DNA-Fragmente wurden mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und in ein steriles 2 mL-Reaktionsgefäß überführt. Die Isolierung der Fragmente aus dem Gel erfolgte mittels NucleoSpin[®] Gel und PCR Clean-up Kit (Macherey-Nagel) nach Angaben des Herstellers. Die Konzentrationsbestimmung der DNA-haltigen Lösungen erfolgte wie in 2.13.2 beschrieben am NanoPhotometer[™]. Die Lagerung der isolierten DNA erfolgte bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C.

2.13.8 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung der isolierten DNA-Fragmente erfolgte mittels Sequenzierservice von SeqLab-Microsynth GmbH, Göttingen.

2.13.9 Klonierung von DNA

DNA-Amplifikate, die nach 2.13.7 isoliert wurden und zu geringe Konzentrationen für eine direkte Sequenzierung aufwiesen, wurden mittels Zero Blunt[®] Cloning Kit (Invitrogen) in *E. coli* zwischenkloniert.

2.13.9.1 Ligation

Für die Ligation der DNA-Amplifikate in einen pCR[®]-Blunt-Vektor wurden die in Tabelle 2.61 aufgeführten Bestandteile gemäß der Herstellerangaben pipettiert und anschließend für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Dabei sollte das Verhältnis zwischen der eingesetzten Menge des PCR-Produkts zum Vektor zwischen 10:1 und 100:1 liegen.

Tabelle 2.61 Ligationsansatz Zero Blunt[®] Cloning Kit

Komponente	Menge [μL]
pCR [®] -Blunt (25 ng)	1
PCR-Produkt (<i>blunt ends</i>)	1-5
5xExpressLink [™] T4 DNA Ligase Puffer	2
ExpressLink [™] T4 DNA Ligase (5 U μL^{-1})	1
Reinstwasser	ad 10

2.13.9.2 Transformation in *E. coli* TOP10

Für die Transformation wurden 5 μL des Ligationsansatzes zu einem Aliquot *One Shot[®] TOP10 Chemically Competent E. coli* Zellen (Invitrogen), welche auf Eis vorgelegt wurden, pipettiert und vorsichtig durchmischt. Der Ansatz wurde für 30 min auf Eis inkubiert und anschließend bei 42 °C für 45 s erhitzt. Nach dem Abkühlen auf Eis für 2 min wurden 250 μL SOC-Medium (Tabelle 2.20) hinzugefügt und für 1 h bei 37 °C und 225 rpm auf einem Horizontalschüttler inkubiert. Im Anschluss wurden 10 bis 100 μL auf LB_{Kanamycin}⁻ Agarplatten aufgetragen und über Nacht bei 37 °C unter Lichtausschluss inkubiert.

Der pCR[®]-Blunt Vektor enthält das letale *E. coli* *ccdB*-Gen, welches am C-Terminus des LacZ α fusioniert. Die Ligation eines *blunt* PCR-Fragmentes unterbricht die Expression der

LacZ α -ccdB-Genfusion, sodass nur Klone auf den LB_{Kanamycin}-Agarplatten wachsen können, die das neue Insert der *blunt-end* Klonierung beinhalten.

2.14 Sterilisation und Entsorgung

2.14.1 Sterilisation von Arbeitsmaterialien

Das Sterilisieren von benötigten Arbeitsmaterialien sowie von Medien und Lösungen wurden nach Möglichkeit für 20 min bei 121 °C im Autoklav durchgeführt. Durch Sterilfilter (Porendurchmesser 0,22 μ m) wurden nicht autoklavierbare Lösungen steril filtriert.

2.14.2 Sterilisation und Entsorgung von S1-Abfällen

Feste und flüssige S1-Abfälle wurden für 15 min bei 135 °C im Autoklaven sterilisiert. Nach Filtration wurden flüssige Abfälle dem Laborabwasser zugeführt, feste Abfälle wurden über den Laborabfall entsorgt.

2.14.3 Entsorgung von Lösungsmitteln und Chemikalien

Nicht wiederverwendbare Lösungsmittel und Chemikalien wurden ihren Eigenschaften entsprechend entsorgt. Alle gesammelten Chemikalien- und Lösungsmittelabfälle wurden über die zentrale Entsorgungseinrichtung der Justus-Liebig-Universität Gießen entsorgt.

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung des Referenzzyms opti-zym z10uc

Das Referenzzym opti-zym z10uc wurde umfassend charakterisiert. Zunächst wurden verschiedene Konzentrationen in Wasser angesetzt (Abbildung 3.1). Aufgrund der schlechten Löslichkeit in Wasser wurden Kaliumphosphatpuffer, Kaliumphosphatpuffer mit 0,5% Triton X-100 (Tabelle 2.22) und Sörensenphosphatpuffer (Tabelle 2.23) als Lösungsmittel getestet. In allen Ansätzen wurde jedoch keine vollständige Lösung erzielt werden. Alle Suspensionen waren trüb und enthielten kleine, ungelöste Partikel, sodass die Suspensionen vor Verwendung zentrifugiert wurden (4°C, 18.000 g). Abbildung 3.2 zeigt die ermittelten Aktivitäten bei einer Konzentration des Referenzzyms von 30 g L⁻¹ in verschiedenen Lösungsmitteln. Die Messungen erfolgten jeweils in Dreifachbestimmungen.

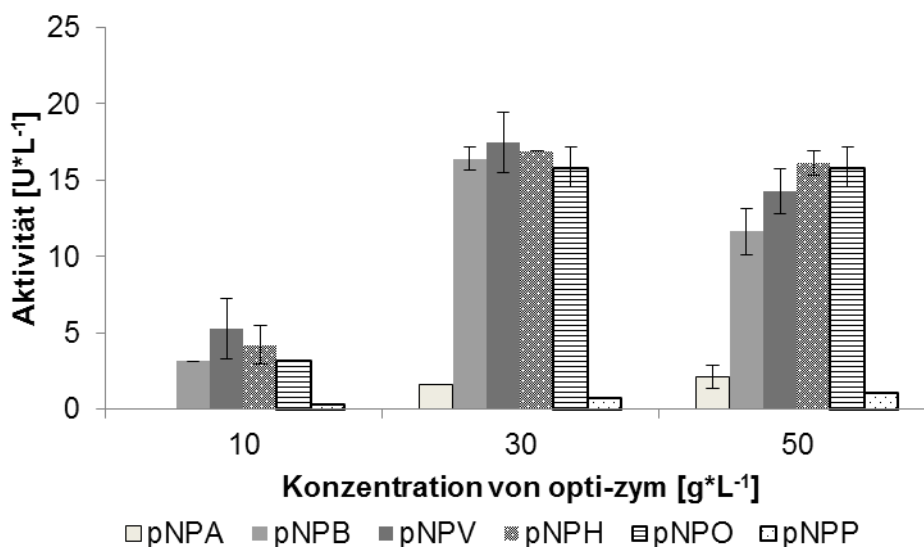


Abbildung 3.1 Esterase- und Lipaseaktivität von unterschiedlich konzentrierten opti-zym-Lösungen in Wasser. (Die Messungen erfolgten in Dreifachbestimmung mittels Esterase- und Lipaseassay, die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung)

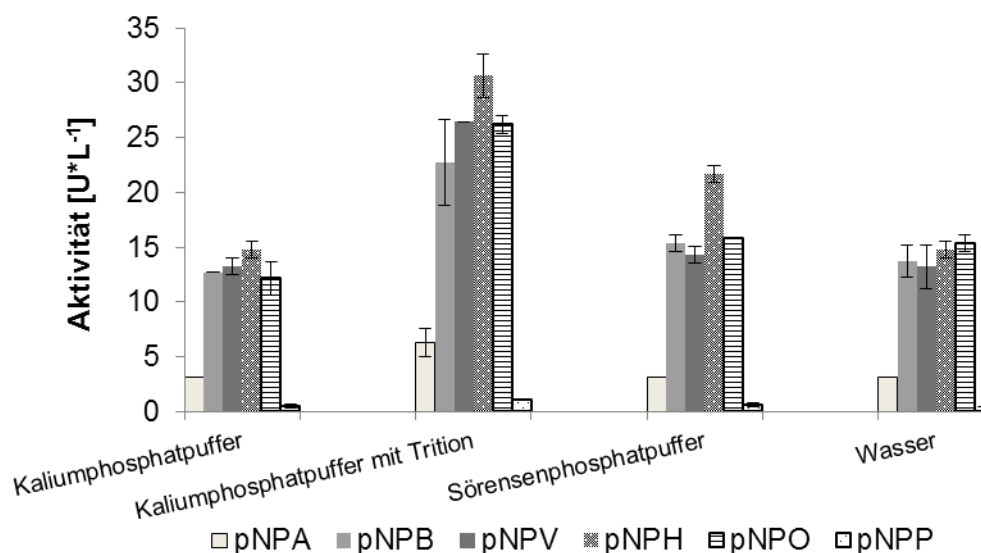


Abbildung 3.2 Esterase- und Lipaseaktivität von opti-zym-Lösungen der Konzentration 30 g L^{-1} angesetzt in verschiedenen Lösungsmitteln. (Die Messungen erfolgten in Dreifachbestimmung mittels Esterase- und Lipaseassay, die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung)

In Abbildung 3.1 ist zu erkennen, dass die höher konzentrierte opti-zym Lösung (50 g L^{-1}) eine minimal geringere Aktivität als die weniger konzentrierte (30 g L^{-1}) aufwies. Des Weiteren wurde eine sehr geringe Aktivität im Lipaseassay mit dem Substrat pNPP nachgewiesen.

Das Hydrolyseprofil war in allen getesteten Lösungsmitteln ähnlich (Abbildung 3.2). Die Verwendung von Kaliumphosphatpuffer mit 0,5% Triton X-100 erwies sich als am besten geeignet

Die Bestimmung der Proteinkonzentration des Referenzzyms opti-zym z10uc wurde in Kaliumphosphatpuffer und in Wasser durchgeführt. Da die Puffer mit Zusatz von Emulgatoren den Assay stören, konnten in diesen keine Proteinkonzentrationen ermittelt werden.

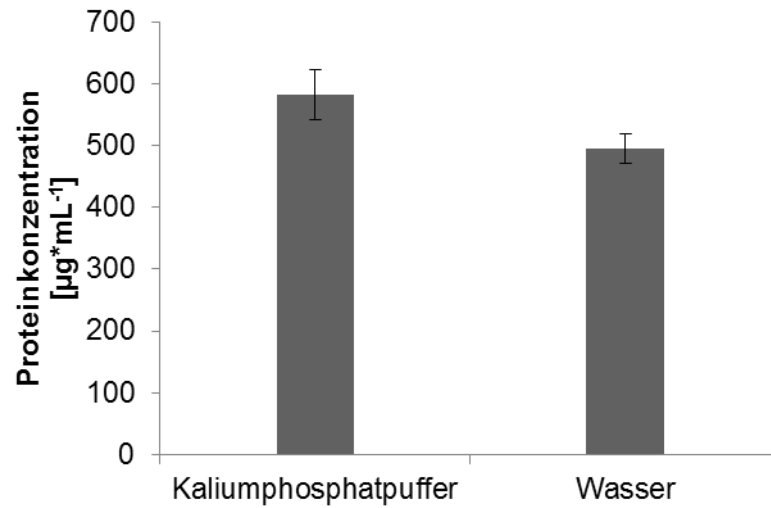


Abbildung 3.3 Proteinkonzentration des Referenzzyms opti-zym z10uc (30 g L^{-1}) in Kaliumphosphatpuffer und in Wasser. (Die Messungen erfolgten in Dreifachbestimmung mittels Bradford-Assay, die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung)

Zur näheren Charakterisierung wurde das Referenzenzym in unterschiedlichen Konzentrationen auf eine halbnative und eine denaturierende SDS-PAGE aufgetragen (Abbildung 3.4, Abbildung 3.5).

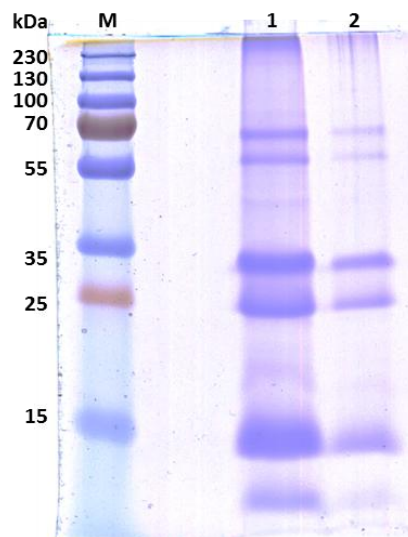
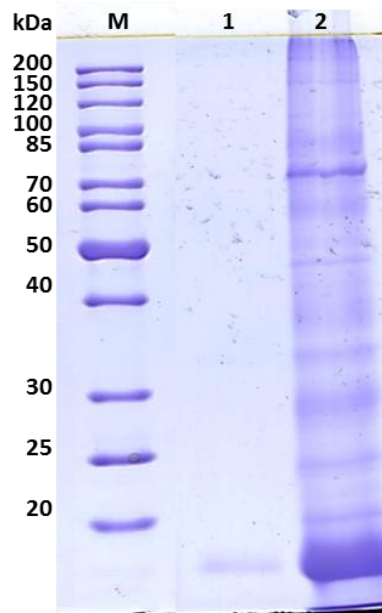


Abbildung 3.4 Halbnative SDS-PAGE (Coomassie-Färbung) mit folgender Auftragung: Marker (M), opti-zym z10uc 50 g L^{-1} (1), opti-zym z10uc 10 g L^{-1} (2)



**Abbildung 3.5 Denaturierende SDS-PAGE (Coomassie-Färbung) mit folgender Auftragung: Marker (M),
opti-zym z10uc 10 g L⁻¹ (1), opti-zym z10uc 50 g L⁻¹ (2)**

Sowohl auf der halbnativen als auch auf der denaturierenden SDS-PAGE wurden mehrere Banden sichtbar. Mittels Aktivitätsfärbung wurden keine Banden detektiert (nicht abgebildet).

Mittels isoelektrischer Fokussierung wurden die isoelektrischen Punkte des Referenzzyms ermittelt (Abbildung 3.6). Dazu wurden Standardlösungen mit 10 g L⁻¹ und 50 g L⁻¹ aufgetragen. Aufgrund der nativen Bedingungen wurde das Gel mittels kolloidaler Coomassie-Färbung und Esterase-Aktivitätsfärbung gefärbt.

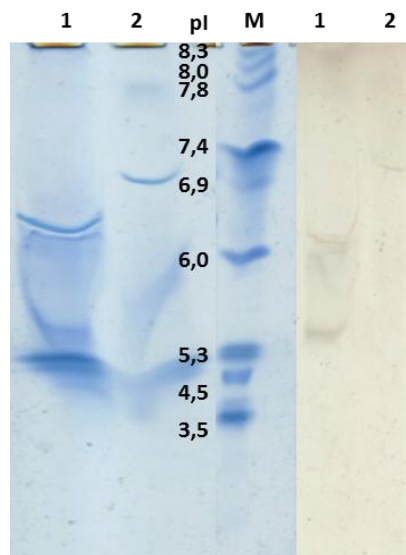


Abbildung 3.6 IEF-Gel mit unterschiedlichen Konzentrationen des Referenzzyms opti-zym z10uc. Links kolloidale Coomassie-Färbung und rechts Aktivitätsfärbung (α -Naphthylacetat) mit folgender Auftragung: Marker (M), opti-zym z10uc 50 g L⁻¹ (1), opti-zym z10uc 10 g L⁻¹ (2)

In der Aktivitätsfärbung wurden zwei schwache Banden in einem Bereich zwischen pH 5,3 und 6,0 sichtbar. Diese Banden wurden in der Coomassie-Färbung bei einer Konzentration von 50 g L⁻¹ deutlich sichtbar.

3.1 Kulturführung

3.1.1 Stammhaltung

Die nach Tabelle 2.2 ausgewählten Basidiomyceten wiesen sehr unterschiedliches Wachstumverhalten auf. In Abbildung 3.7 sind beispielhaft sechs verschiedenen Basidiomyceten nach einwöchiger Kultivierung auf Malzextraktpepton-Agarplatten dargestellt. Dabei sind Unterschiede bezogen auf das Myzel-Wachstum und die Myzel-Beschaffenheit deutlich zu erkennen.



Abbildung 3.7 Verschiedene Basidiomyceten nach einwöchiger Kultivierung auf MEP-Agarplatten, LSQU (1), AFU (2), FVE-D (3), FVE-F (4), PCI (5) und PER (6)

3.1.2 Vorkultur

Die Vorkulturen der ausgewählten Basidiomyceten in Malzextraktpepton-Medium (MEP) zeigten Unterschiede in Form und Größe der Pellets sowie in der Färbung des Mediums nach einer Kultivierungsdauer von sieben Tagen (Abbildung 3.8).

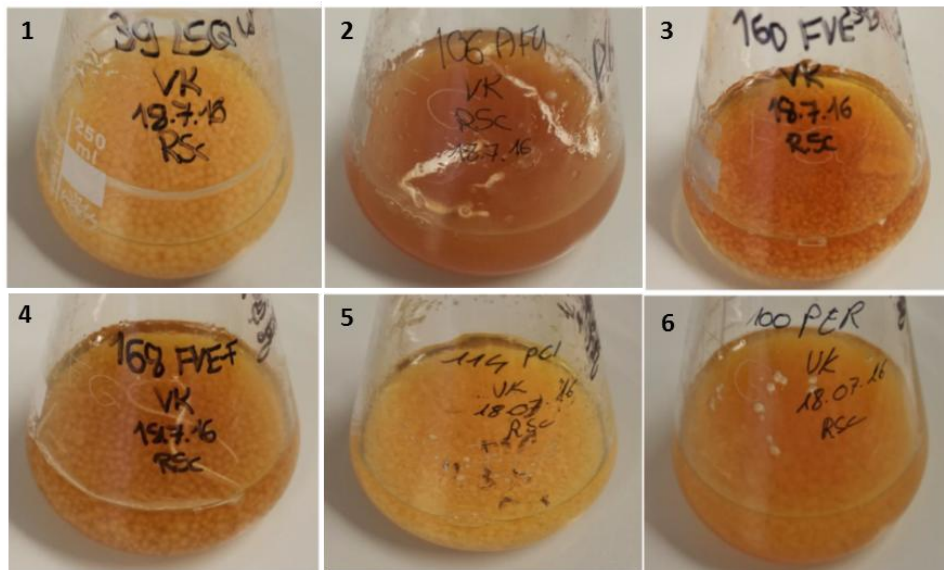


Abbildung 3.8 Vorkulturen von Basidiomyceten nach einwöchiger Kultivierung: LSQU (1), AFU (2), FVE-D (3), FVE-F (4), PCI (5) und PER (6)

3.1.3 Hauptkultur

3.1.3.1 Verschiedene Nährmedien

Die Hauptkulturen wurden nach 2.6.4 in MEP-Medium, Standardnährlösung (SNL) sowie Kartoffel-Glucose-Nährmedium (KG) angesetzt. In Abbildung 3.9 sind die Kulturen von *F. velutipes* und *P. citrinopileatus* in den verschiedenen Medien nach zweiwöchiger Kultivierung dargestellt. Es sind Unterschiede in Form und Größe der Pellets sowie in der Farbe der Medien erkennbar.

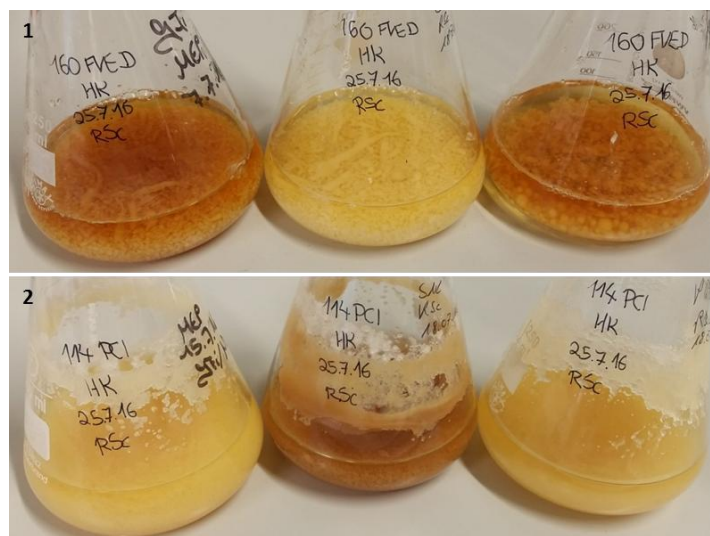


Abbildung 3.9 Kulturen von *Flammulina velutipes* (1) und *Pleurotus citrinopileatus* (2) nach 14 Tagen in MEP- (links) und KG- Nährmedium (Mitte) sowie in SN-Lösung (rechts)

3.1.3.2 Verschiedene Induktoren

Zur Steigerung der Sekretion extrazellulärer Esterasen bzw. Lipasen wurden verschiedene Induktoren zugesetzt. Dabei handelte es sich um Fett aus Quark (extrahiert nach Weibull-Stoldt aus Speisequark: 50% Fett i. Tr.), Butterschmalz und Butter.

Insgesamt veränderte die Zugabe der Induktoren das Myzel-Wachstum kaum. In einigen Fällen waren die Farbe sowie die Viskosität im Vergleich zur Kultur ohne Induktor verändert.

3.2 Photometrische Assays

3.2.1 Esterase- und Lipaseaktivität

Die Bestimmung der Esterase- und Lipaseaktivität in den Kulturüberständen der verschiedenen Basidiomyceten sowie der Aktivität des Referenzzyms opti-zym z10uc, erfolgte photometrisch mittels der entsprechenden Assays (2.8.2, 2.8.3).

3.2.1.1 Verschiedene Nährmedien

Zur Optimierung der Enzymexpression wurden für die Hauptkulturführung verschiedene Nährmedien getestet: MEP-Medium, SN-Lösung und KG-Medium. Die verwendeten Stämme wiesen in den verschiedenen Medien Unterschiede im Wachstum sowie in der Färbung des Mediums auf.

In Abbildung 3.10 sind die Aktivitäten im Kulturüberstand des Basidiomyceten *F. velutipes* in den verschiedenen Medien über eine Kultivierungsdauer von 32 Tagen dargestellt. Abbildung 3.11 zeigt die Aktivitäten im Kulturüberstand des Basidiomyceten *P. citrinopileatus* in den verschiedenen Medien über den Kulturverlauf. Die Aktivitäten im Kulturüberstand von *P. eryngii* in den verschiedenen Medien sind in Abbildung 3.12 dargestellt.

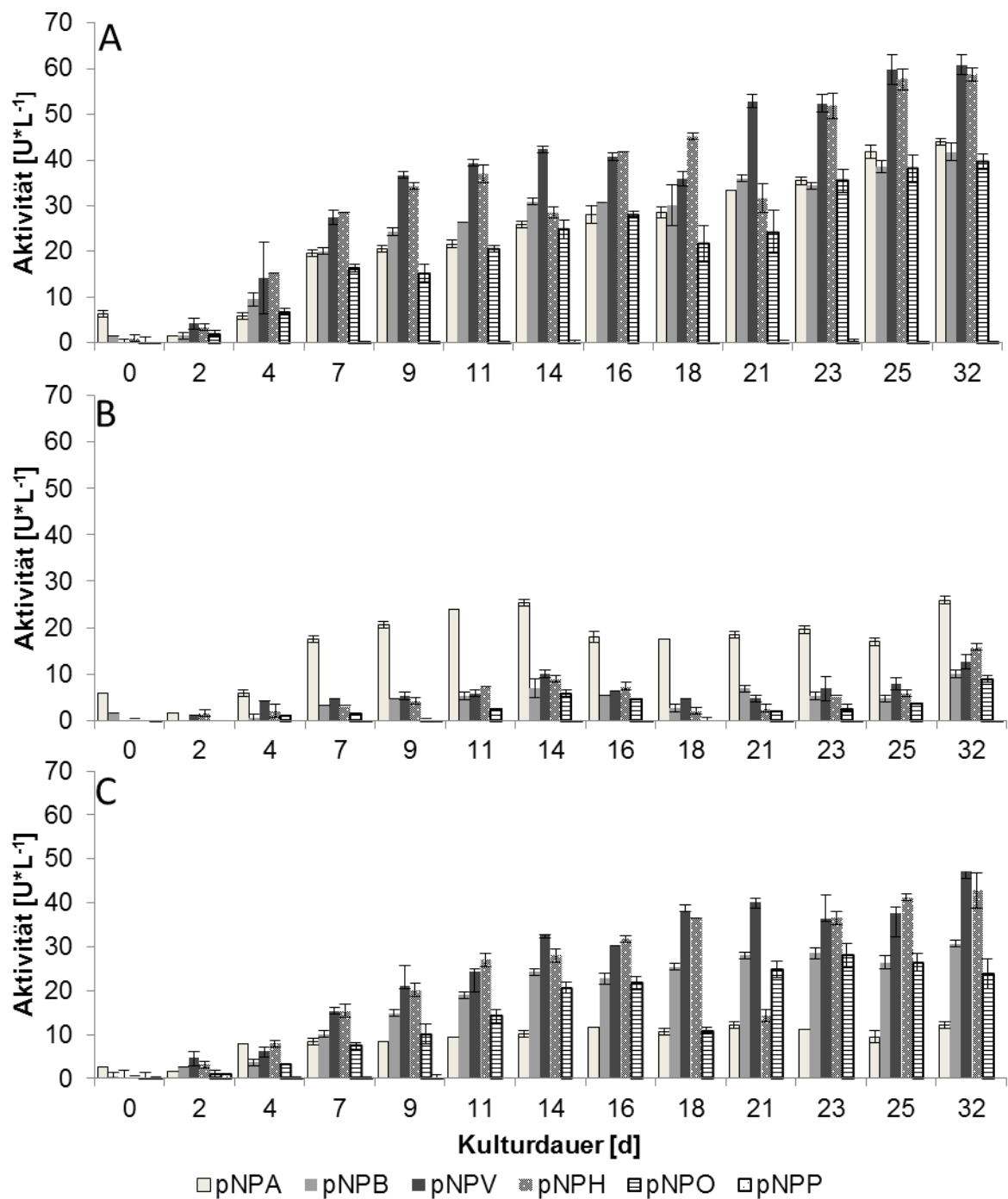


Abbildung 3.10 Esterase- und Lipaseaktivität der Kulturüberstände von *F. velutipes* in MEP- (A), SNL (B) und KG-Nährmedium (C) über den Kulturverlauf. (Die Messungen erfolgten in Dreifachbestimmung mittels Esterase- und Lipaseassay, die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung)

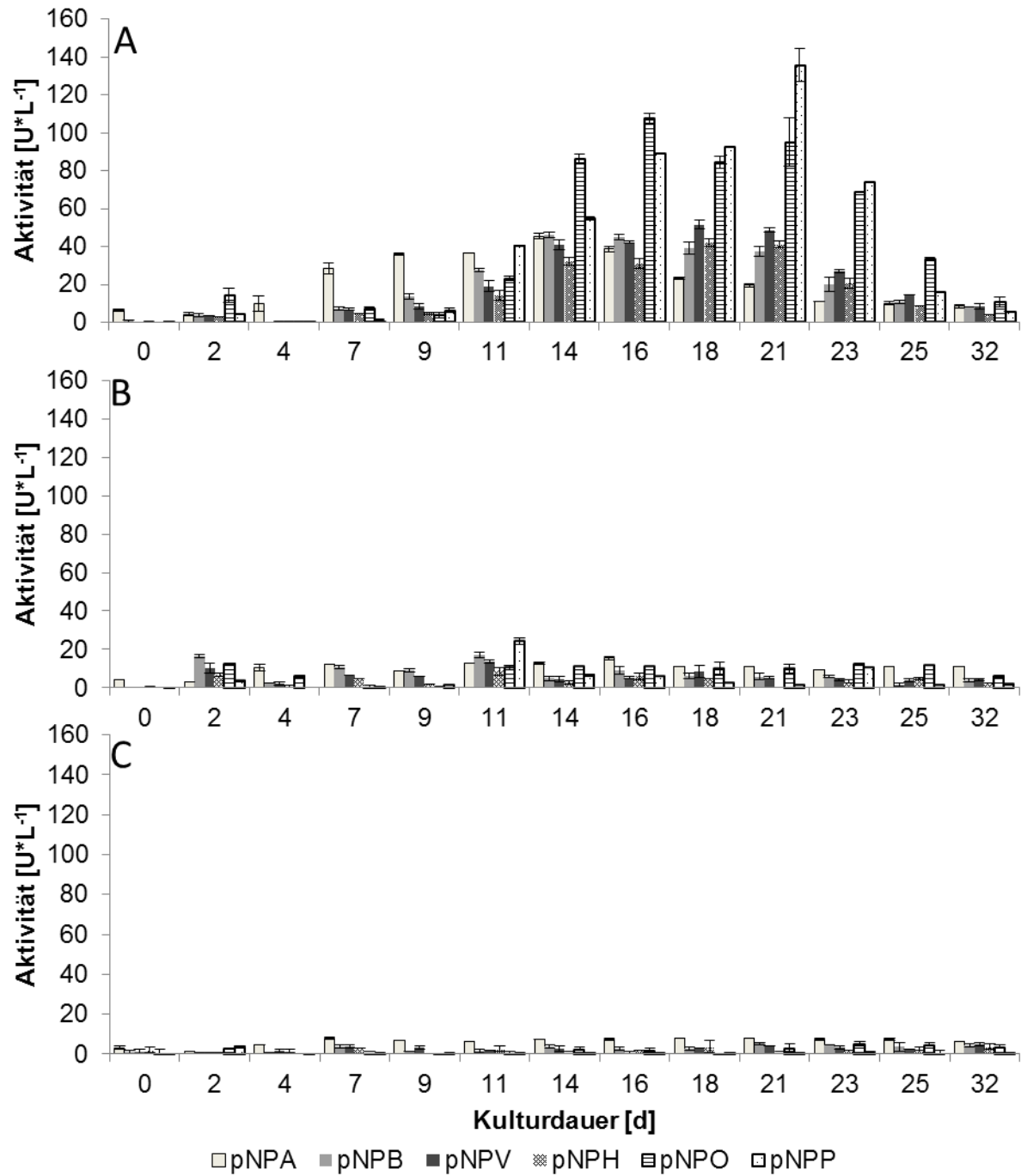


Abbildung 3.11 Esterase- und Lipaseaktivität der Kulturüberstände von *P. citrinopileatus* in MEP- (A), SNL (B) und KG-Nährmedium (C) über den Kulturverlauf. (Die Messungen erfolgten in Dreifachbestimmung mittels Esterase- und Lipaseassay, die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung)

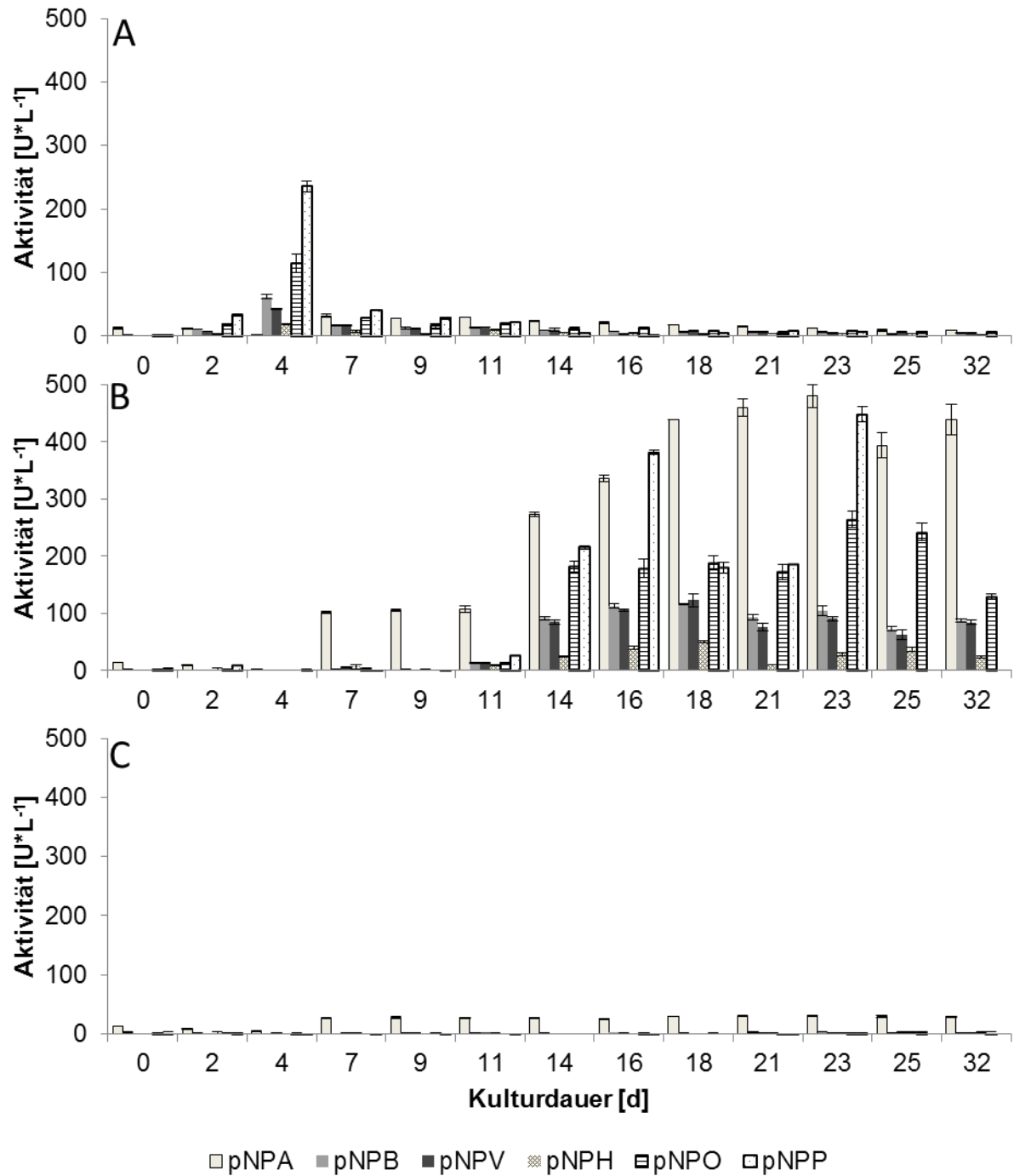


Abbildung 3.12 Esterase- und Lipaseaktivität der Kulturüberstände von *P. eryngii* in MEP- (A), SNL (B) und KG-Nährmedium (C) über den Kulturverlauf. (Die Messungen erfolgten in Dreifachbestimmung mittels Esterase- und Lipaseassay, die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung)

3.2.1.2 Verschiedene Induktoren

Anhand der ermittelten Enzymaktivitäten in den Kulturüberständen, wurde Malxextraktpepton-Medium für die weitere Optimierung ausgewählt. Diesem Medium wurden verschiedene Induktoren zur Steigerung der Sekretion extrazellulärer Esterasen bzw. Lipasen zugesetzt. Bei den Induktoren handelte es sich um Fett aus Quark (extrahiert nach Weibull-Stoldt aus Speisequark: 50% Fett i. Tr.; 0,05%, v/v), Butterschmalz und Butter (deutsche Markenbutter, mild gesäuert; 0,5%, v/v). Die Aktivitäten in den Kulturen mit Induktoren sind in Abbildung 3.13, Abbildung 3.14 bis Abbildung 3.15 für die Basidiomyceten *F. velutipes*, *P. citrinopileatus* und *P. eryngii* dargestellt.

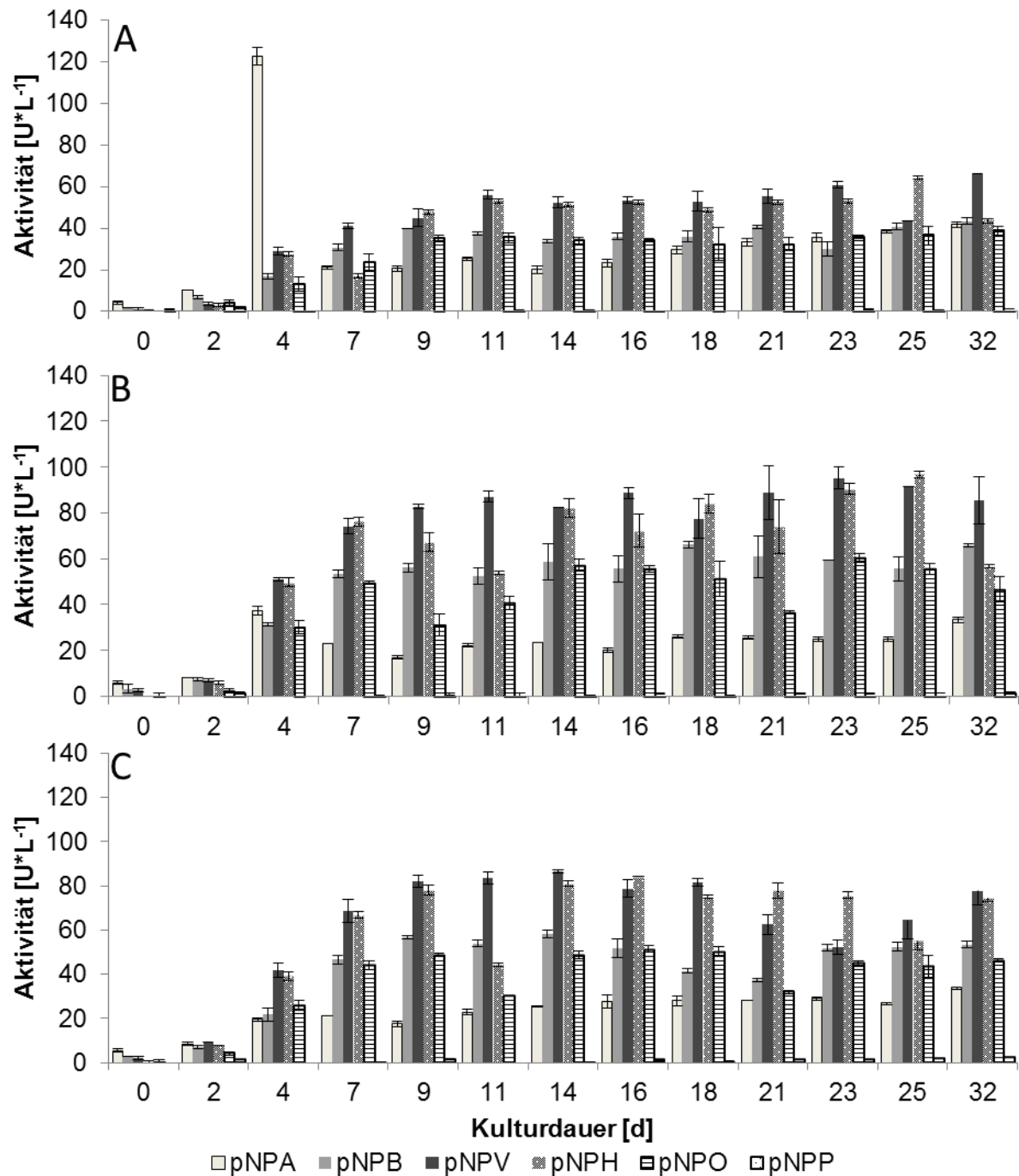


Abbildung 3.13 Esterase- und Lipaseaktivität der Kulturüberstände von *F. velutipes* in MEP-Medium unter Zusatz von Fett aus Quark (A), Butter (B) und Butterschmalz (C). (Die Messungen erfolgten in Dreifachbestimmung mittels Esterase- und Lipaseassay, die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung)

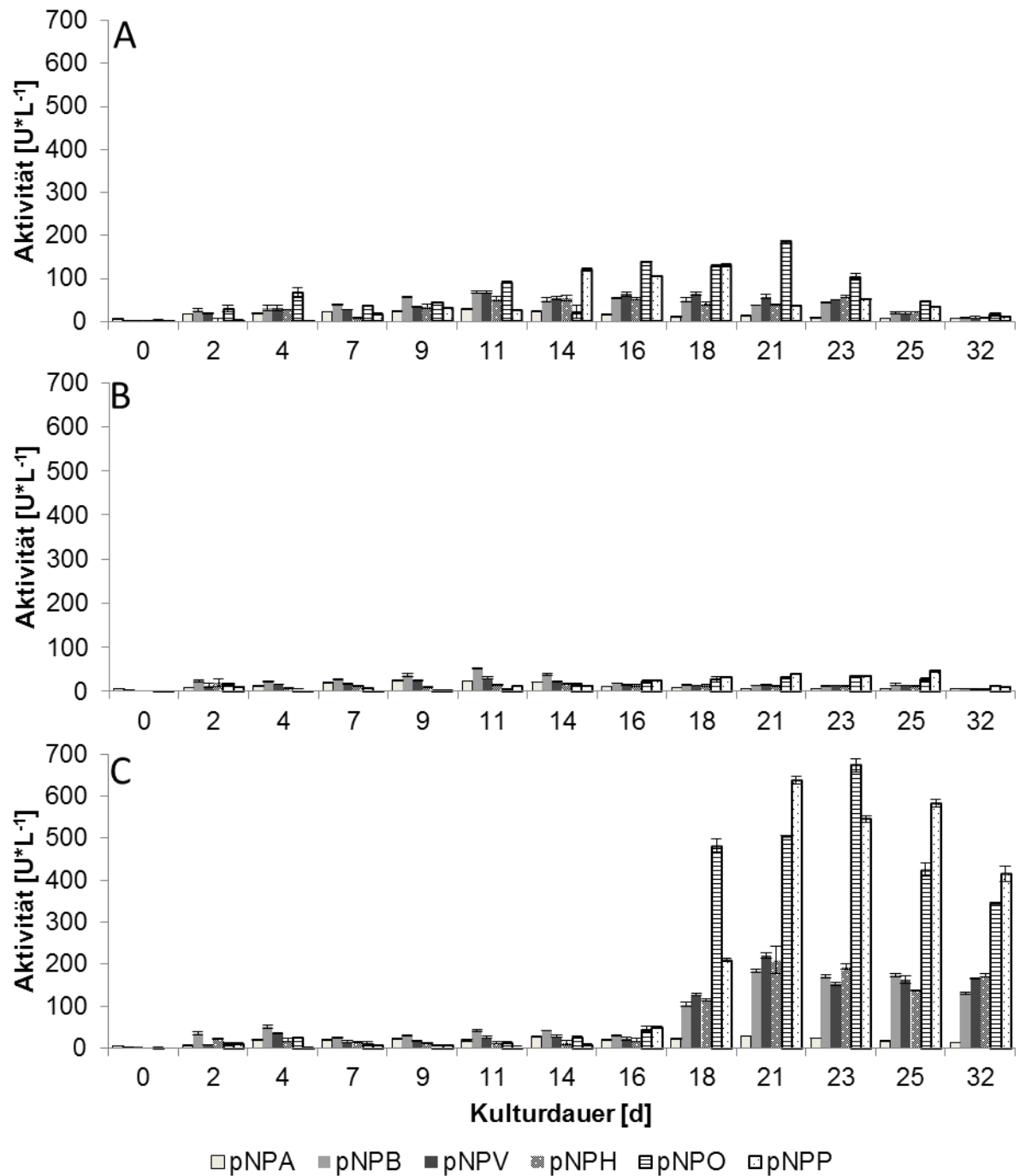


Abbildung 3.14 Esterase- und Lipaseaktivität der Kulturüberstände von *P. citrinopileatus* in MEP-Medium unter Zusatz von Fett aus Quark (A), Butter (B) und Butterschmalz (C). (Die Messungen erfolgten in Dreifachbestimmung mittels Esterase- und Lipaseassay, die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung)

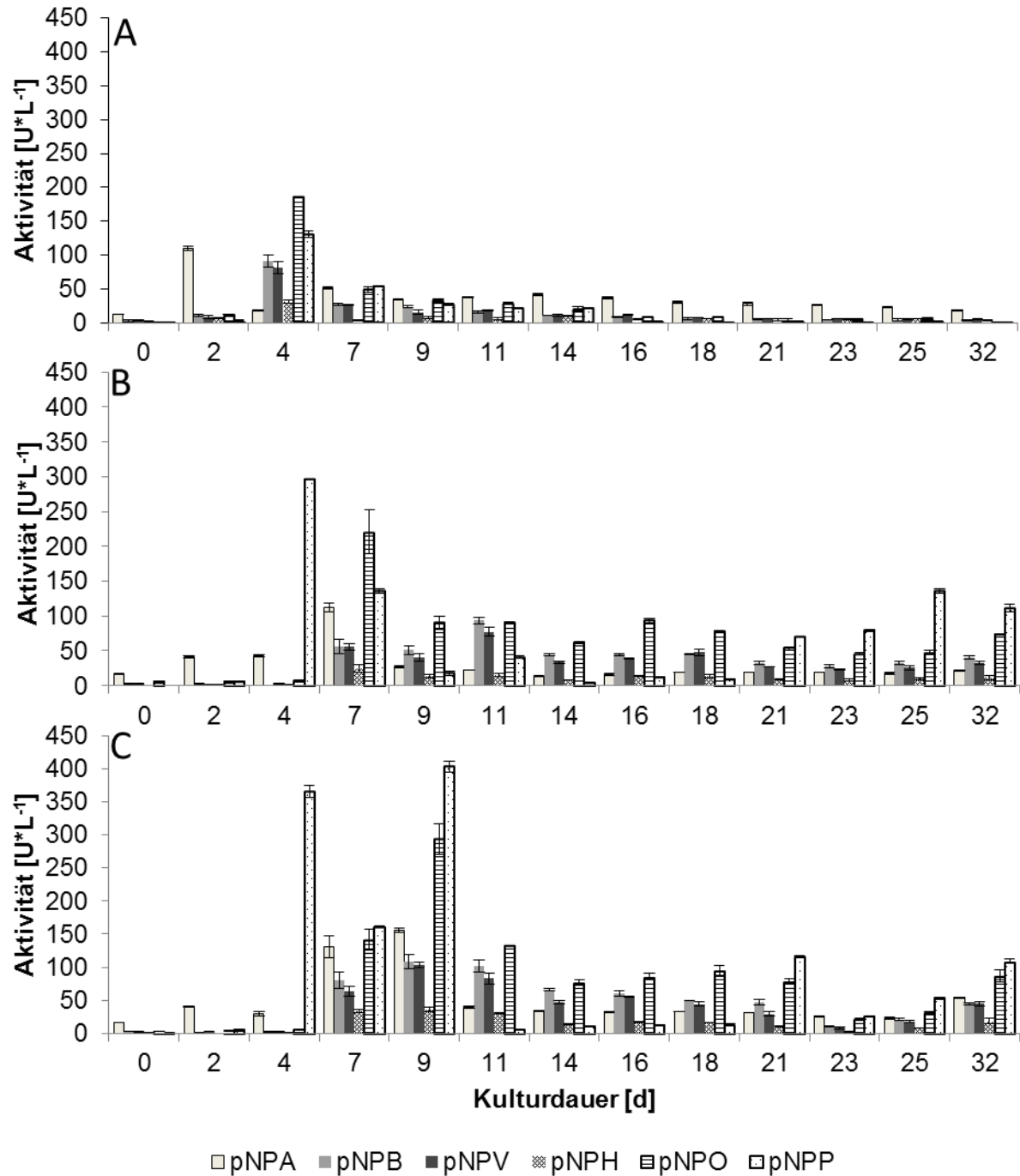


Abbildung 3.15 Esterase- und Lipaseaktivität der Kulturüberstände von *P. eryngii* in MEP-Medium unter Zusatz von Fett aus Quark (A), Butter (B) und Butterschmalz (C). (Die Messungen erfolgten in Dreifachbestimmung mittels Esterase- und Lipaseassay, die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung)

3.2.1.3 Maßstabsvergrößerung des Kulturvolumens

Um hinreichende Mengen an sekretierten Enzymen für die Applikationstests zu erhalten, wurde eine Maßstabsvergrößerung des Kulturvolumens von 100 mL auf bis zu 400 mL erforderlich. In Abbildung 3.16, Abbildung 3.17 und Abbildung 3.18 sind die Aktivitäten in den verschiedenen Maßstäben der Basidiomyceten *F. velutipes*, *P. citrinopileatus* und *P. eryngii* dargestellt.

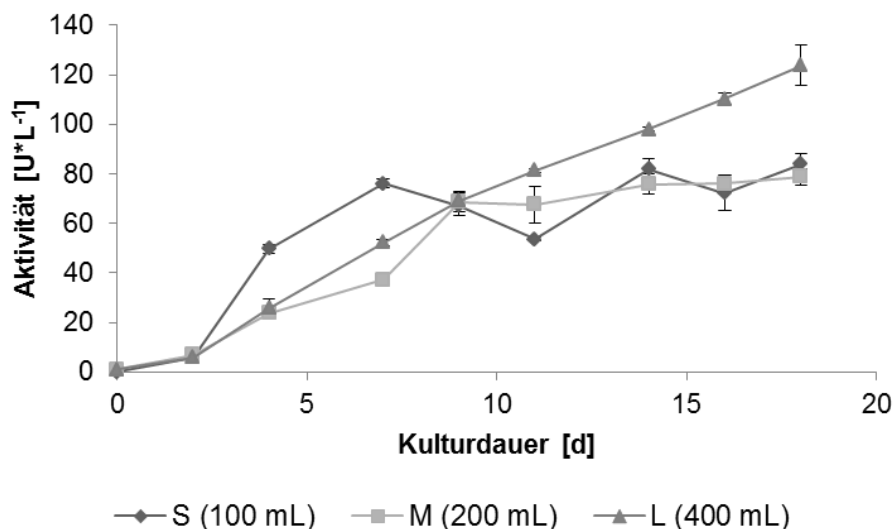


Abbildung 3.16 pNPH-Aktivität der Kulturüberstände von *F. velutipes* in MEP-Medium unter Zusatz von Butter in verschiedenen Kulturvolumina. (Die Messungen erfolgten in Dreifachbestimmung mittels Esteraseassay, die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung)

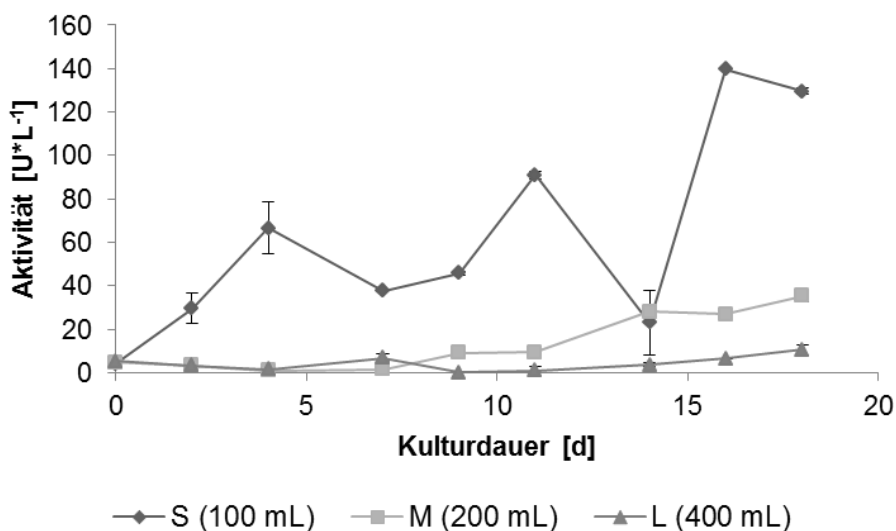


Abbildung 3.17 pNPO-Aktivität der Kulturüberstände von *P. citrinopileatus* in MEP-Medium unter Zusatz von Fett aus Quark in verschiedenen Kulturvolumina. (Die Messungen erfolgten in Dreifachbestimmung mittels Esteraseassay, die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung)

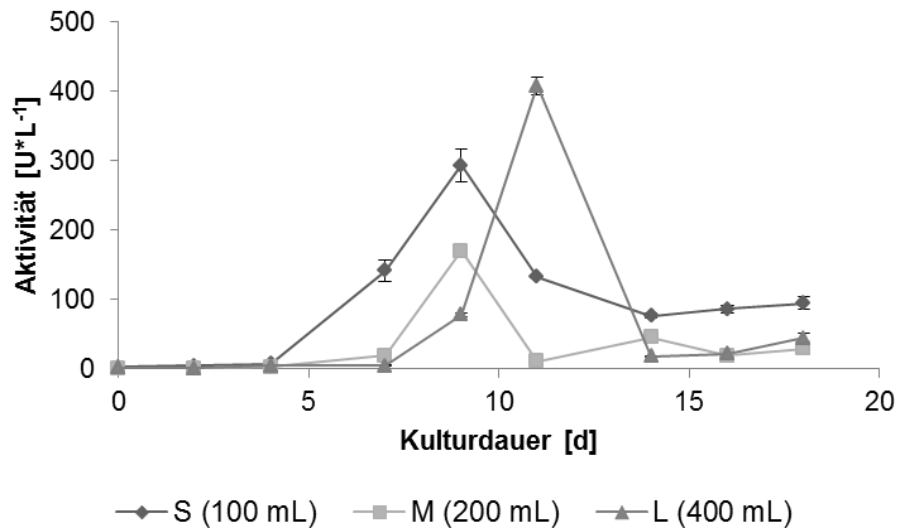


Abbildung 3.18 pNPO-Aktivität der Kulturüberstände von *P. eryngii* in MEP-Medium unter Zusatz von Butterschmalz in verschiedenen Kulturvolumina. (Die Messungen erfolgten in Dreifachbestimmung mittels Esteraseassay, die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung)

3.2.2 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Neben den Aktivitäten wurden auch die Proteinkonzentrationen in den Kulturüberständen der Basidiomyceten *F. velutipes*, *P. citrinopileatus* und *P. eryngii* über den Verlauf der Kultivierung mittels Bradford-Assay (2.8.5) bestimmt.

In Abbildung 3.19 sind die Proteinkonzentrationen des Kulturüberstandes von *F. velutipes*, in Abbildung 3.20 von *P. citrinopileatus* und in Abbildung 3.21 von *P. eryngii* in verschiedenen Medien und in MEP-Medium unter Zusatz verschiedener Induktoren über den Verlauf der Kultivierung aufgeführt.

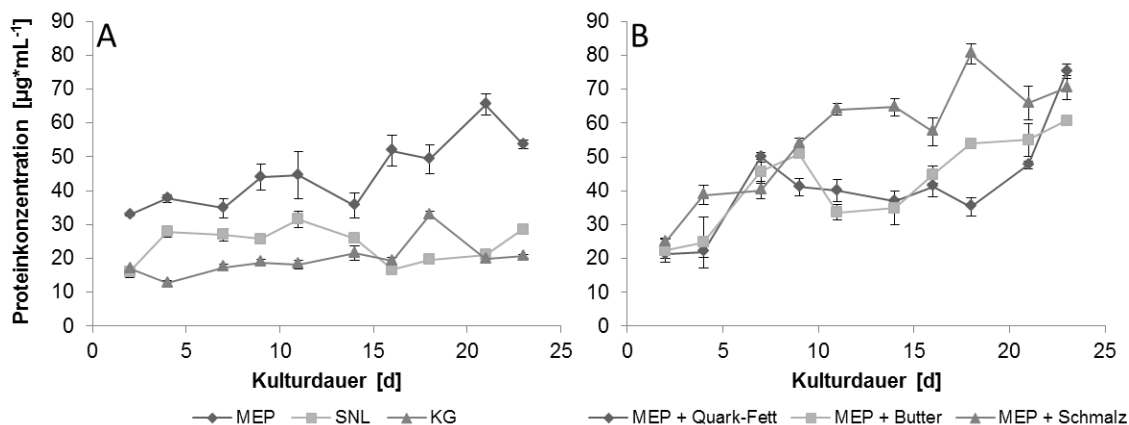


Abbildung 3.19 Proteinkonzentration der Kulturüberstände von *F. velutipes* in verschiedenen Medien (A) und in MEP-Medium mit verschiedenen Induktoren (B) über den Verlauf der Kultivierung. (Die Messungen erfolgten in Dreifachbestimmung mittels Bradford-Assay, die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung)

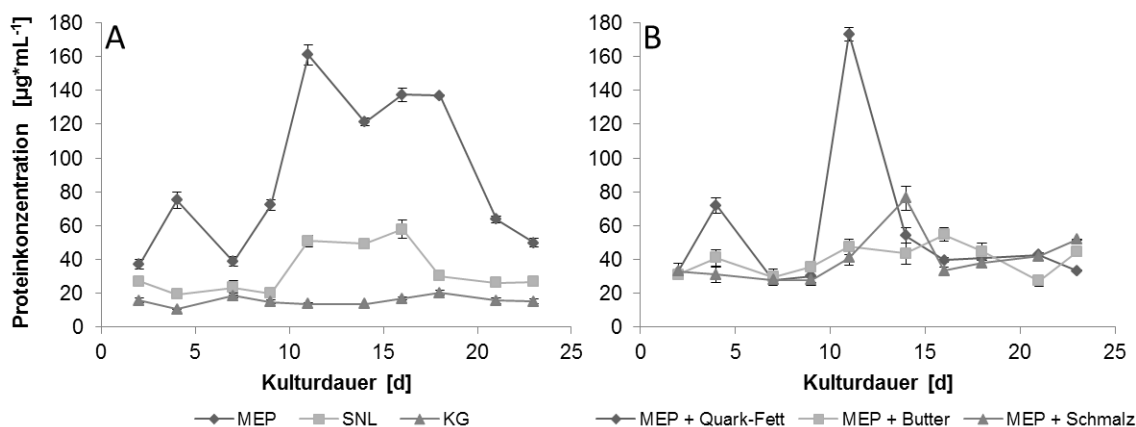


Abbildung 3.20 Proteinkonzentration der Kulturüberstände von *P. citrinopileatus* in verschiedenen Medien (A) und in MEP-Medium mit verschiedenen Induktoren (B) über den Verlauf der Kultivierung. (Die Messungen erfolgten in Dreifachbestimmung mittels Bradford-Assay, die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung)

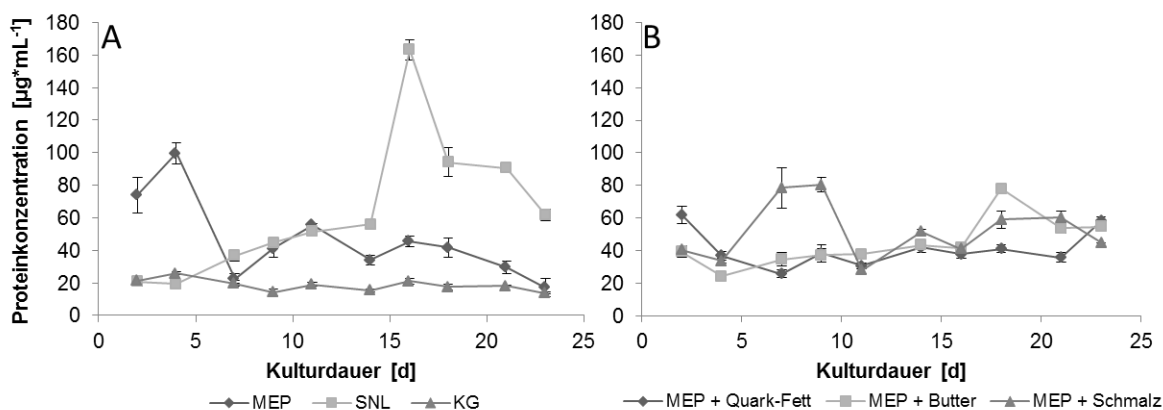


Abbildung 3.21 Proteinkonzentration der Kulturüberstände von *P. eryngii* in verschiedenen Medien (A) und in MEP-Medium mit verschiedenen Induktoren (B) über den Verlauf der Kultivierung. (Die Messungen erfolgten in Dreifachbestimmung mittels Bradford-Assay, die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung)

3.3 Reinigung und Konzentrierung von Enzympräparationen

3.3.1 Proteinreinigung mittels isoelektrisch fokussierter, präparativer Schaumfraktionierung

Abbildung 3.22 zeigt die Enzymaktivitäten im Kulturüberstand des Basidiomyceten *P. citrinopileatus* vor und nach der Schaumfraktionierung. Die Aktivität konnte mittels Schaumfraktionierung deutlich gesteigert werden.

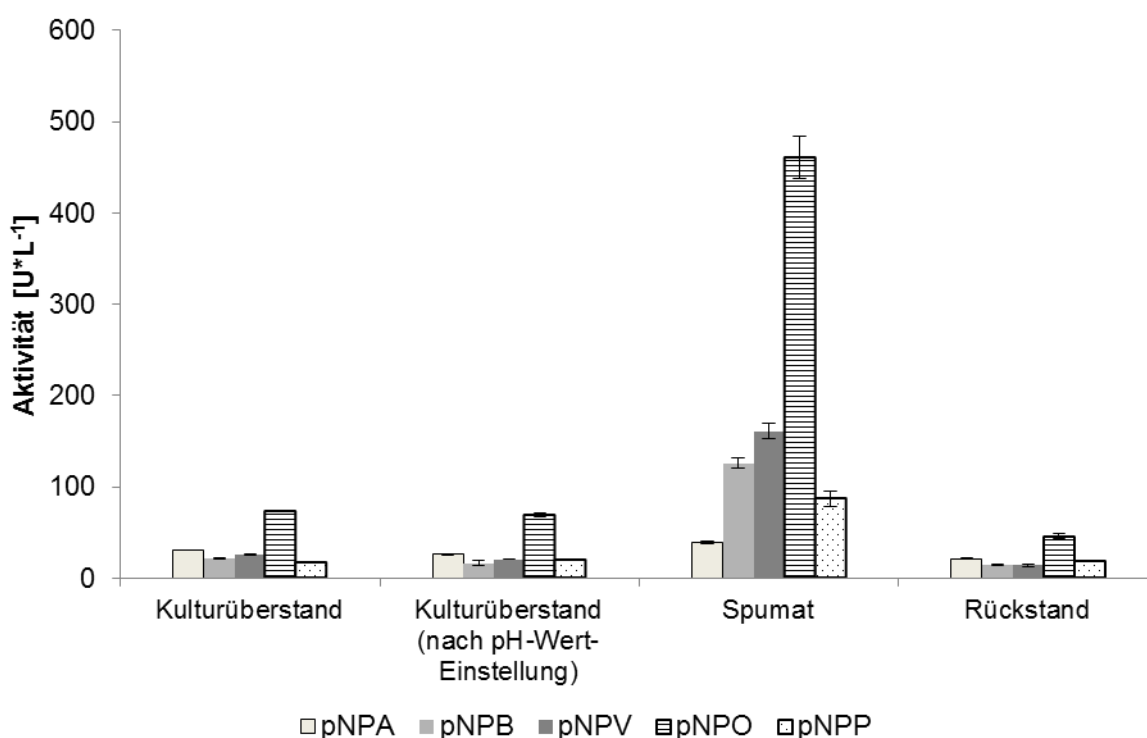


Abbildung 3.22 Esterase- bzw. Lipaseaktivität des Kulturüberstandes von *P. citrinopileatus* vor und nach der Schaumfraktionierung. (Die Messungen erfolgten in Dreifachbestimmung mittels Esterase- und Lipaseassay, die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung)

In Abbildung 3.23 sind die entsprechenden Fraktionen auf einem IEF-Gel aufgetragen dargestellt. Anhand der Coomassie-Färbung wurde eine Konzentrierung sehr deutlich, da nur in der Schaumfraktion Banden erkennbar waren. Mittels Aktivitätsfärbung wurden die Banden der Schaumfraktion intensiver.

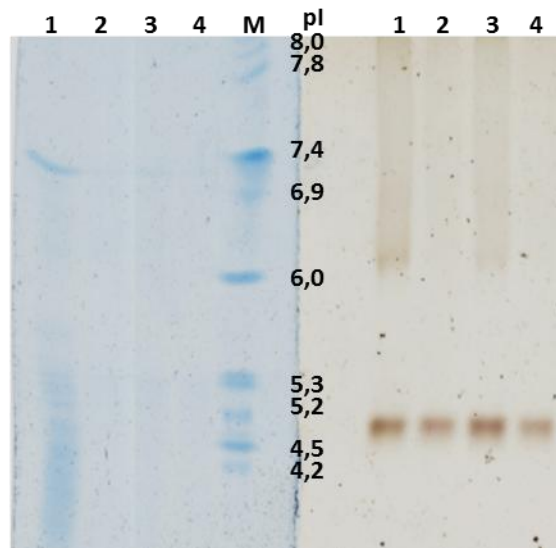


Abbildung 3.23 IEF-Gel mit Fraktionen des Kulturüberstandes von *P. citrinopileatus* vor und nach der Schaumfraktionierung. Links kolloidale Coomassie-Färbung und rechts Aktivitätsfärbung (α -Naphthylacetat) mit folgender Auftragung: Schaumfraktion (1), Rückstand (2), Kulturüberstand nach pH-Einstellung (3), Kulturüberstand vor pH-Einstellung (4), Marker (M)

Die Bilanzierung der Schaumfraktionierung des Kulturüberstandes von *P. citrinopileatus* ist in Tabelle 3.1 anhand der Aktivität gegenüber pNPO festgehalten. Die Proteinausbeute betrug 8,8% und es wurde eine Anreicherung um den Faktor 6,7 erzielt.

Tabelle 3.1 Bilanzierung der Schaumfraktionierung des Kulturüberstandes von *P. citrinopileatus*

	Kulturüberstand	Schaumfraktion	Rückstand
Volumen [mL]	115	2	110
pNPO-Aktivität [$\text{U}\cdot\text{L}^{-1}$]	69	461	46
Proteinkonzentration [$\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$]	31	158	18
Proteinausbeute [%]		8,8	
Wiederfindung der Aktivität [%]		11,6	
Anreicherungsfaktor		6,7	

Eine Schaumfraktionierung des Kulturüberstandes von *F. velutipes* blieb ohne Erfolg.

3.3.2 Proteinreinigung mittels Ammoniumsulfatfällung

Anhand durchgeführter fraktionierter Fällungen mittels Ammoniumsulfat von 40% bis 100% Sättigung wurde eine optimale Sättigung für *F. velutipes* von 70% und für *P. citrinopileatus* von 60% ermittelt. Im Anschluss an die Fällung wurden die resuspendierten Pellets mittels Vivaflow200 konzentriert und entsalzt. Erfolgte im Anschluss an die Fällung eine Reinigung mittels FPLC, so wurden vor der Konzentrierung und dem Entsalzen mittels Vivaflow200 Bestandteile >300 kDa mittels Ultrasette entfernt.

3.3.3 Chromatographische Reinigung der Zielenzyme mittels FPLC

3.3.3.1 Anionenaustauschchromatographie

Die erste Stufe der Proteinreinigung mittels FPLC bestand aus einer Reinigung mittels schwachem Anionenaustauscher. Die erhaltenen Fraktionen wurden auf Esteraseaktivität untersucht. Aktive Fraktionen wurden anschließend nach 2.9.4 konzentriert und umgepuffert und zum zweiten Reinigungsschritt mittels Größenausschlusschromatographie eingesetzt. In Abbildung 3.24 und Abbildung 3.25 sind die entsprechenden Chromatogramme nach der schwachen Anionenaustausch-chromatographie für *F. velutipes* und *P. citrinopileatus* mit den entsprechenden esteraseaktiven Fraktionen, als graue Balken eingezeichnet, dargestellt.

Die Bestimmung der nachfolgend aufgeführten Aktivitäten erfolgte für *F. velutipes* mit dem bevorzugt umgesetzten Substrat pNPH. *P. citrinopileatus* hingegen setzte bevorzugt das Substrat pNPO um, welches für die Ermittlung der Aktivität zum Einsatz kam.

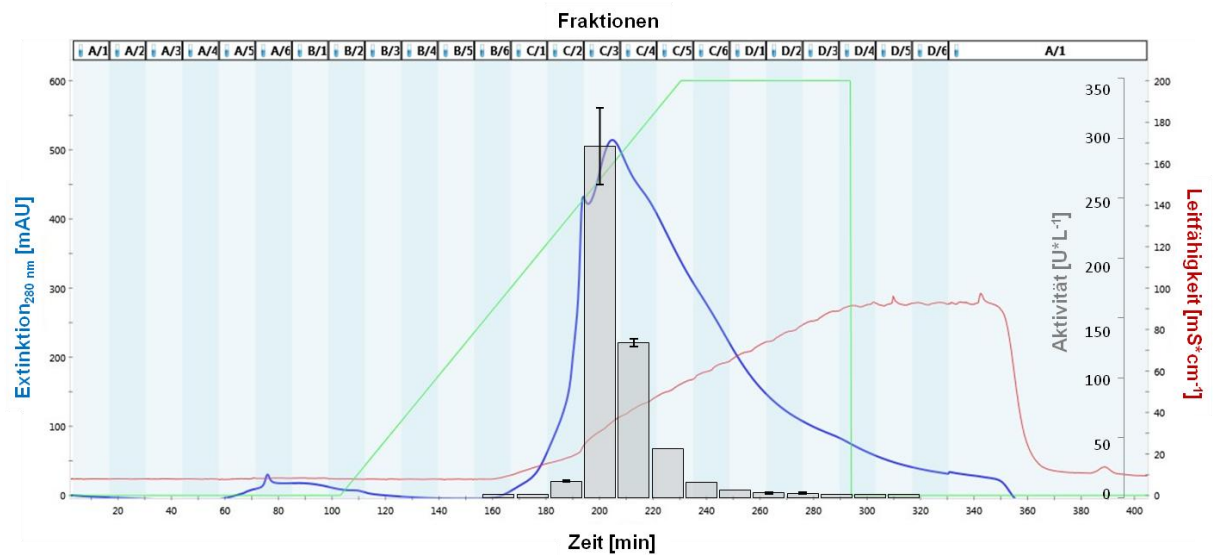


Abbildung 3.24 FPLC-Chromatogramm nach schwachem Anionenaustauscher (IEX) mit Kulturüberstand von *F. velutipes*, Fraktionen mit Esteraseaktivität bezogen auf das Substrat pNPH sind als graue Balken eingezeichnet

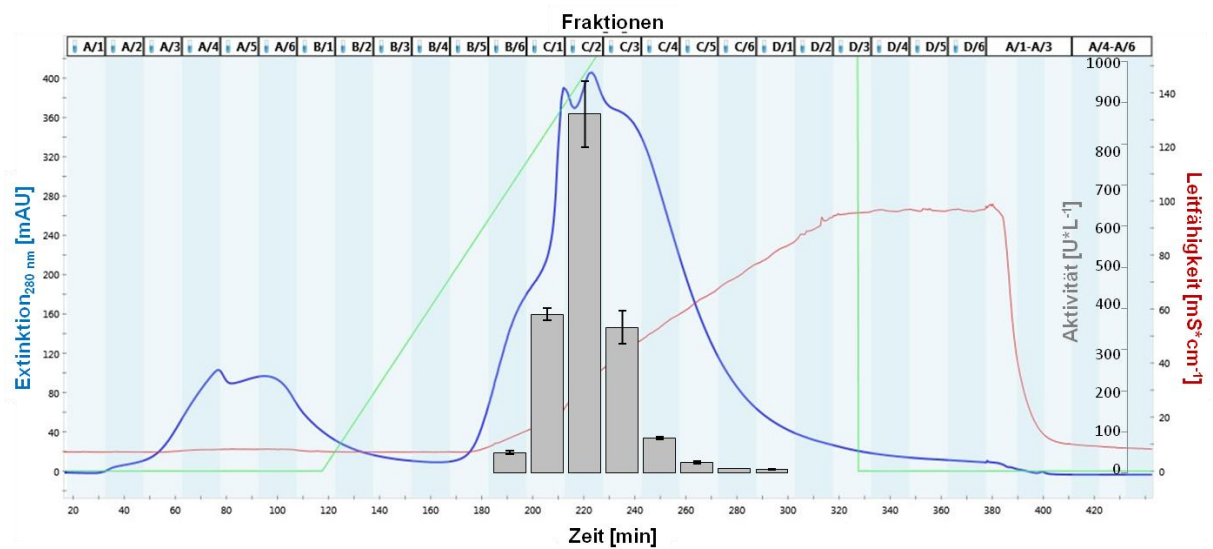


Abbildung 3.25 FPLC-Chromatogramm nach schwachem Anionenaustauscher (IEX) mit Kulturüberstand von *P. citrinopileatus*, Fraktionen mit Esteraseaktivität bezogen auf das Substrat pNPO sind als graue Balken eingezeichnet

3.3.3.2 Größenausschlusschromatographie

Die erhaltenen aktiven Fraktionen nach der ersten Reinigungsstufe wurden konzentriert und auf den Puffer der zweiten Reinigungsstufe umgepuffert. Mittels Esterase-Assay wurden die Aktivitäten der einzelnen Fraktionen bestimmt. Abbildung 3.26 zeigt ein Chromatogramm des Kulturüberstandes von *F. velutipes* nach der zweiten Reinigungsstufe: die grauen Balken stehen für die ermittelte Esteraseaktivität bezogen auf das Substrat pNPH. Signifikante Aktivität verteilte sich auf vier Fraktionen. In Abbildung 3.27 ist das Chromatogramm des Kulturüberstandes von *P. citrinopileatus* nach der Größenausschlusschromatographie mit den aktiven Fraktionen dargestellt. Die Aktivität verteilte sich in diesem Fall auf 13 Fraktionen und wurde mittels pNPO als Substrat nachgewiesen.

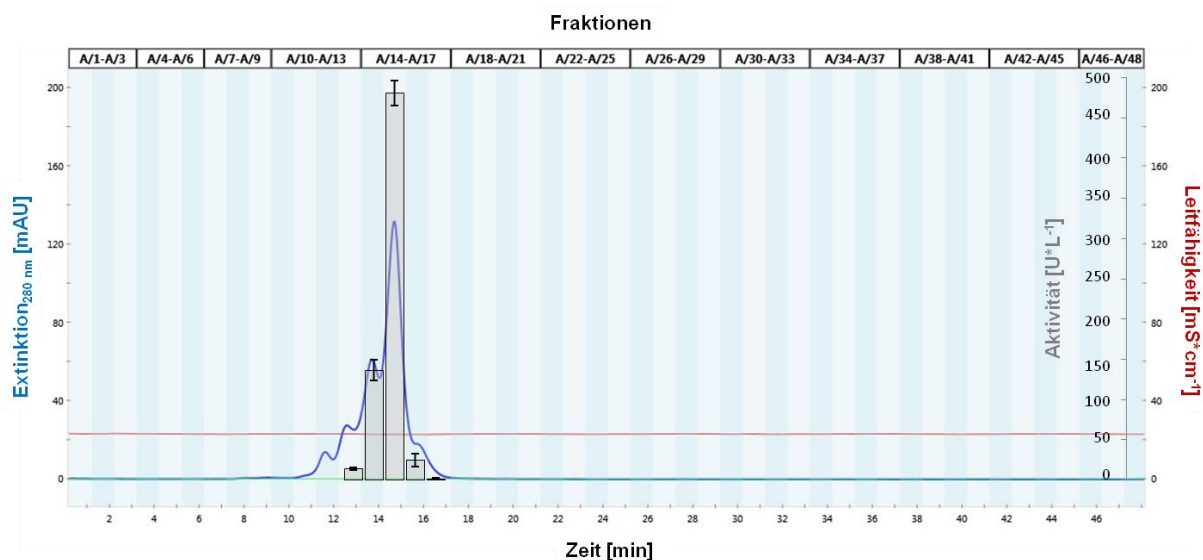


Abbildung 3.26 FPLC-Chromatogramm nach Größenausschlusschromatographie (SEC) mit Kulturüberstand von *F. velutipes*, Fraktionen mit Esteraseaktivität bezogen auf das Substrat pNPH sind als graue Balken eingezeichnet

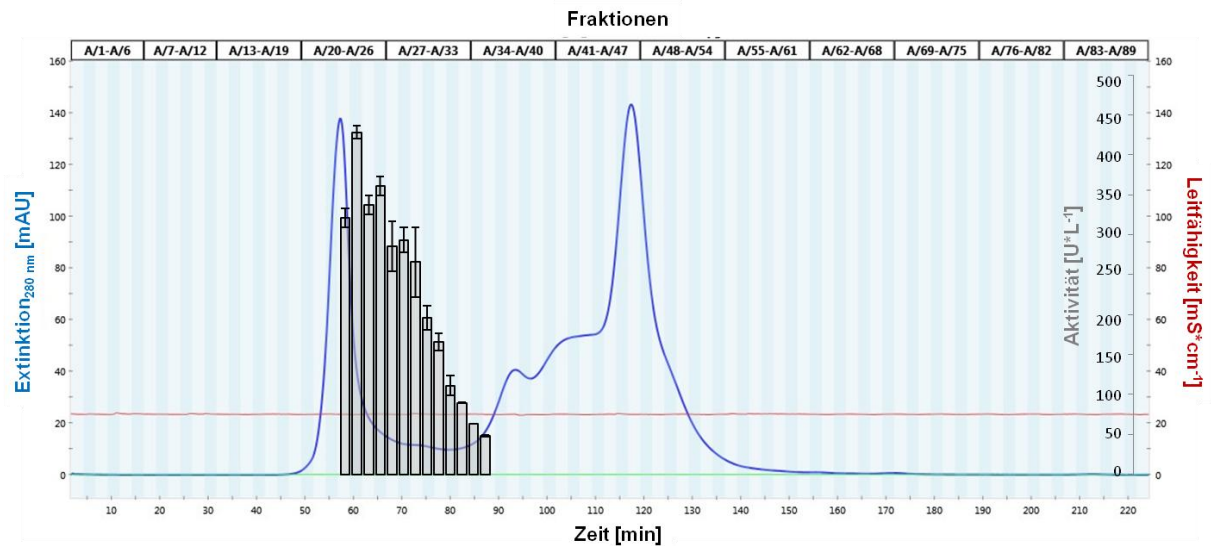


Abbildung 3.27 FPLC-Chromatogramm nach Größenausschlusschromatographie (SEC) mit Kulturüberstand von *P. citrinopileatus*, Fraktionen mit Esteraseaktivität bezogen auf das Substrat pNPO sind als graue Balken eingezeichnet

Mithilfe eines Molekülmassenstandards, konnten die molekularen Massen der Proteine in den aktiven Fraktionen von *F. velutipes* und *P. citrinopileatus* berechnet werden. Die entsprechenden molekularen Massen sind in den Tabelle 3.2 und Tabelle 3.3 aufgeführt.

Tabelle 3.2 Berechnete Molekülmassen der Fraktionen 14 bis 16 von *F. velutipes* der Größenausschlusschromatographie

Fraktionen	Berechnete Molekülmasse [kDa]
14	71
15	35
16	17

Tabelle 3.3 Berechnete Molekülmasse der Fraktionen 24 bis 29 von *P. citrinopileatus* der Größenausschlusschromatographie

Fraktionen	Berechnete Molekülmasse [kDa]
24	> 670
25	> 670
26	> 670
27	646
28	546
29	423

3.3.4 Charakterisierung aktiver Fraktionen der FPLC mittels elektro-phoretischer Methoden

Signifikante Esteraseaktivität wurde für *F. velutipes* in den Fraktionen 14 bis 16 detektiert. Diese Fraktionen wurden zur näheren Charakterisierung der Esterasen und Lipasen mittels halbnativer und denaturierender SDS-PAGE analysiert.

In der Abbildung 3.28 ist ein denaturierendes SDS-PAGE-Gel, welches mit Coomassie-Färbung gefärbt wurde, dargestellt. Abbildung 3.29 zeigt ein halbnatives SDS-PAGE-Gel zum einen mit Coomassie-Färbung und zum anderen mit Esterase-Aktivitätsfärbung. Vor der Auftragung wurden die Fraktionen nach 2.9.4 konzentriert und entsalzt. In beiden Gelen sind jeweils mehrere Banden mit Molekülmassen zwischen 17 und 130 kDa zu erkennen.

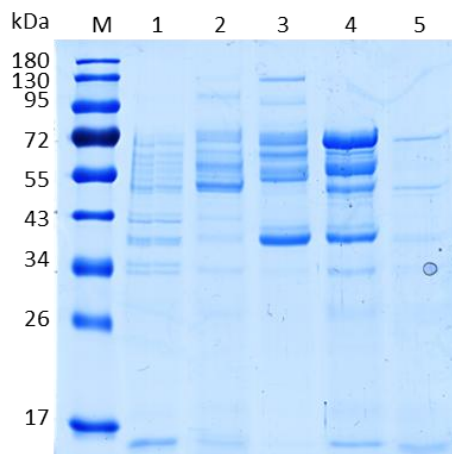


Abbildung 3.28 Denaturierende SDS-PAGE der esteraseaktiven Fraktionen von *F. velutipes* nach Reinigung mittels FPLC, Coomassie-Färbung, Auftragung: Marker (M), Konzentrat nach Vivaflow200 (1), Fraktion C4 nach schwachem Anionenaustauscher (2), Fraktionen 14, 15 und 16 nach Größenausschlusschromatographie (3, 4, 5)

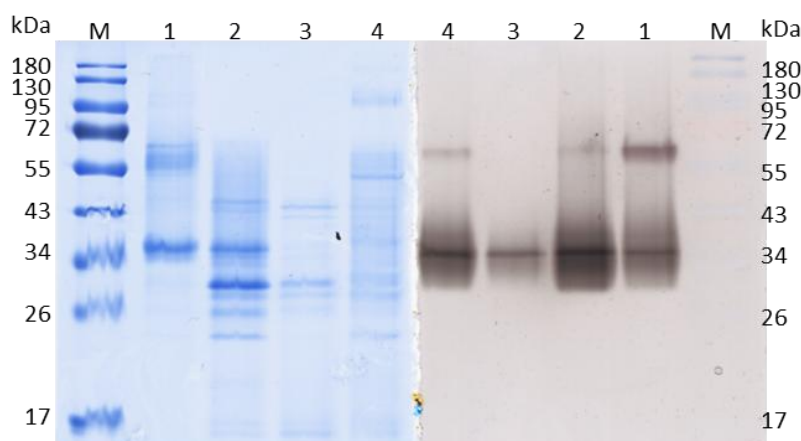


Abbildung 3.29 Halbnative SDS-PAGE der esteraseaktiven Fraktionen von *F. velutipes* nach Reinigung mittels FPLC; Coomassie-Färbung (links), Aktivitätsfärbung mit Naphthylbutyrat (rechts); Auftragung: Marker (M), Fraktionen 14, 15 und 16 nach Größenausschlusschromatographie (1, 2, 3), Fraktion C4 nach schwachem Anionenaustauscher (4)

Analog wurde mit den aktiven Fraktionen von *P. citrinopileatus* verfahren. Signifikante Esteraseaktivität wurde in den Fraktionen 23 bis 29 detektiert. Diese Fraktionen wurden zur näheren Charakterisierung der Esterasen und Lipasen mittels nativer PAGE und denaturierender SDS-PAGE analysiert.

In Abbildung 3.30 ist ein denaturierendes SDS-PAGE-Gel, welches mit Coomassie-Färbung gefärbt wurde, dargestellt. Abbildung 3.31 zeigt das Gel einer nativen PAGE zum einen mit Coomassie-Färbung und zum anderen, mit Esterase-Aktivitätsfärbung. Vor der Auftragung wurden die Fraktionen nach 2.9.4 konzentriert und entsalzt. In beiden Gelen sind jeweils

mehrere Banden mit Molekülmassen zwischen 34 und 180 kDa bzw. zwischen 45 und 545 kDa zu erkennen.

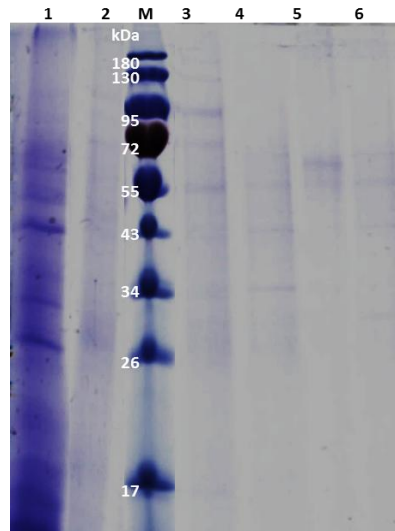


Abbildung 3.30 Denaturierende SDS-PAGE der esteraseaktiven Fraktionen von *P. citrinopileatus* nach Reinigung mittels FPLC, Coomassie-Färbung, Auftragung: Fraktion C2 nach schwachem Anionenaustauscher (1), Fraktionen 23-29 gepoolt nach Größenausschlusschromatographie (2), Marker (M), Fraktion 24, 25, 26 und 27 nach Größenausschlusschromatographie (3, 4, 5, 6)

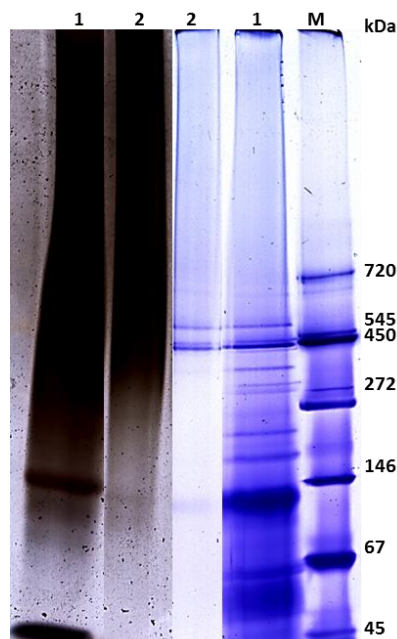


Abbildung 3.31 Native PAGE der esteraseaktiven Fraktionen von *P. citrinopileatus* nach Reinigung mittels FPLC; Aktivitätsfärbung mit Naphthylbutyrat (links); Coomassie-Färbung (rechts), Auftragung: Fraktion C2 nach schwachem Anionenaustauscher (1), Fraktionen 23-29 gepoolt nach Größenausschlusschromatographie (2), Marker (M)

Sowohl bei *F. velutipes* als auch bei *P. citrinopileatus* waren im Gel der denaturierenden SDS-PAGE auch nach mehrstufiger Reinigung mehrere Banden zu erkennen.

Die Bestimmung der entsprechenden isoelektrischen Punkte der Zielenzyme von *F. velutipes* und *P. citrinopileatus* erfolgte mittels isoelektrischer Fokussierung. In Abbildung 3.32 ist ein IEF-Gel, zum einen mit Coomassie-Färbung und zum anderen mit Esterase-Aktivitätsfärbung, dargestellt. Für das Zielenzym aus dem Kulturüberstand von *F. velutipes* lag der isoelektrische Punkt zwischen 3,5 und 4,3 und für das Zielenzym aus dem Kulturüberstand von *P. citrinopileatus* bei ca. 6,3.

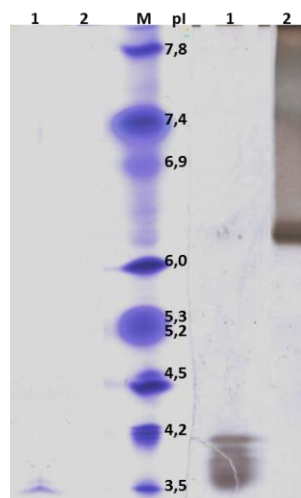


Abbildung 3.32 IEF-Gel der esteraseaktiven Fraktionen von *F. velutipes* und *P. citrinopileatus* nach Reinigung mittels FPLC; Coomassie-Färbung (links), Aktivitätsfärbung mit Naphthylbutyrat (rechts); Auftragung: Fraktion 15 nach Größenausschlusschromatographie von *F. velutipes* (1), Fraktionen 23-29 gepoolt nach Größenausschlusschromatographie von *P. citrinopileatus* (2), Marker (M)

Durch die Reinigung der Kulturüberstände von *F. velutipes* und *P. citrinopileatus* konnte eine Steigerung der spezifischen Aktivität erreicht werden. Dies spiegelt sich bei *F. velutipes* in einem Anreicherungsfaktor von 22,9 und bei *P. citrinopileatus* von 19,5 wider (Tabelle 3.4 und Tabelle 3.5).

Tabelle 3.4 Bilanzierung der Reinigung des Kulturüberstandes von *F. velutipes* mittels FPLC

	Proteingehalt [mg]	Aktivität [U]	spez. Aktivität [U*mg ⁻¹]	Reinigungs- faktor
Kulturüberstand	1960,9	128,1	0,07	1,0
gelöstes Pellet nach Ammoniumsulfatfällung	526,0	36,8	0,07	1,0
Filtrat nach Ultrasette™	632,9	27,4	0,04	0,6
Retentat nach Vivaflow200	102,8	18,3	0,18	2,6
IEX Fraktion C4	3,1	3,9	1,3	18,6
SEC Fraktion C4 15	0,3	0,5	1,6	22,9

Tabelle 3.5 Bilanzierung der Reinigung des Kulturüberstandes von *P. citrinopileatus* mittels FPLC

	Proteingehalt [mg]	Aktivität [U]	spez. Aktivität [U*mg ⁻¹]	Reinigungs- faktor
Kulturüberstand	315,4	135,6	0,4	1,0
gelöstes Pellet nach Ammoniumsulfatfällung	208,9	215,8	1,0	2,5
Filtrat nach Ultrasette™	198,6	91,0	0,5	1,3
Retentat nach Vivaflow200	58,4	70,9	1,2	3,0
IEX Fraktion C2	3,4	26,2	7,7	19,3
SEC Fraktion C2 24-29	0,5	3,9	7,8	19,5

3.4 Biochemische Charakterisierung der Zielenzyme

3.4.1 Bestimmung des pH-Optimums

Die Bestimmung des pH-Optimums erfolgte in einem Bereich von pH 5 bis pH 11 in Schritten von 0,5 pH-Einheiten. Dazu wurden ein Kaliumphosphatpuffer (80 mM) und ein Natriumcarbonatpuffer (100 mM) eingesetzt. Sowohl für das Zielenzym aus *F. velutipes* als auch für das Enzym aus *P. citrinopileatus* wurde ein Optimum von pH 8,5 in beiden Puffern bestimmt. Aus Abbildung 3.33 wird ersichtlich, dass die Aktivität über einen breiten pH-Bereich von 7,5 bis 9,5 ca. 80% der maximalen Aktivität beträgt.

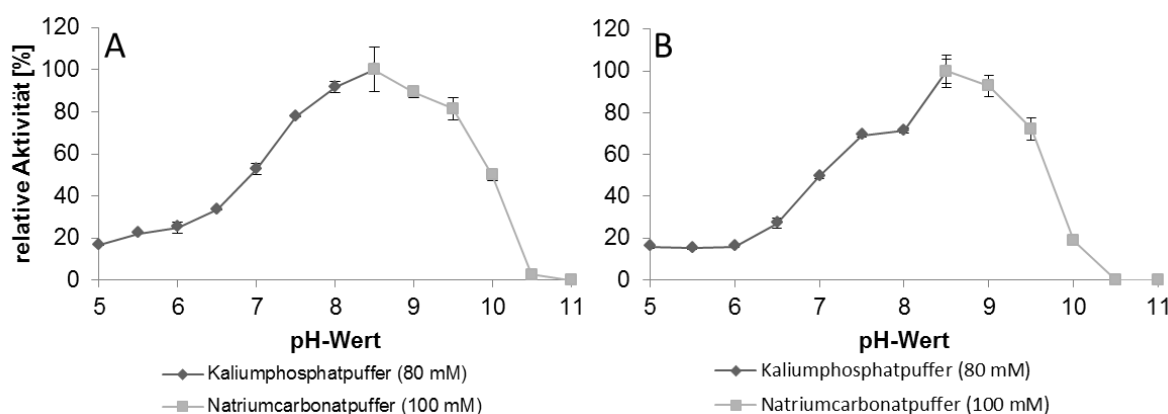


Abbildung 3.33 Relative Aktivität der Zielenzyme aus *F. velutipes* (A) und *P. citrinopileatus* (B) in Abhängigkeit vom pH-Wert. (Die Messungen erfolgten in Dreifachbestimmung mittels Esteraseassay, die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung)

3.4.2 Bestimmung des Temperaturoptimums

Die Abhängigkeit der Aktivität der Zielenzyme aus *F. velutipes* und *P. citrinopileatus* von der Temperatur wurde anhand des Esteraseassays mit den Substraten pNPH und pNPO bestimmt. Dazu wurde der Assay in einem Temperaturbereich von 25 °C bis 65 °C in 5 °C-Schritten durchgeführt. Für die Zielenzyme beider Basidiomyceten wurde eine optimale Temperatur von 60 °C ermittelt, welche bei *P. citrinopileatus* deutlich ausgeprägter war als bei *F. velutipes* (Abbildung 3.34).

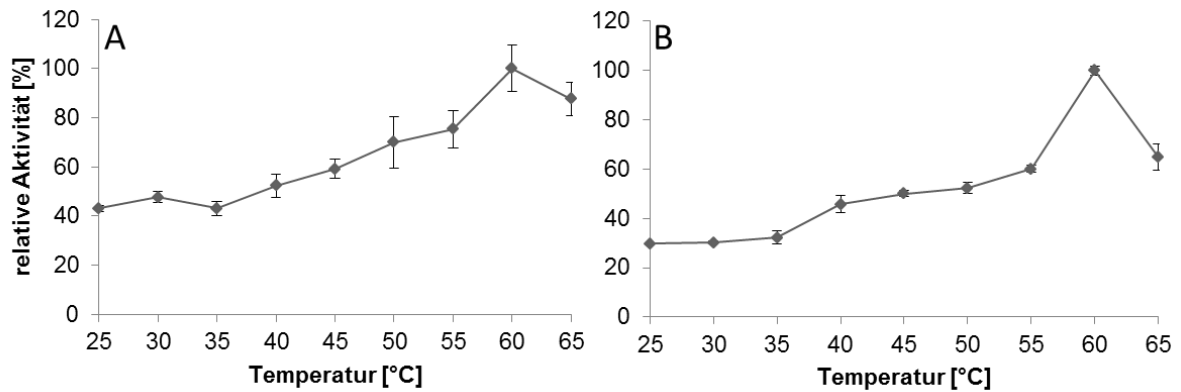


Abbildung 3.34 Relative Aktivität der Zielenzyme aus *F. velutipes* (A) und *P. citrinopileatus* (B) in Abhängigkeit von der Temperatur. (Die Messungen erfolgten in Dreifachbestimmung mittels Esteraseassay, die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung)

3.4.3 Bestimmung der Salztoleranz

3.4.3.1 Einfluss von Natriumchlorid

Der Prozess der Proteinreinigung umfasste den Einsatz salzhaltiger Pufferlösungen. Daher wurde Kaliumphosphatpuffer mit Natriumchlorid-Konzentrationen von 0 bis 1 M für die Bestimmung der Salztoleranz mittels Esteraseassay eingesetzt. In Abbildung 3.35 sind die relativen Aktivitäten der Enzyme aus *F. velutipes* und *P. citrinopileatus* mit steigender Salzkonzentration dargestellt. Die maximale Aktivität von *F. velutipes* lag bei einem Zusatz von 0,2 M. Bei einer Salzkonzentration von 1 M betrug die Aktivität noch ca. 70%. Bei *P. citrinopileatus* lag die Aktivität bis auf eine Salzkonzentration von 0,8 M oberhalb von 80%. Das Maximum wurde mit einem Salzgehalt von 1 M erreicht.

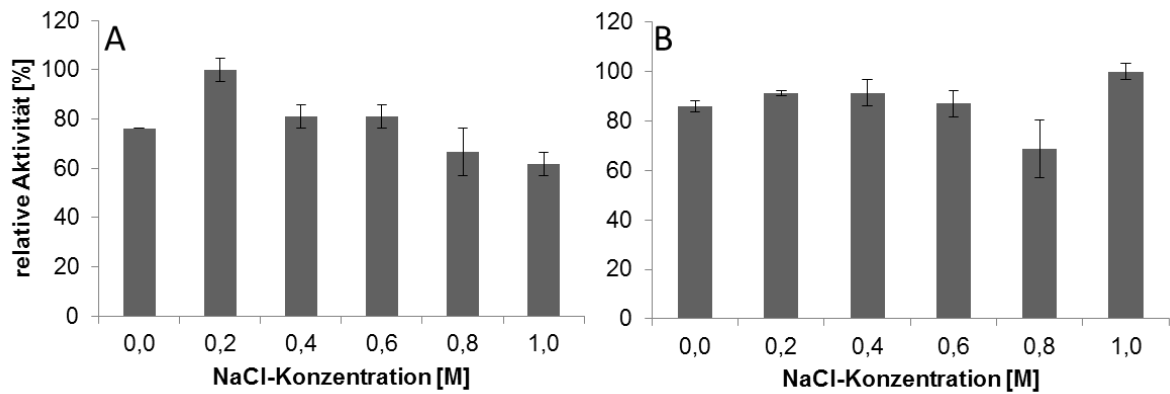


Abbildung 3.35 Relative Aktivität der Zielenzyme aus *F. velutipes* (A) und *P. citrinopileatus* (B) in Abhängigkeit von der Natriumchlorid-Konzentration. (Die Messungen erfolgten in Dreifachbestimmung mittels Esteraseassay, die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung)

3.4.3.2 Einfluss von Ammoniumsulfat

Der Zusatz von Ammoniumsulfat führte zu einer Aktivitätsabnahme; ab einer Konzentration von 0,8 M war keine valide Messung mehr möglich. Bei einer Konzentration von 0,6 M wurden noch Aktivitäten > 60% bestimmt (Abbildung 3.36).

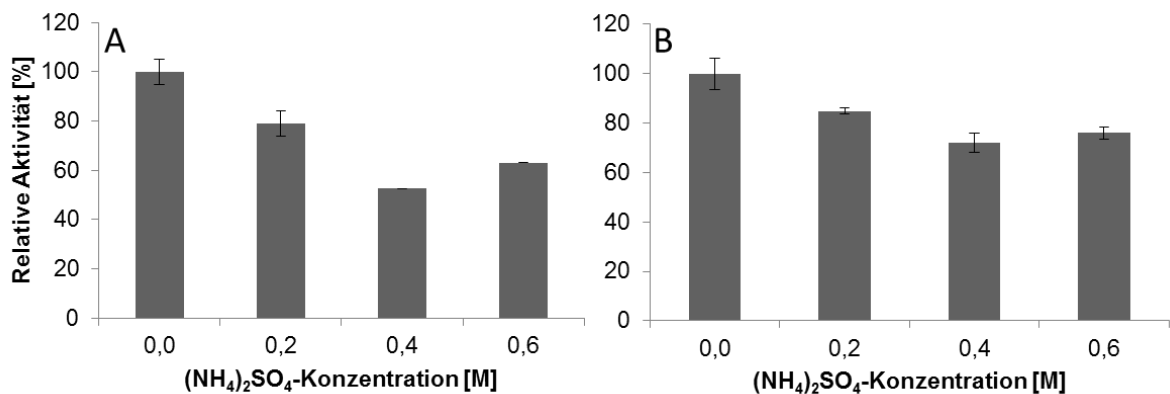


Abbildung 3.36 Relative Aktivität der Zielenzyme aus *F. velutipes* (A) und *P. citrinopileatus* (B) in Abhängigkeit von der Ammoniumsulfat-Konzentration. (Die Messungen erfolgten in Dreifachbestimmung mittels Esteraseassay, die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung)

3.4.4 Bestimmung der Enzymstabilität

3.4.4.1 Temperaturstabilität

Die Stabilität der Enzyme wurde bei 24 °C, 37 °C und 60 °C über einen Zeitraum von 0 bis 24 h getestet. Bei Temperaturen von 24 °C und 37 °C hatte das Enzym aus *F. velutipes* bereits nach 1 h ca. 50% seiner Anfangsaktivität verloren, welche aber auch nach 24 h noch bestimmt werden konnte. Bei einer Temperatur von 60 °C war nach 1 h keine nennenswerte Aktivität mehr nachweisbar. Die gereinigte Enzymfraktion aus *P. citrinopileatus* zeigte nach 1 h bei 24 °C noch ca. 80% der maximalen Aktivität, nach 24 h noch ca. 55%. Bei 37 °C wurden nach 1 h lediglich ca. 20% der Aktivität nachgewiesen. Eine Inkubation bei einer Temperatur von 60 °C führte bereits nach 1 h zu einer Inaktivierung der enzymatischen Aktivität (Abbildung 3.37).

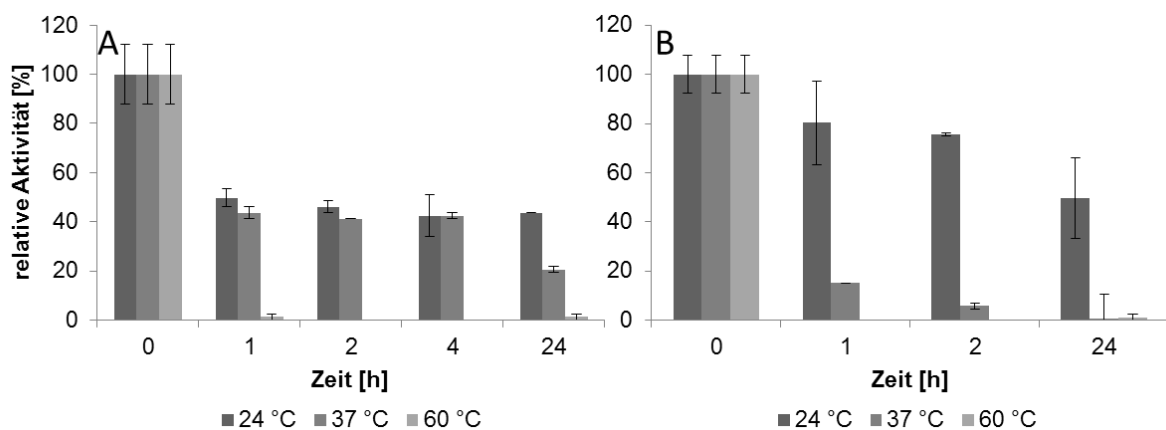


Abbildung 3.37 Relative Aktivität der Zielenzyme aus *F. velutipes* (A) und *P. citrinopileatus* (B) in Abhängigkeit von der Zeit (0 h, 1 h, 4 h und 24 h) und Temperatur (24 °C, 37 °C und 60 °C). (Die Messungen erfolgten in Dreifachbestimmung mittels Esteraseassay, die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung)

3.4.4.2 Lagerstabilität in Abhängigkeit von der Temperatur

Die Stabilität der Enzyme in Abhängigkeit von der Temperatur wurde bei einer Lagerung von 4 °C, -20 °C und -80 °C über mehrere Wochen getestet. Dazu wurden Aliquote der gereinigten Enzyme bei den entsprechenden Temperaturen eingefroren und die Aktivität nach dem Auftauen an definierten Tagen mittels Esteraseassay bestimmt. In Abbildung 3.38 sind die ermittelten Aktivitäten der Zielenzyme aus *F. velutipes* (A) und *P. citrinopileatus* (B) nach 0, 60, 94 und 121 Tagen dargestellt. Das Enzym aus *F. velutipes* verlor nach 60 Tagen bei einer Lagerung bei 4 °C ca. 30% der Aktivität, bei -20 °C und -80 °C betrug der Verlust ca. 60%. Nach 121 Tagen wurden bei einer Lagerung bei 4 °C noch 50% der Aktivität nachgewiesen, wohingegen bei -20 und -80 °C nur noch ca. 15% ermittelt werden konnten. Die Aktivität der Enzymfraktion aus *P. citrinopileatus* nahm über eine Lagerung von 121 Tagen weniger stark ab, außerdem war die Stabilität bei allen Temperaturen vergleichbar.

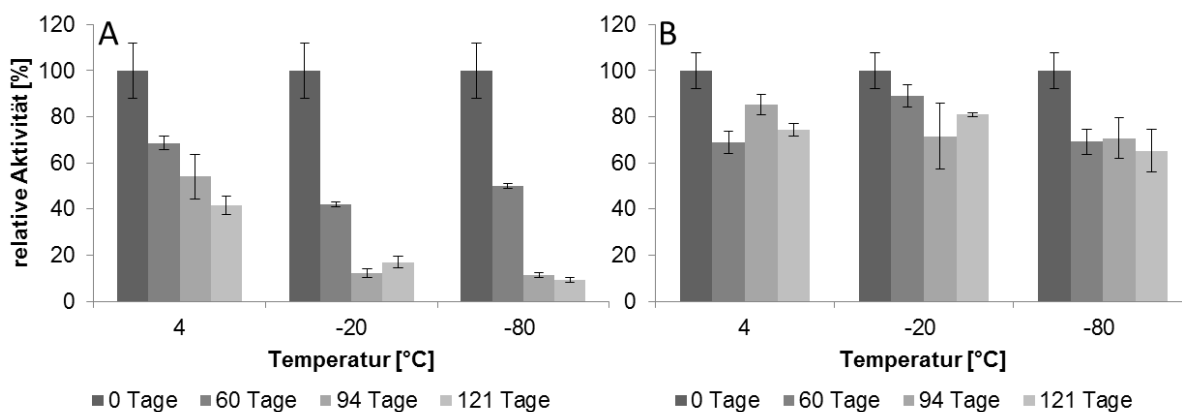


Abbildung 3.38 Relative Aktivität der Zielenzyme aus *F. velutipes* (A) und *P. citrinopileatus* (B) in Abhängigkeit von der Zeit (0 d, 60 d, 94 d und 121 d) und Temperatur (4 °C, -20 °C und -80 °C). (Die Messungen erfolgten in Dreifachbestimmung mittels Esteraseassay, die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung)

3.4.5 Bestimmung kinetischer Parameter

Zur Bestimmung der kinetischen Parameter K_M und v_{max} wurde für *F. velutipes* die Affinität zum Substrat pNPH und für *P. citrinopileatus* zu pNPO bestimmt, indem der Umsatz der entsprechenden Substrate bei konstanter Enzymkonzentration und variierender Substratkonzentration ermittelt wurde. Für die graphische Darstellung wurde die Aktivität gegen die Substratkonzentration aufgetragen (Abbildung 3.39). Durch Anlegen einer Hyperbel an die Messpunkte mit Hilfe des Programms OriginPro 9.3 konnte die Michaelis-Menten-Konstante K_M direkt abgelesen werden. Somit wurde für das Enzym aus *F. velutipes* gegenüber dem Substrat pNPH ein K_M von 1,79 mM und ein v_{max} von 0,45 $\mu\text{M min}^{-1}$ bestimmt. Für das Enzym aus *P. citrinopileatus* für das Substrat pNPO ergab sich eine Michaelis-Menten-Konstante von 2,5 mM und ein v_{max} von 9,34 $\mu\text{M min}^{-1}$.

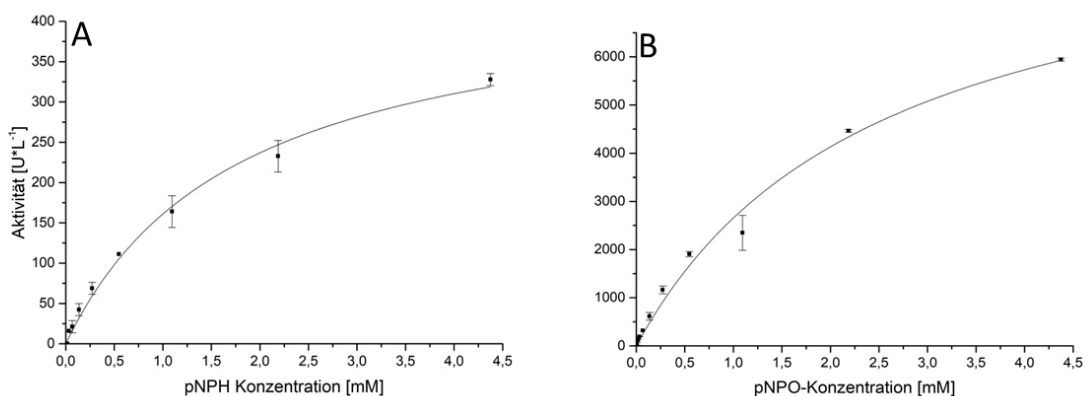


Abbildung 3.39 Auftragung der Aktivität in Abhängigkeit von der Substratkonzentration der Zielenzyme aus *F. velutipes* (A) und *P. citrinopileatus* (B). (Die Messungen erfolgten in Dreifachbestimmung mittels Esteraseassay, die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung)

3.5 Applikationstest am Käse

3.5.1 Aufarbeitung geeigneter Enzympräparationen für den Käseprozess

Für den Einsatz im Käseprozess wurden die Enzympräparationen von *F. velutipes* und *P. citrinopileatus* mittels Ammoniumsulfatfällung und anschließendem Konzentrieren und Entsalzen der gelösten Pellets mittels Vivaflow200 aufgearbeitet. In Abbildung 3.40 sind die Aktivitäten der verschiedenen Reinigungsstufen beider Basidiomyceten aufgeführt.

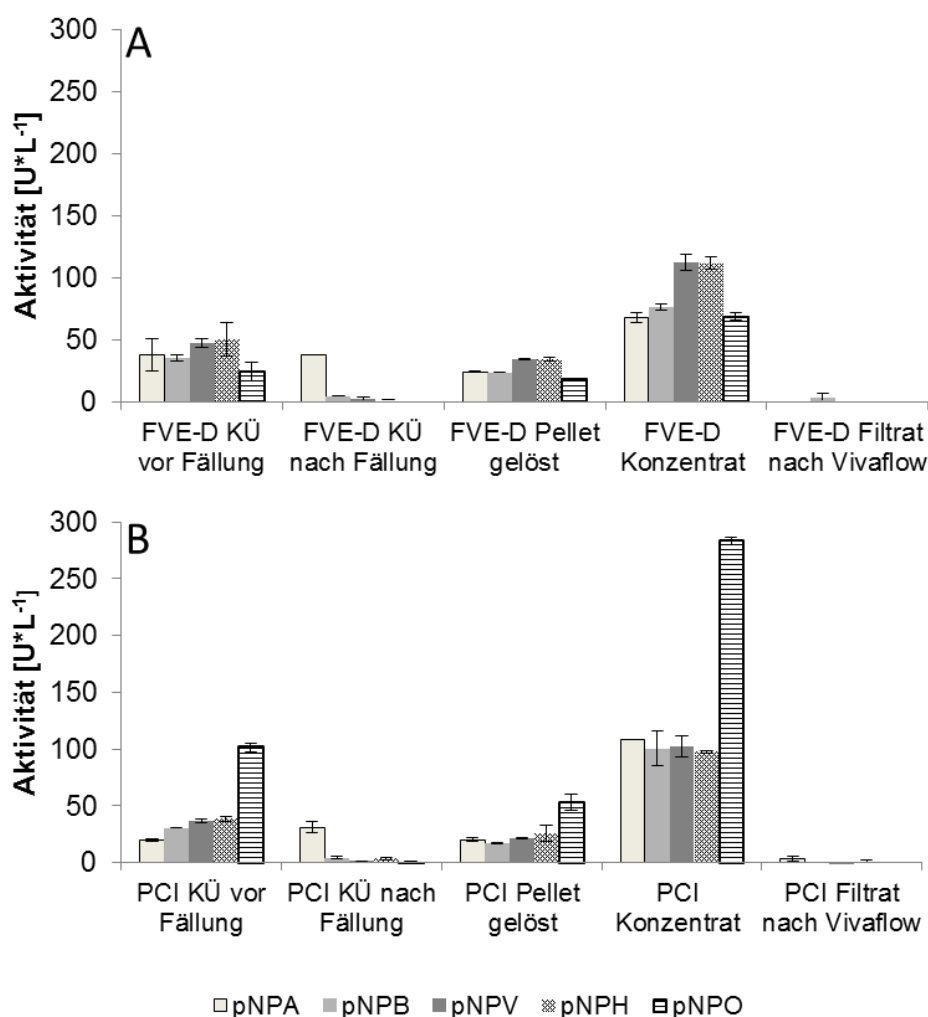


Abbildung 3.40 Esteraseaktivitäten der Kulturüberstände von *F. velutipes* (A) und *P. citrinopileatus* (B) nach verschiedenen Aufarbeitungsschritten für den Einsatz im Käseprozess. (Die Messungen erfolgten in Dreifachbestimmung mittels Esterase- und Lipaseassay, die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung)

3.5.2 Bestimmung sensorischer Eigenschaften

Insgesamt wurden sieben Versuchsreihen mit Lipasen aus unterschiedlichen Basidiomyceten und Reinigungen (Tabelle 2.53) durchgeführt und verkostet. Aufbauend auf den Ergebnissen der ersten Applikationstests wurden sowohl der Herstellungsprozess des Käses als auch die Aufarbeitung der Enzympräparationen optimiert und führten im fünften Applikationstest zu den gewünschten Geschmacksprofilen.

Nachfolgend sind die Ergebnisse der Sensorik der im fünften Applikationstest hergestellten Käse exemplarisch aufgeführt. Die Verkostungen der Proben des fünften Applikationstests erfolgten in insgesamt vier Runden am Institut für Lebensmittelchemie und -biotechnologie der JLU Gießen. Insgesamt nahmen fünf Personen des Arbeitskreises teil. Die wahrgenommenen sensorischen Eindrücke sind in den folgenden Tabellen zusammengefasst. Runde 1: Lagerung des Käses für 30 Tage bei 13 °C (Tabelle 3.6); Runde 2: Lagerung des Käses für 30 Tage bei 13 °C + 4 Wochen bei 4 °C (Tabelle 3.7); Runde 3: Lagerung des Käses für 30 Tage bei 13 °C + 8 Wochen bei 4 °C (Tabelle 3.8); Runde 4: Lagerung des Käses für 30 Tage bei 13 °C + 12 Wochen bei 4 °C (Tabelle 3.9).

Tabelle 3.6 Sensorische Eindrücke der ersten Verkostung des Käses des 5. Applikationstests nach 30 Tagen Lagerung bei 13 °C

Probenbezeichnung	Aussehen	Konsistenz	Geruch	Geschmack
Käse 1 ohne Lipase		etwas bröselig, weich, geschmeidig, bröckelig, etwas gummiartig, trocken, cremig, porös	neutral (2x), milchig (4x), säuerlich (2x), Feta	erst neutral, dann etwas milchig (2x), im Abgang leicht sauer, mild, im Abgang aromatisch, sauer (2x), würzig, angenehm, Feta, ranzig
Käse 2 opti-zym z10uc		etwas bröselig, weich, geschmeidig, bröckelig, etwas gummiartig, trocken, stumpf, cremig	Ziege (3x), sauer, pikant, milchig (2x), säuerlich, käsig	angenehme Säure, pikant, nicht direkt nach Ziege, mild, im Abgang aromatisch, ganz leicht säuerlich, milchig, sauer, würzig, Feta, frisch
Käse 3 Piccantase® KLC	cremefarben (3x) ^a , leicht gelblich, weiß-gelblich	bröseliger als P1 und P2, weich, etwas gummiartig, bröckelig, porös, cremig	(schwach) milchig (3x), leicht nach Ziege, neutral, säuerlich, käsig, ranzig	neutral, mit leicht pikanter Note, etwas saurer als P2, mild, zum Ende hin leicht bitter, milchig (2x), sauer, weniger intensiv als P1 und P2, etwas fade, sahnig
Käse 4 Enzympräparation <i>F. velutipes</i>		bröseliger als P1 und P2, weich, geschmeidig, bröckelig, trocken, porös, cremig	Sehr schwach milchig (2x), sahnig, neutral (4x)	leicht bitter (2x), Fremdgeschmack im Abgang (3x), mild, aromatisch, milchig (2x), sauer, schwach Feta
Käse 5 Enzympräparation <i>P. citrinopileatus</i>		gut zu schneiden, nicht bröselig, weich, geschmeidig, bröckelig, trocken, cremig	Ziege (3x), leicht bockig, milchig (2x), säuerlich, käsig, angenehm	Ziege, bockig, bitter (2x), ranzig, milchig (2x), recht sauer (2x), intensiv, Feta

^a (Zahl x): Anzahl der genannten Geruchs- bzw. Geschmackseindrücke

Tabelle 3.7 Sensorische Eindrücke der zweiten Verkostung des Käses des 5. Applikationstests nach 30 Tagen Lagerung bei 13 °C + 4 Wochen bei 4 °C

Probenbezeichnung	Aussehen	Konsistenz	Geruch	Geschmack
Käse 1 ohne Lipase		etwas fest, nicht sehr cremig, kompakt, sehr trocken (2x), bröselig (2x)	sehr dezent, leicht milchig, wenig Geruch	sehr mild und angenehm, wenig Geschmack, sahnig, rahmig, buttrig, nicht typisch Ziege, neutral (2x), im Abgang ganz leicht sauer (2x)
Käse 2 opti-zym z10uc	elfenbein, ganz leicht mattgelb,	fester, leicht krümelig, kompakt, trocken (2x), bröselig (2x)	starker Geruch, sauer, schweißig, streng	sahnig, sahniger Nachgeschmack, schmeckt nicht so stark wie Geruch ahnen lässt, aromatisch (3x), pikant
Käse 3 Piccantase® KLC	gleichmäßig, beige-farben, cremefarben (2x) ^a , leicht gelblich (2x)	cremiger, aber trotzdem kompakt (2x), trocken (2x), bröselig (2x)	wie Probe 2, nur weniger intensiv	angenehm, säuerlicher, bockig, pikant (2x), aromatisch (2x), süßlich, etwas sauer
Käse 4 Enzympräparation <i>F. velutipes</i>		fester, leicht krümelig, kompakt, trocken (2x), bröselig (2x)	sehr mild, neutral milchig, am schwächsten	etwas trockener und ranziger, nicht allzu intensiv, neutral, rahmig, am Anfang aromatisch, dann bitter und sauer
Käse 5 Enzympräparation <i>P. citrinopileatus</i>		etwas fest, nicht sehr cremig, kompakt, trocken (2x), bröselig (2x)	sauer, schweißig, deutlich wahrnehmbar, säuerlich	sehr kräftig, würzig, sauer, bitter, stechend- ranzig, sauer, rahmig, nach Ziege (2x), pikant (2x), aromatisch (2x)

^a (Zahl x): Anzahl der genannten Geruchs- bzw. Geschmackseindrücke

Tabelle 3.8 Sensorische Eindrücke der dritten Verkostung des Käses des 5. Applikationstests nach 30 Tagen Lagerung bei 13 °C + 8 Wochen bei 4 °C

Probenbezeichnung	Aussehen	Konsistenz	Geruch	Geschmack
Käse 1 ohne Lipase		fest (3x), etwas bröselig, kompakt, trocken, weich	milchig (4x), neutral (2x), leicht gärig, sehr mild, milchsauer	neutral (3x), Abgang bitter, milchig, schwach sauer (2x), mild (2x), leicht würzig (komischer Beigeschmack), nicht aromatisch, angenehm, nicht intensiv
Käse 2 opti-zym z10uc		fest (3x), etwas bröselig, kompakt, trocken, weicher als Probe 1	bockig, milchig, deutlich sauer (3x), pikant, aromatisch, würzig, neutral, intensiv	aromatisch (3x), würzig (3x), milchig, sauer (2x), arteigen, ganz schwach bitter, leicht nach Ziege (2x), mild, nicht so intensiv, wie Geruch vermuten lässt, angenehm, aber würziger
Käse 3 Piccantase® KLC	cremefarben (3x) ^a , weiß- gelblich (2x), homogen, matt	fest (2x), etwas bröselig, kompakt, trocken, weich	milchig (3x), etwas sauer (3x), weniger pikant, aromatischer und würziger als Probe 2, neutral, intensiver als Probe 1	mild, sauer, milchig, schwach sauer (3x), neutral, salzig, cremig, würzig, angenehm (2x), aromatisch, nach Ziege, nicht intensiv
Käse 4 Enzympräparation <i>F. velutipes</i>		kompakt (2x), fest (3x), etwas schmierig, bröckelig, trocken, weich	neutral (2x), intensiv milchig (3x) (ähnlich wie Probe 1), sehr schwach	neutral (2x), milchig, milchsauer, pikant, etwas bitter, mild, cremig, im Abgang bitter (3x), anfangs Ziegenaroma, kaum sauer
Käse 5 Enzympräparation <i>P. citrinopileatus</i>		fest, bröselig, kompakt, trocken, weich (2x)	bockig (schwach), milchig, sauer (4x), etwas muffig, würzig, aromatisch, pikant, sehr intensiv, vergoren, ranzig, buttrig	würzig (3x), bitter (2x), unrein, milchig, etwas sauer, pikant, nach Ziege (3x), alt, modrig, sehr intensiv, scharf, schweißig

^a (Zahl x): Anzahl der genannten Geruchs- bzw. Geschmackseindrücke

Tabelle 3.9 Sensorische Eindrücke der vierten Verkostung des Käses des 5. Applikationstests nach 30 Tagen Lagerung bei 13 °C + 12 Wochen bei 4 °C

Probenbezeichnung	Aussehen	Konsistenz	Geruch	Geschmack
Käse 1 ohne Lipase		trocken (3x), schnittfest, krümelig, etwas gummiartig, bröckelig, weich bis gummiartig	milchig (4x), sahnig, neutral (2x), mild, schwach säuerlich (2x), rund, ganz leicht aromatisch	neutral, rahmig, erst mild, dann bitter, mild, säuerlich, angenehm nicht aufdringlich, milchig, leicht sauer, rund, aber nicht intensiv, aromatisch, leicht nach Ziege
Käse 2 opti-zym z10uc		leicht cremig, schnittfest, krümelig, trocken (2x), kompakt, bröckelig, weich	säuerlich (2x) (intensiver als P1), aromatisch, (schwach) milchig (2x), sahnig, stärker sauer, schweißig- muffig, pikant- stechend (schwach)	würzig, säuerlich, aromatisch, milchig- sauer, nicht so mild wie P1, aber noch sehr angenehm, milchig, säuerlicher als P1, aber angenehm, etwas essigsauer, leicht nach Ziege
Käse 3 Piccantase® KLC	cremefarben (2x) ^a , weiß- gelblich (2x), gelblich, homogen (2x)	kompakt, schnittfest, krümelig, trocken (2x), etwas feuchter als P1 und P2, bröckelig, leicht gummiartig	säuerlich (3x), aromatisch (weniger intensiv als P2), neutral (2x), milchig (3x), mäßig- /mittelstarker Geruch	sauer, aromatisch, pikant (2x), (leichter Fremdgeschmack), etwas streng und leicht bitter, sehr mild, milchig (2x), kaum sauer, kaum Aroma, neutral, leicht sauer, leicht nach Ziege
Käse 4 Enzympräparation <i>F. velutipes</i>		kompakt (2x), schnittfest, krümelig, trocken (2x), bröckelig, weich	neutral (2x), (schwach) milchig (3x), leicht streng, sehr schwach milchig sauer, säuerlich	(etwas) bitter (3x), säuerlich (2x), streng, anfangs gering milchig- sauer (leicht süßlich), unangenehmer Nachgeschmack, milchig, sehr bitter im Abgang, herb, leicht Ziege
Käse 5 Enzympräparation <i>P. citrinopileatus</i>		cremig, schnittfest, krümelig, trocken (2x), kompakt, bröckelig, weich	säuerlich, aromatisch, würzig, milchig (2x), Ziege, sehr deutlich sauer und schweißig- muffig, fettig, neutral, sehr schwach säuerlich, pikant	Ziege (4x), sehr würzig (2x), leicht bitter (4x), aromatisch, sehr streng, sehr schweißig sauer, intensiv, unangenehmer Nachgeschmack, leicht milchig, säuerlich, leicht beißend

^a (Zahl x): Anzahl der genannten Geruchs- bzw. Geschmackseindrücke

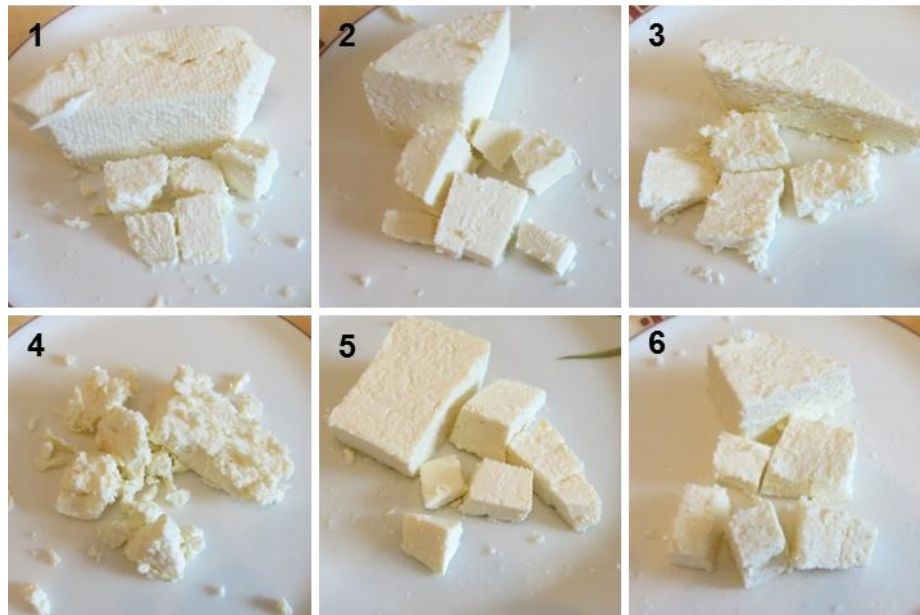


Abbildung 3.41 Verkostung der Fetaprobe der siebten Versuchsreihe nach 5-wöchiger Reifung bei 13°C und zusätzlichen elf Wochen Lagerung bei 4°C. Abgebildet sind: ohne Lipase (1); opti-zym z10uc (2); *F. velutipes* (Ethanol-Fällung) (3); *F. velutipes* (Ammoniumsulfat-Fällung) (4); *P. citrinopileatus* (Ammoniumsulfat-Fällung) (5); *P. citrinopileatus* (Ammoniumsulfat-Fällung) (6)

3.5.3 Bestimmung der freien Fettsäuren der hergestellten Testkäse

Die durch die Firma optiform GmbH hergestellten Testkäse wurden parallel zu den Verkostungen nach unterschiedlichen Lagerperioden mittels Festphasenmikroextraktion (SPME) in Kopplung mit der gaschromatographischen Analyse mit massenspektrometrischer Detektion auf die Anwesenheit von freien Fettsäuren hin untersucht. Die entsprechenden SPME-GC-MS/MS-Chromatogramme des fünften Applikationstest sind in Abbildung 3.42, Abbildung 3.43, Abbildung 3.44, Abbildung 3.45 und Abbildung 3.46 dargestellt. In Abbildung 3.47 sind die Flächen sensorisch relevanter freier Fettsäuren der Testkäse des fünften Applikationstests der Runden 1 bis 4 graphisch dargestellt. Dabei sind die Messungen der Runden 1 bis 4 von jedem Käse in einem Chromatogramm festgehalten. Bei den detektierten Fettsäuren handelt es sich um Essig-, Butter-, Capron-, Capryl- und Caprinsäure.

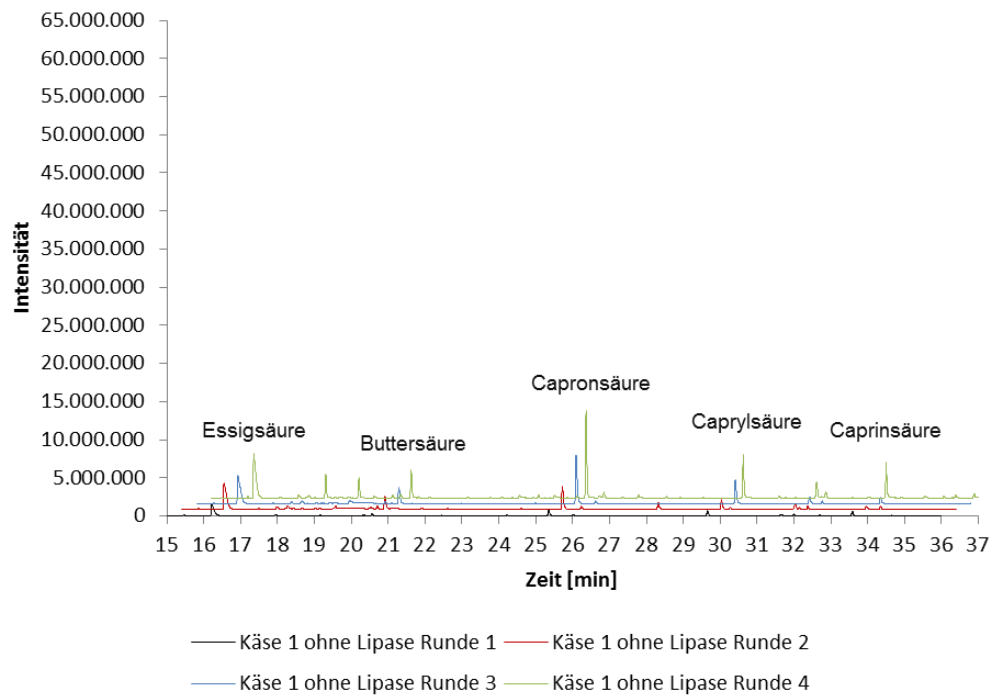


Abbildung 3.42 Überlagerung der SPME-GC-MS/MS-Chromatogramme von Käse 1 ohne Lipase, Applikationstest 5

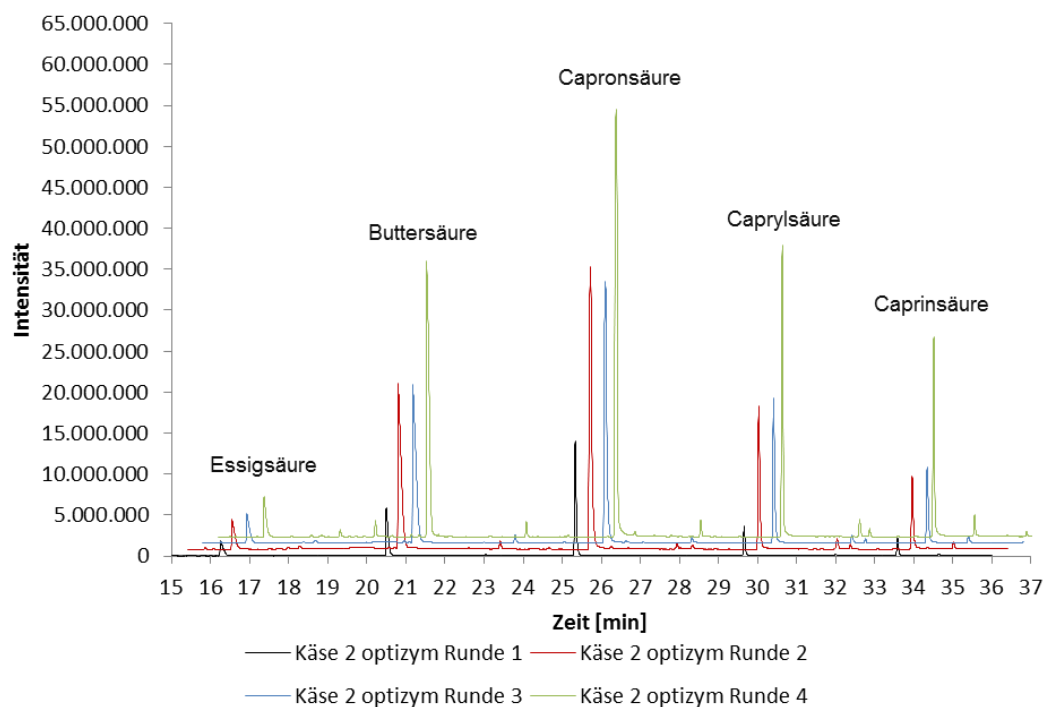


Abbildung 3.43 Überlagerung der SPME-GC-MS/MS-Chromatogramme von Käse 2 mit opti-zym, Applikationstest 5

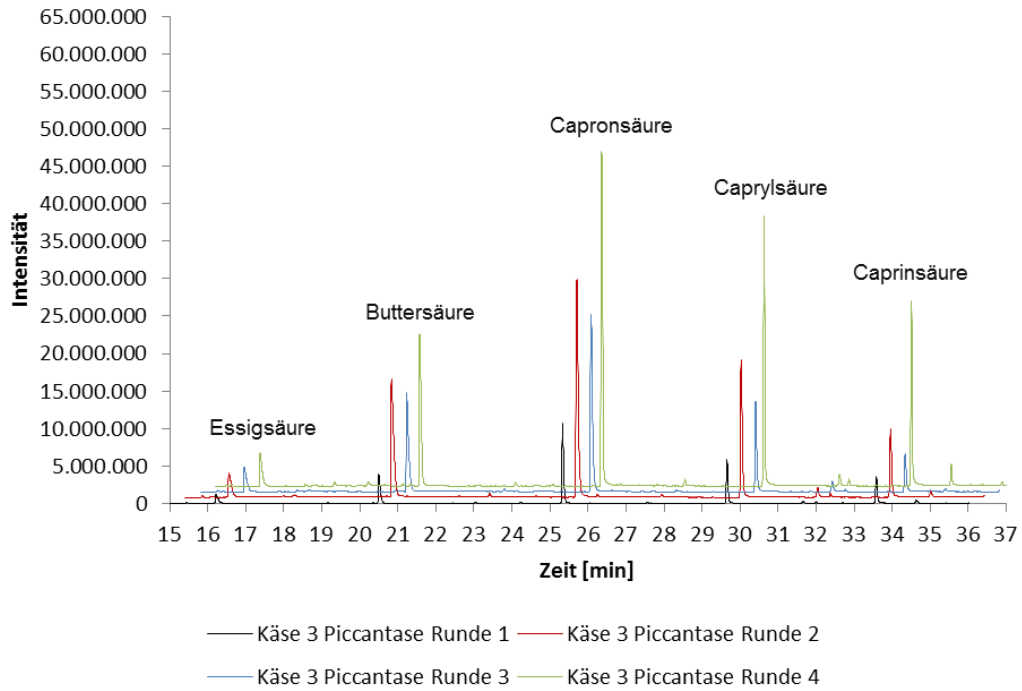


Abbildung 3.44 Überlagerung der SPME-GC-MS/MS-Chromatogramme von Käse 3 mit Piccantase[®], Applikationstest 5

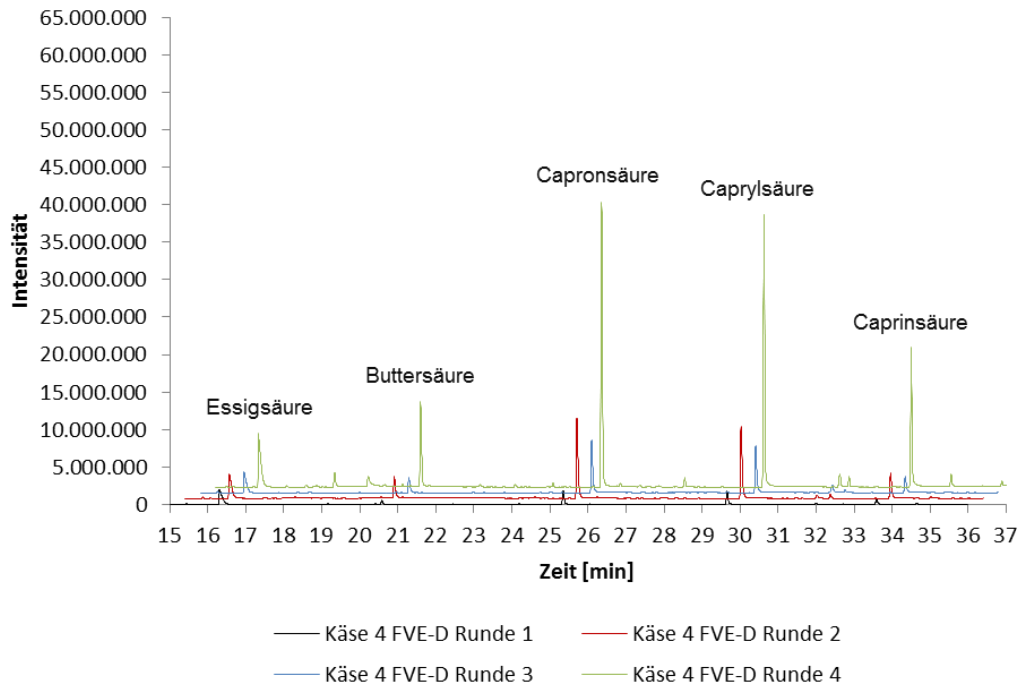


Abbildung 3.45 Überlagerung der SPME-GC-MS/MS-Chromatogramme von Käse 4 mit Enzympräparation aus *F. velutipes*, Applikationstest 5

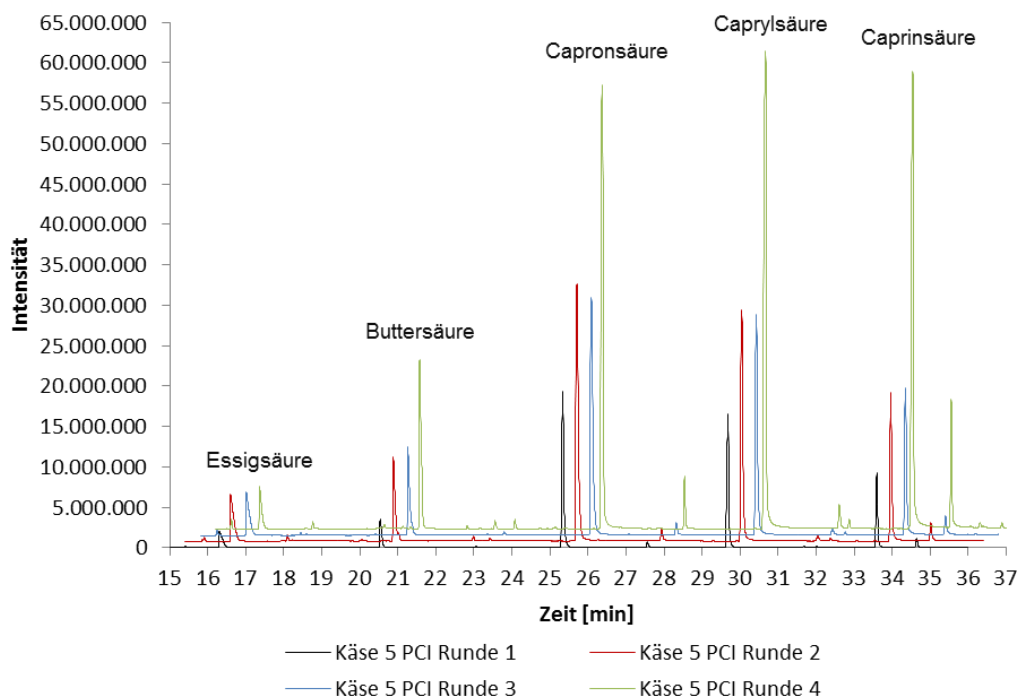


Abbildung 3.46 Überlagerung der SPME-GC-MS/MS-Chromatogramme von Käse 5 mit Enzympräparation aus *P. citrinopileatus*, Applikationstest 5

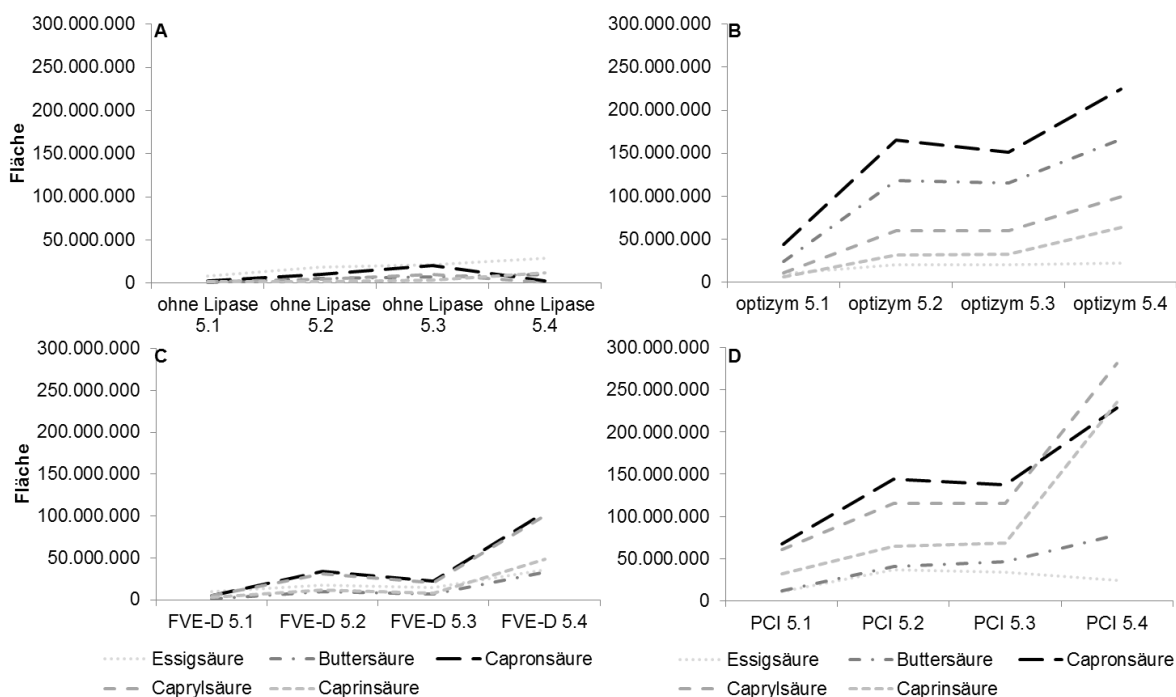


Abbildung 3.47 Graphische Darstellung der Flächen sensorisch relevanter freier Fettsäuren der Testkäse des fünften Applikationstests der Runden 1 bis 4 aus SPME-GC-MS/MS-Analytik (ohne Lipase (A), optizym z10uc (B), *F. velutipes* (C) und *P. citrinopileatus* (D))

Tabelle 3.10 Vergleich der Kováts-Indices der identifizierten Substanzen in den hergestellten Testkäse (gemessen mittels SPME-GC-MS/MS an einer VF-WAXms-Trennsäule von Agilent Technologies) mit der Literatur

Fettsäuren	Probe		Standard		Literatur
	Retentionszeit [min]	Kováts-Index	Retentionszeit [min]	Kováts-Index	Kováts-Index
Essigsäure	16,15	1442	14,01	1426	1436 ¹
Buttersäure	20,40	1614	18,48	1607	1620 ²
Capronsäure	25,33	1834	23,50	1833	1824 ³
Caprylsäure	29,64	2048	27,81	2048	2050 ²
Caprinsäure	33,56	2260	31,67	2258	2276 ⁴

¹(Jagella und Grosch, 1999, Steinhaus und Schieberle, 2007, Lozano *et al.*, 2007, Schlutt *et al.*, 2007)

3.6 Ergebnisse der toxikologischen Untersuchungen der Enzympräparationen

3.6.1 Probenvorbereitung für die toxikologische Untersuchung

Für die toxikologische Untersuchung wurden die vielversprechendsten Basidiomyceten *F. velutipes* und *P. citrinopileatus* analog zur Herstellung für den Einsatz im Käseprozess kultiviert und aufgearbeitet und im Rahmen eines Unterauftrags an Prof. Dr. Dr. Dieter Schrenk an der TU Kaiserslautern weitergeleitet.

In Abbildung 3.48 und Abbildung 3.49 sind die Esterase- und Peptidaseaktivitäten der Kulturüberstände der Basidiomyceten *F. velutipes* und *P. citrinopileatus* von der Ernte bis hin zum Konzentrat dargestellt.

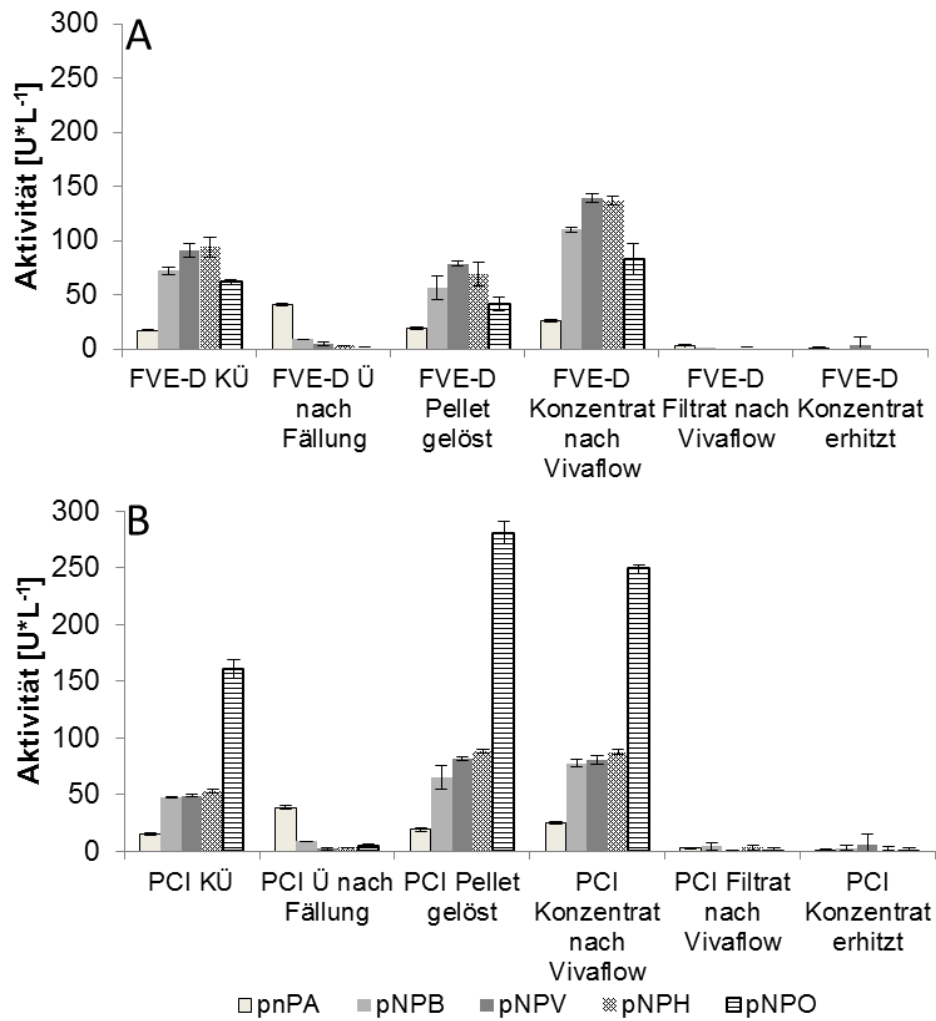


Abbildung 3.48 Esteraseaktivitäten der Kulturüberstände von *F. velutipes* (A) und *P. citrinopileatus* (B) nach verschiedenen Aufarbeitungsschritten für die toxikologische Untersuchung. (Die Messungen erfolgten in Dreifachbestimmung mittels Esterase- und Lipaseassay, die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung)

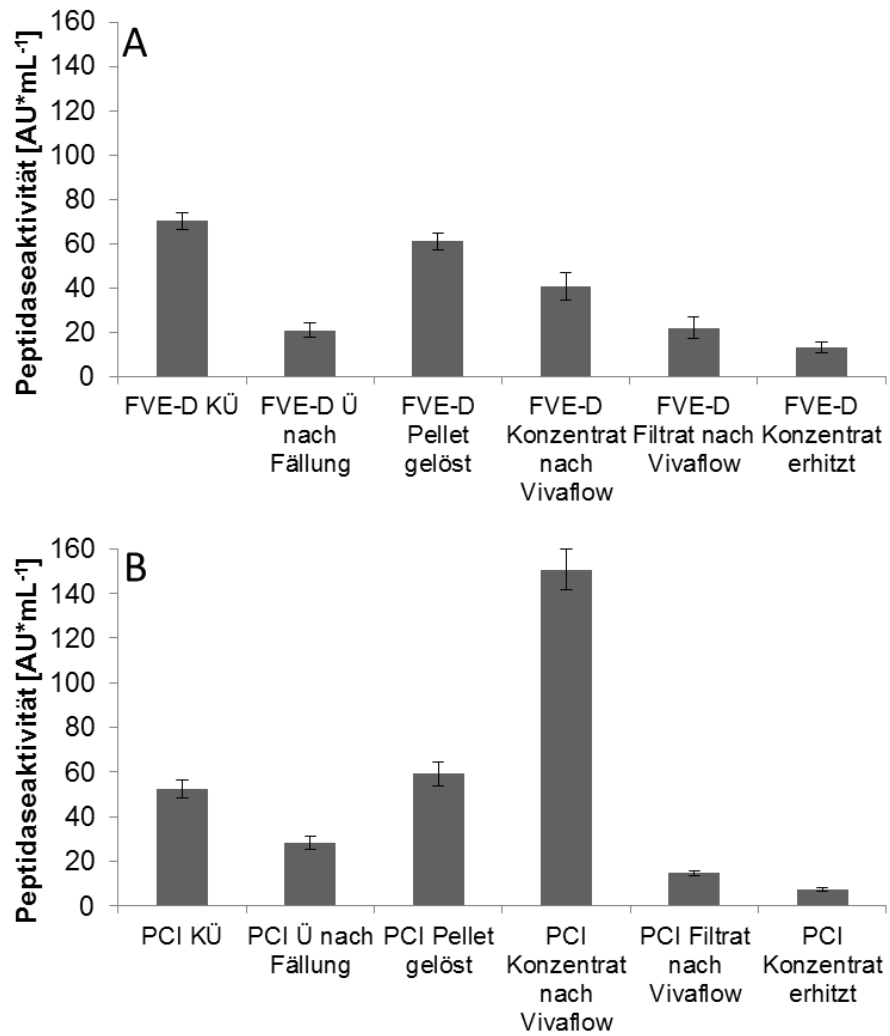


Abbildung 3.49 Peptidaseaktivitäten der Kulturüberstände von *F. velutipes* (A) und *P. citrinopileatus* (B) nach verschiedenen Aufarbeitungsschritten für die toxikologische Untersuchung. (Die Messungen erfolgten in Dreifachbestimmung mittels Azocaseinassay, die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung)

3.6.2 Resazurin-Test

Die Vitalität der Zellen wurde nach einer Inkubation von 24 h, 48 h und 72 h getestet. Anschließend wurden die Zellen 90 min mit Resazurin inkubiert und die entstandene Menge Resorufin mittels Fluoreszenzmessung detektiert. Für die Medienkontrolle wurde der Nettowert auf 100% gesetzt, Mittelwerte und Standardabweichungen wurden dazu in Relation gesetzt.

In Abbildung 3.50, Abbildung 3.51 und Abbildung 3.52 sind die Ergebnisse des Resazurin-Tests nach Behandlung von Rattenhepatozyten mit *F. velutipes* nach 24 h, 48 h und 72 h aufgeführt.

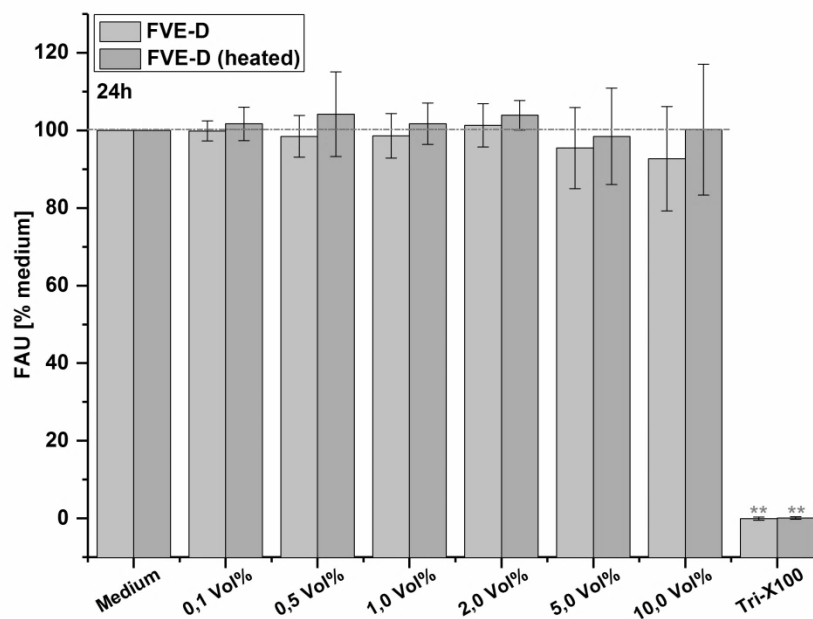


Abbildung 3.50 Resazurin-Test nach Behandlung von Rattenhepatozyten mit *FVE-D* und *FVE-D* (heated) nach 24 h. (Die Messungen erfolgten in Dreifachbestimmung, die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung)

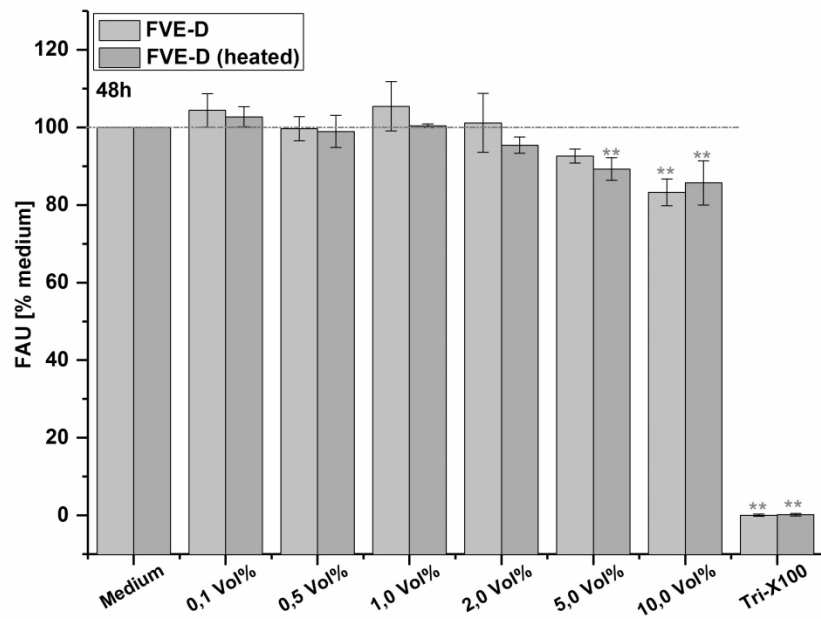


Abbildung 3.51 Resazurin-Test nach Behandlung von Rattenhepatozyten mit *FVE-D* und *FVE-D (heated)* nach 48 h. (Die Messungen erfolgten in Dreifachbestimmung, die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung)

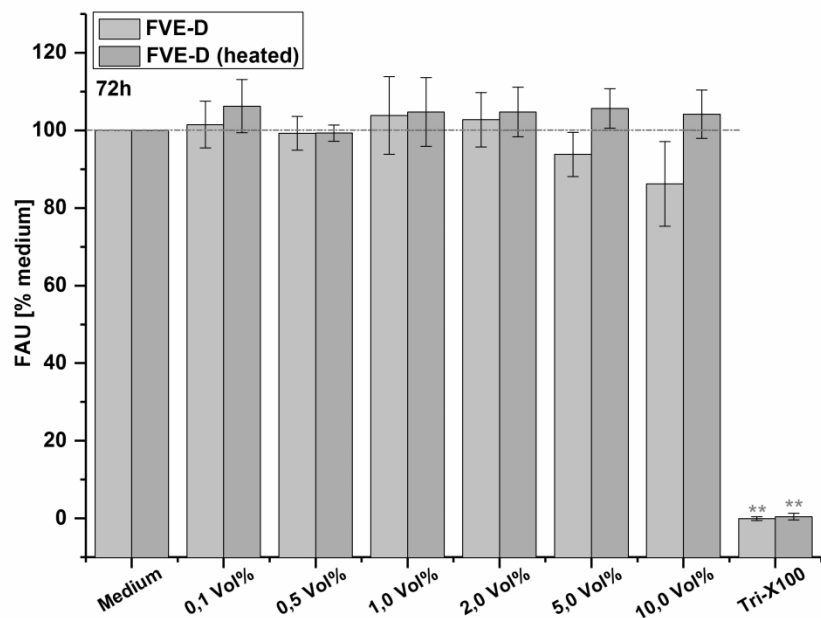


Abbildung 3.52 Resazurin-Test nach Behandlung von Rattenhepatozyten mit *FVE-D* und *FVE-D (heated)* nach 72 h. (Die Messungen erfolgten in Dreifachbestimmung, die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung)

In Abbildung 3.53, Abbildung 3.54 und Abbildung 3.55 sind die Ergebnisse des Resazurin-Tests nach Behandlung von Rattenhepatozyten mit *P. citrinopileatus* nach 24 h, 48 h und 72 h dargestellt.

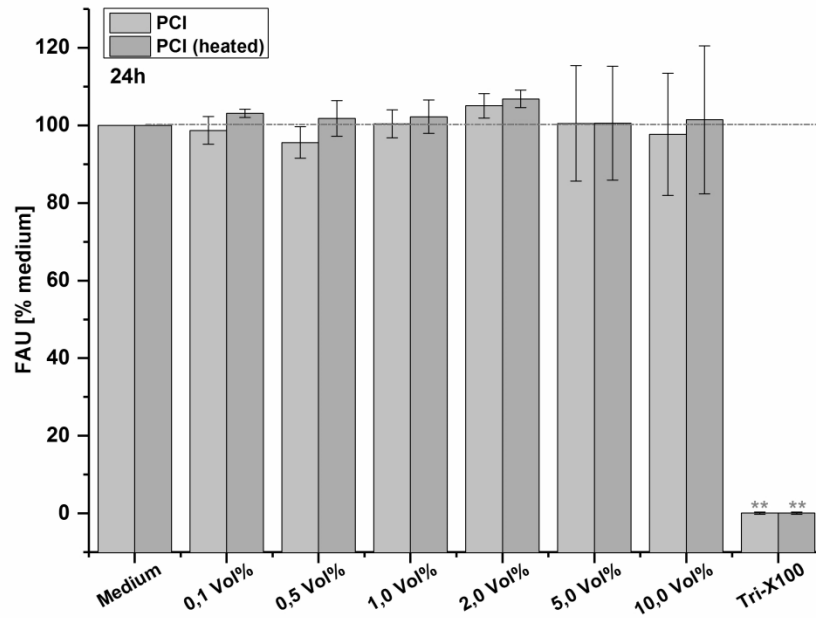


Abbildung 3.53 Resazurin-Test nach Behandlung von Rattenhepatozyten mit *PCI* und *PCI (heated)* nach 24 h. (Die Messungen erfolgten in Dreifachbestimmung, die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung)

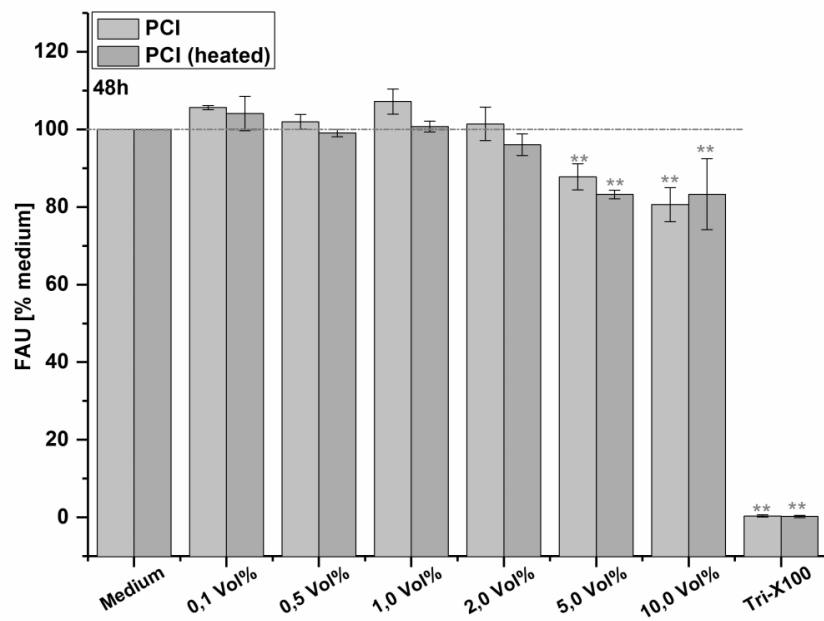


Abbildung 3.54 Resazurin-Test nach Behandlung von Rattenhepatozyten mit *PCI* und *PCI (heated)* nach 48 h. (Die Messungen erfolgten in Dreifachbestimmung, die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung)

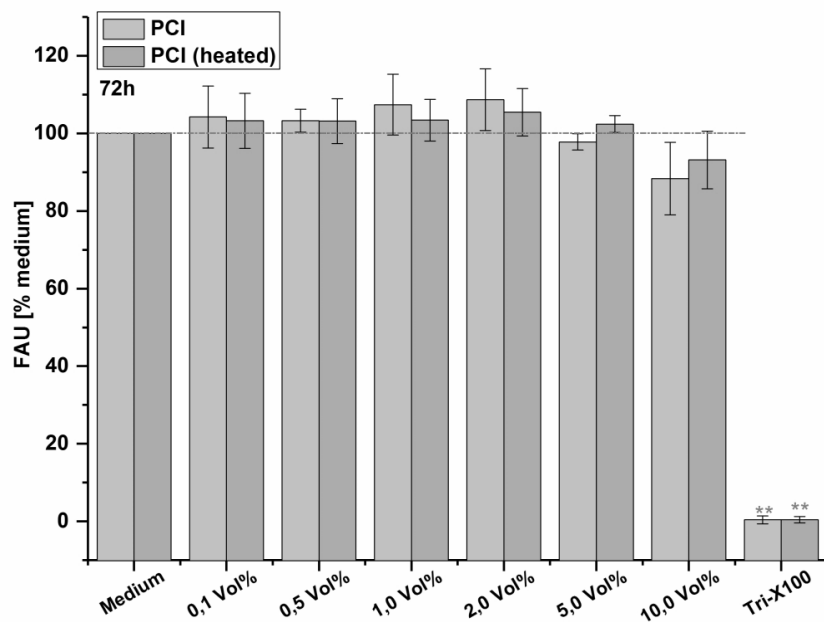


Abbildung 3.55 Resazurin-Test nach Behandlung von Rattenhepatozyten mit *PCI* und *PCI (heated)* nach 72 h. (Die Messungen erfolgten in Dreifachbestimmung, die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung)

3.6.3 Ames-Fluktuationstest

Der Ames-Test zur Ermittlung der Mutagenität in speziellen Stämmen von *Salmonella* Typhimurium wurde in der Variante des Fluktuationstests durchgeführt. In Abbildung 3.56, Abbildung 3.57, Abbildung 3.58 und Abbildung 3.59 sind die entsprechenden Ergebnisse des Ames-Tests dargestellt.

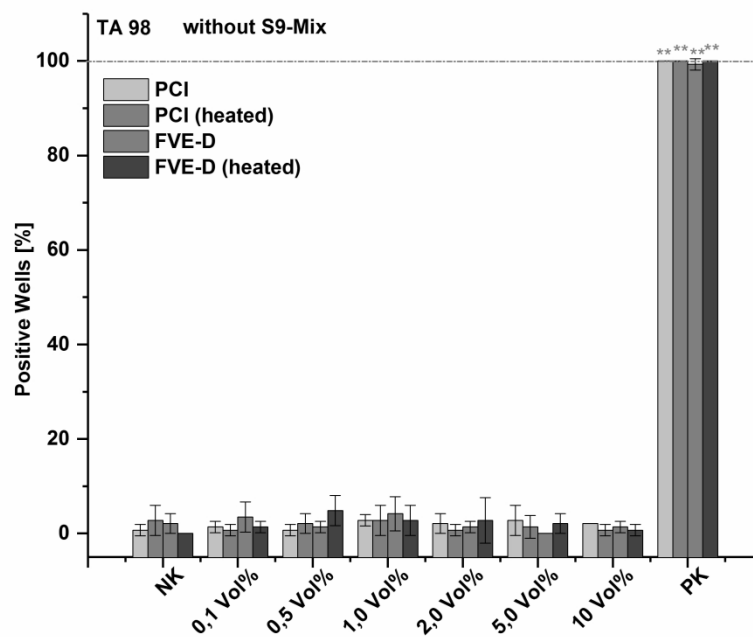


Abbildung 3.56 Ames-Fluktuationstest mit TA98 ohne S9-Mix. (Die Messungen erfolgten in Dreifachbestimmung, die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung). Die ANOVA-Analyse zum Vergleich der Mittelwerte, verbunden mit dem Dunnett-Test, erbrachte keine signifikanten Unterschiede der Probe im Vergleich mit der Medienkontrolle. PK: 4-Nitro-o-Phenylendiamin (4-NOPD) 20 µg/mL

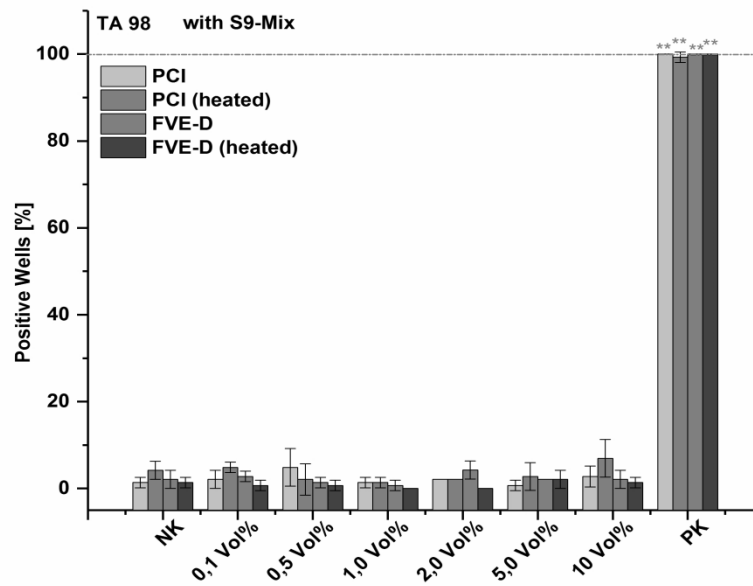


Abbildung 3.57 Ames-Fluktuationstest mit TA98 mit S9-Mix. (Die Messungen erfolgten in Dreifachbestimmung, die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung). Die ANOVA-Analyse erfolgte zum Vergleich der Mittelwerte; mit dem Dunnett-Test wurden die Signifikanzen in Bezug auf die Negativkontrolle angegeben und sind wie folgt definiert: * = $p < 0,05$. PK: 2-Aminoanthracen (2-AA) 0,1 $\mu\text{g/mL}$

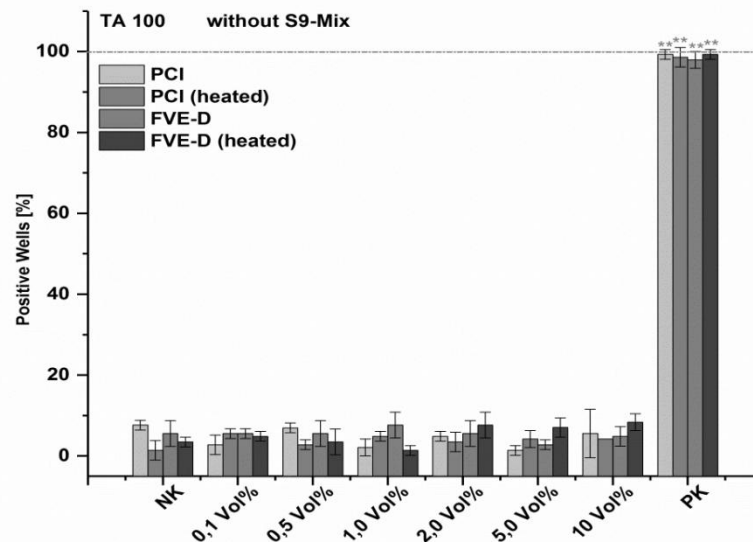


Abbildung 3.58 Ames-Fluktuationstest mit TA100 ohne S9-Mix. (Die Messungen erfolgten in Dreifachbestimmung, die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung). Die ANOVA-Analyse erfolgte zum Vergleich der Mittelwerte; mit dem Dunnett-Test wurden die Signifikanzen in Bezug auf die Negativkontrolle angegeben und sind wie folgt definiert: * = $p < 0,05$. PK: Nitrofurantoin 0,25 $\mu\text{g/mL}$

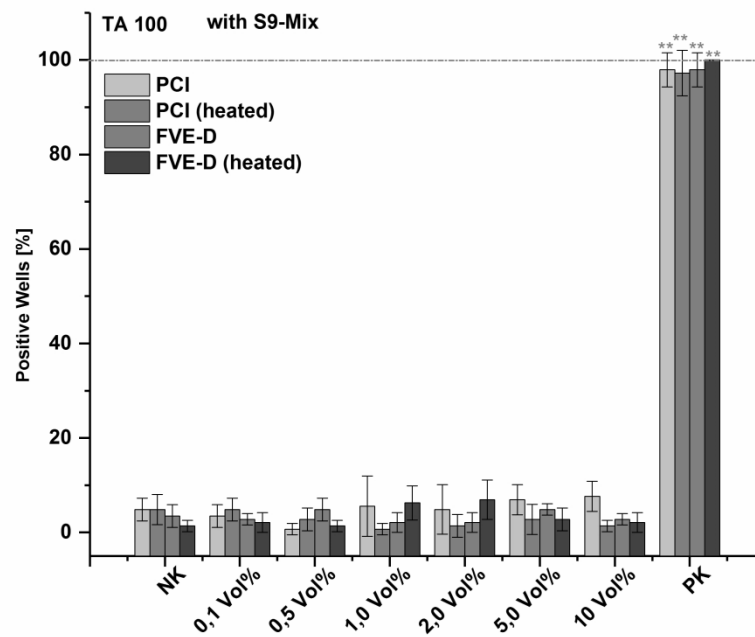


Abbildung 3.59 Ames-Fluktuationstest mit TA100 mit S9-Mix. (Die Messungen erfolgten in Dreifachbestimmung, die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung). Die ANOVA-Analyse erfolgte zum Vergleich der Mittelwerte; mit dem Dunnett-Test wurden die Signifikanzen in Bezug auf die Negativkontrolle angegeben und sind wie folgt definiert: * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$. PK: 2-Aminoanthracen (2-AA) 0,5 $\mu\text{g/mL}$

3.7 Molekularbiologische Charakterisierung

3.7.1 Identifizierung der verwendeten Basidiomyceten

In dieser Arbeit wurde mit den Basidiomyceten *F. velutipes* (Stammnummer der DSMZ: 1658) und *P. citrinopileatus* (Stammnummer der DSMZ: 5341) gearbeitet. Beide Pilze wurden aus der institutseigenen Stammsammlung entnommen. Zur molekularbiologischen Identifizierung wurde nach White *et al.* (1990) vorgegangen. Zur Amplifikation der *Internal Transcribed Spacer Region* ITS1 und ITS2, einschließlich der 5,8S rDNA, wurde die genomische DNA des jeweiligen Pilzes mit den Primer ITS4 und ITS5 (Tabelle 2.5) zur PCR eingesetzt (Bellemain *et al.*, 2010). Für *F. velutipes* wurde ein Fragment aus 745 Basenpaaren (Abbildung 3.60) und für *P. citrinopileatus* ein Fragment aus 518 Basenpaaren (Abbildung 3.61) sequenziert. Durch einen Datenbankvergleich (NCBI-BLAST und EMBL-EBI, (Altschul *et al.*, 1997)) wurden hohe Homologien zu den jeweiligen Pilzen ermittelt (Tabelle 3.11, Tabelle 3.12).

TTGTCCCACA	AGGGGACGGT	TAGAAGCGGA	ATAGCCC	CGCGT	CACTCGCGTC	ACAGGTATCT	60
CTCGTGAGAG	AGAAGGCAAA	GGGAAGCACC	AACTAAGGCG	AAACCACTTC	AGAGACGAGA		120
CGAGCGCTAC	AACACAGTCA	GCCCAGCCAT	AGCCGTAGAT	AATTATCACA	GCTGCAGCGC		180
GCCAAAAGGT	AACGGTTTCT	GCTAATGCAT	TTCAGGGGAG	CTGAACCCAA	AGATAAGGTC		240
CAGCAAGCCC	CCACATCCAA	TCCGCCAGCT	CACAACAAAG	TGAGGGAGGT	TGAGAAGTTA		300
CTGACACTCA	AACAGGCATG	CCCTTCGGAG	TACCAAAGGG	CGCAAGGTGC	GTTCAAAGAC		360
TCGATGATTC	ACTGAATTCT	GCAATTCACA	TTAGTTATCG	CATTTTCGCTG	CGTTCCTCAT		420
CGATGCGAGA	GCCAAGAGAT	CCGTTGTTGA	AAGTTGTATT	TAGTTTAAAG	GACAGTGAAG		480
TCCAATAATC	AATGACATTC	GTTACATACT	ATAGTGTTTG	TAAGACATAG	GCCTGGAAGG		540
CAAAGGGAGC	GCAAAAAGCG	CACCCTTCCA	ATGGGGTATC	CAGACCTACA	GAGTGTGCAC		600
AGGTGGACGA	AGAAAGCTGC	AACCCAGAC	GTGCACGTAC	GAAGAACCCG	TGAAGGTCCT		660
CGTCAGCAAC	AGCCCAAGAG	CCACAAGCAG	TTCAAAGTTC	ATTAATGATC	CTTCCGCAGG		720
TTCACCTACG	GAAACCTTGT	TACGA					745

Abbildung 3.60 Sequenz der 5,8S rDNA mit flankierendem ITS-Bereich des Basidiomyceten *F. velutipes* (Stammnummer 1658, DSMZ)

Der Vergleich der ITS-Sequenz von *F. velutipes* mit der Stammnummer 1658, zeigte hohe Homologien von 100% mit verschiedenen *Flammulina velutipes*-Stämmen (Tabelle 3.11).

Tabelle 3.11 Auswahl verschiedener *F. velutipes*-Stämme mit hohen Homologien zur ermittelten 5,8S rDNA- und ITS-Sequenz

Zugriffsnummer	Organismus	Homologie [%]	E-Wert
MG711634.1	<i>Flammulina velutipes</i> , strain 2577, für 5,8 S rDNA, ITS1 und ITS2 (partial)	100	0
HQ660197.1	<i>Flammulina velutipes</i> , 18S rRNA, 5,8 S rDNA, ITS1 und ITS2 (partial)	100	0
HM561979.1	<i>Flammulina velutipes</i> , Isolat FVW1, 18S rRNA, 5,8 S rDNA, ITS1 und ITS2 (partial)	100	0

TTTCACACCC	CTGTGCACCT	TTGATAGATT	CGCTGGAAAAG	ACGGTCGCCT	CACGGTGACT	60
TGAACTCCGG	TGGGTCTATA	ACCATTACAC	ACACAAACGT	ATGTCTACNA	ATGTCATTTA	120
TATGGGCCAT	GCTGCCTATA	AAAACCTAAT	ACAACCTTCA	ACAACGGATC	TCTTGGCTCT	180
CGCATCGATG	AAGAACGCAG	CGAAATGCGA	TAAGTAATGT	GAATTGCAGA	ATTCAGTGAA	240
TCATCGAATC	TTTGAACNCA	CCTTGCGCCC	CTTGGNATTC	CGAGGGGCAT	GCCTGTTTGA	300
NTGTCATTAA	ATTCTCAAAC	CTACCTTTTG	CTTTGCTGTA	AATCNTANTG	TTTGGATTGT	360
TGGGGGTTGC	TGGCTTGTC	CCGAGTCGGC	TCCTCTTAAA	TGCATTANCG	NGACTTTGTT	420
GTTGCCTCTG	CTACNTGGTG	TGATAATTAT	CTACNCCAGA	CCGTACGCAA	TGATACTTAT	480
TGGAGTCCAG	CTCTCTAATC	GTCTTCNGAC	AGCTTTTG			518

Abbildung 3.61 Sequenz der 5,8S rDNA mit flankierendem ITS-Bereich des Basidiomyceten *P. citrinopileatus* (Stammnummer 5341, DSMZ)

Der Vergleich der ITS-Sequenz von *P. citrinopileatus* mit der Stammnummer 5341, zeigte hohe Homologien von 100% mit verschiedenen *Pleurotus citrinopileatus*-Stämmen (Tabelle 3.11).

Tabelle 3.12 Auswahl verschiedener *P. citrinopileatus*-Stämme mit hohen Homologien zur ermittelten 5,8S rDNA- und ITS-Sequenz

Zugriffsnummer	Organismus	Homologie [%]	E-Wert
KY962497.1	<i>Pleurotus citrinopileatus</i> , Isolat P81, für 5,8 S rDNA, ITS1 und ITS2 (partial)	100	0
KY962484.1	<i>Pleurotus citrinopileatus</i> , Isolat P68, für 5,8 S rDNA, ITS1 und ITS2 (partial)	100	0
KY962454.1	<i>Pleurotus citrinopileatus</i> , Isolat P38, für 5,8 S rDNA, ITS1 und ITS2 (partial)	100	0

3.7.2 Proteinidentifizierung der Zielenzyme mittels HPLC-ESI-MS/MS

Die aktivsten Fraktionen nach der zweiten Reinigungsstufe der FPLC von *F. velutipes* und *P. citrinopileatus* wurden nach 2.9.4 konzentriert, entsalzt und nach tryptischem Verdau mittels HPLC-ESI-MS/MS sequenziert.

In Tabelle 3.13 sind die enthaltenen Peptidfragmente der HPLC-ESI-MS/MS-Analyse der einzelnen Fraktionen von *F. velutipes* aufgeführt.

Tabelle 3.13 Gefundene Peptidfragmente der HPLC-ESI-MS/MS-Analyse der einzelnen Fraktionen von *F. velutipes*

Peptidfragment	SEC Fraktion	
	14	15
EAGVGNLGLQDQR	x	x
LLALYPSDPSQGSPFDTGSDNAITPQYK	x	x
SAALLGDLLFQTSR	x	x
QDIYTYIHNR	x	x
AAIDEAEFVWTPR	x	x
FDGALFSDLPQNLILQGK	x	x
YVGAFGGDPTK	x	x
LNGFGFLASK	x	x
FVATLDPNGNTGISWPK	x	x
WTSEAPNMLAFSDDEAVPLSLTEDTYR	x	x
WLPTASDAEIDR	x	x
SLELQEPVIYVSFNRYR	x	-
TGcSNASDTLAcLR	-	x
TADFDTLK	-	x
YLINELSGK	-	x

Der Datenbankvergleich ergab hohe Homologien zu einer *putative carotenoid ester lipase* aus *Flammulina velutipes* (UniProt Zugriffsnummer G8A515).

Abbildung 3.62 zeigt die Aminosäuresequenz dieser *putative carotenoid ester lipase* aus *F. velutipes*, dabei sind die gefundenen Peptidfragmente der HPLC-ESI-MS/MS-Analyse unterstrichen dargestellt.

MTRAPLPHLS	HHGPTSEDCL	TINVVKPANV	EEGAQLPVVA	VSSFVEVGGTS	EYNGTSIVSR	60
<u>SLELQEPVIY</u>	VSFNYRLNGF	GFLASKEVKE	AGVGNLGLQD	<u>QRLALKWIQK</u>	<u>YVGAFGGDPT</u>	120
KVTIWGESAG	AEAVVYHMVS	NDGNTEGLYR	AAFAQSGSVG	SYGGLENGQD	AYDGIVNKTG	180
CSNASDTLAC	LRTADFDTLK	AAIDEAEFVW	TPRFDGALFS	DLPQNLILQG	KVADVPLITG	240
NCGDEGTLYS	ISYNISTDAE	<u>FKTFLQTRWL</u>	PTASDAEIDR	LLALYPSDPS	QGSPFDTGSD	300
<u>NAITPQYKRS</u>	<u>AALLGDLLFQ</u>	<u>TSRRYLINEL</u>	<u>SGKQDIYTYI</u>	<u>HNRQRRLPVL</u>	<u>GSFHASDLVN</u>	360
VYGGDMSDY	LIRFVATLDP	NGNTGISWPK	<u>WTSEAPNMLA</u>	FSDDEAVPLS	LTEDTYRKEA	420
MAASGMIQSC	YIYVWQRQIK	TLEAYVYGR	YPDRASEKVT	ATRTLNTVSI	TVTAKGKTGR	480
FSATLALPSR	ASKNKPVPVAV	IVIGFADSTF	LNGIAQATF	DANSVAADST	SKTGAFHNIY	540
SEDIGSLLAW	GWGSHRVLDA	LELVAPEIDS	TRVGMGCSR	YGKGALAAGI	FDDRLVETKG	600
LAPWSRLFHG	GQKRACKTTY	RMRIVFPWMP	ISLPLLLLRA	LPGIKMNPPE	GVAGVTFPAT	660
QMVIKFLGAE	ENVGVALRNS	GHCDPSTNN	VLDFVKSPLL	GSQRTRNYTT	ISPYQAHPEA	720
YPWAI						725

Abbildung 3.62 Aminosäuresequenz einer *putative carotenoid ester lipase* (UniProt Zugriffsnummer G8A515) aus *F. velutipes*. Gefundene ESI-MS/MS Peptidfragmente sind unterstrichen dargestellt

In Tabelle 3.14 sind die gefundenen Peptidfragmente der HPLC-ESI-MS/MS-Analyse der vereinten Fraktion 23-29 von *P. citrinopileatus* aufgeführt.

Tabelle 3.14 Gefundene Peptidfragmente der HPLC-ESI-MS/MS-Analyse der SEC-Fraktion C2 23-29 von *P. citrinopileatus*

Peptidfragment	SEC Fraktion C2 23-29
DAGVGNLGLQDQR	x
FLGIPYAQPPTGDR	x
QNTWAFLSK	x
FQGDAVFQAPR	x
SIQLGEPVIYVS	x
FLGIPY	x
HASDILNVY	x
YTTSSPNLVTF	x
DAINFLT	x
DGGLIVER	x
FGGELGDY	x
GFLASQEVK	x
VTLANPL	x

Der Datenbankvergleich ergab hohe Homologien zu einer Carboxylesterase aus *Pleurotus ostreatus* (UniProt Zugriffsnummer A0A067NQW6).

Abbildung 3.63 zeigt die Aminosäuresequenz einer Carboxylesterase aus *P. ostreatus*, dabei sind die gefundenen Peptidfragmente der HPLC-ESI-MS/MS-Analyse unterstrichen dargestellt.

MFFVLQVVLG	LFAIQSTATP	LPRANSVTLD	SATFTGTTSG	<u>RVTKFLGIPY</u>	<u>AQPPTGDRRF</u>	60
RLPEPIPPYT	GTVRATAFGP	ACPQQSARLP	LPDGLASDVV	DLIVNTAYKA	IFPDSCLDLS	120
INVVVPTSAT	PTSKLPVAVW	IFGGGFELGS	<u>PSLYDGGLIV</u>	<u>ERSIQLGEPV</u>	<u>IYVSMNYRLS</u>	180
<u>AFGFLASQEV</u>	<u>KDAGVGNLGL</u>	<u>QDQREALRWI</u>	<u>QKYISSFGGD</u>	<u>PTKVTIWGES</u>	<u>AGAISVALHM</u>	240
VANDGNHEGL	FRGAFMQSGS	PIPVGDISHG	QTYYEIAIAE	TGCSSASDTL	ACLRVVPYST	300
LKTAVDHTPF	IFDYQSLALA	WLPRADGVFL	TDNPQKLVQA	GKVANVPFVT	GDCDDEGTLF	360
SLANLNVTTT	SQVRTYIKTF	FMPQSTNAEL	DQMLNHYPDL	LIQGSFPGTG	ILNALSPQFK	420
<u>RLAAFQGDV</u>	<u>FQAPRRFFLQ</u>	<u>QRSSKQNTWA</u>	<u>FLSKRFKAAP</u>	<u>FLGSFHASDI</u>	<u>LNVFYGGELG</u>	480
<u>DYLINFVNKL</u>	<u>DPNGQGRGIN</u>	<u>WPKYTTSSPN</u>	<u>LVTFNDNLFF</u>	<u>PVTITQDTFR</u>	<u>KDAINFELTGV</u>	540
<u>TLANPL</u>						546

Abbildung 3.63 Aminosäuresequenz einer Carboxylesterase (UniProt Zugriffsnummer A0A067NQW6) aus *Pleurotus ostreatus* und deren Homologien zu einer Esterase/Lipase aus *P. citrinopileatus* (SEC-Fraktion C2 23-29). Gefundene ESI-MS/MS Peptidfragmente sind unterstrichen dargestellt.

3.7.3 RNA-Isolierung und Transkription in cDNA

Anhand des Screenings wurden für die Basidiomyceten *F. velutipes* und *P. citrinopileatus* Esterase-Aktivitätsmaxima im Kulturüberstand an den Kulturtagen 14 (81 U L^{-1} bezogen auf pNPH) bzw. 21 (505 U L^{-1} bezogen auf pNPO) ermittelt. Somit wurden ab Tag 12 bzw. 19 Myzel-Proben entnommen und die RNA daraus isoliert. In Tabelle 3.15 sind die Konzentrationen der jeweiligen Gesamt-RNA für *F. velutipes* an den Kulturtagen 12, 13 und 14 und für *P. citrinopileatus* an den Kulturtagen 19, 20 und 21 aufgeführt.

Tabelle 3.15 Konzentrationen und Reinheit der Gesamt-RNA aus *F. velutipes* und *P. citrinopileatus* an verschiedenen Kulturtagen

Probenbezeichnung	Konzentration [ng* μ L ⁻¹]	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₃₀
<i>F. velutipes</i> (T-12.1)	258	2,144	2,959
<i>F. velutipes</i> (T-12.2)	142	2,129	2,379
<i>F. velutipes</i> (T-13.1)	103	2,085	2,137
<i>F. velutipes</i> (T-13.2)	344	2,185	2,533
<i>F. velutipes</i> (T-14.1)	47	2,157	1,429
<i>F. velutipes</i> (T-14.2)	260	2,054	2,253
<i>P. citrinopileatus</i> (T-19.1)	458	2,146	2,663
<i>P. citrinopileatus</i> (T-19.2)	344	2,156	2,694
<i>P. citrinopileatus</i> (T-20.1)	319	2,017	2,408
<i>P. citrinopileatus</i> (T-20.2)	562	2,132	2,263
<i>P. citrinopileatus</i> (T-21.1)	485	2,162	2,436
<i>P. citrinopileatus</i> (T-21.2)	524	2,152	1,881

In Abbildung 3.64 sind exemplarisch Proben nach der RNA-Isolierung von *F. velutipes* an Kulturtag 12 und von *P. citrinopileatus* an Kulturtag 19 zur Überprüfung der RNA-Qualität aufgetragen (Accerbi *et al.*, 2010). Es wurden jeweils zwei Banden sichtbar, welche der 28S rRNA bzw. der 18S rRNA entsprechen. Das Verhältnis der Intensitäten der Banden zueinander betrug ca. 2:1.

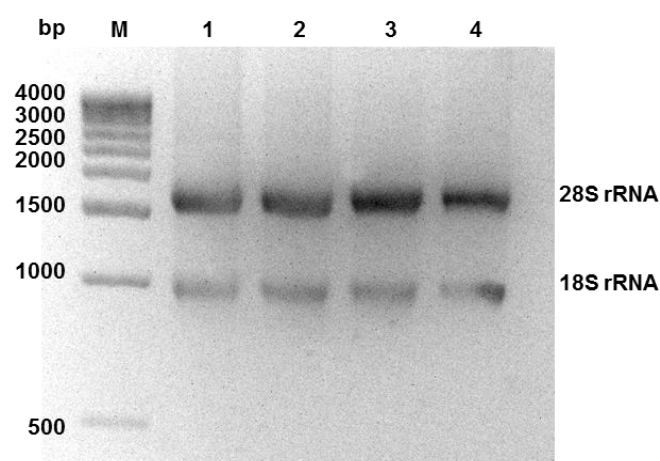


Abbildung 3.64 Agarosegel (3%ig) zur Überprüfung der RNA-Qualität von *F. velutipes* und *P. citrinopileatus*. Auftragung: Marker (M), *P. citrinopileatus* nach 19 Tagen Hauptkultur (1,2), *F. velutipes* nach 12 Tagen Hauptkultur (3,4)

Nach Isolierung der Gesamt-RNA und Überprüfung der Qualität wurde diese zur Erststrangsynthese der cDNA mittels reverser Transkription und anschließendem Verdau der verbleibenden RNA eingesetzt. Die erhaltene Erststrang-cDNA wurde als Vorlage zur Amplifizierung der *putative carotinoid ester lipase* aus *F. velutipes* verwendet. Dazu wurden erneut die Primer Fvelu_lip_fw und Fvelu_lip_rev herangezogen. In Tabelle 3.16 sind die Konzentrationen und die Reinheiten der cDNA aus *F. velutipes* an Kulturtag 14 und *P. citrinopileatus* an Kulturtag 21 aufgeführt.

Tabelle 3.16 Konzentrationen und Reinheit der cDNA aus *F. velutipes* an Kulturtag 14 und *P. citrinopileatus* an Kulturtag 21

Probenbezeichnung	Konzentration [ng*μL⁻¹]	A₂₆₀/A₂₈₀	A₂₆₀/A₂₃₀
<i>F. velutipes</i> (T-14.2.1)	990	1,787	2,676
<i>F. velutipes</i> (T-14.2.2)	867	1,789	2,321
<i>P. citrinopileatus</i> (T-21.1.1)	917	1,796	2,306
<i>P. citrinopileatus</i> (T-21.1.2)	1171	1,793	2,316

3.7.4 Amplifikation und Sequenzierung des Zielenzym aus *F. velutipes*

Anhand der Nukleotidsequenz einer *putative carotenoid ester lipase* aus *F. velutipes* wurden Primer für die Amplifizierung und anschließende Sequenzierung abgeleitet. Die entworfenen Primer wurden am Anfang der Sequenz (Fvelu_lip_fw) und direkt am Ende der Sequenz (Fvelu_lip_rev) angesetzt. In Abbildung 3.65 ist die entsprechende Nukleotidsequenz einer *putative carotenoid ester lipase* (UniProt Zugriffsnummer G8A515) aus *F. velutipes* dargestellt. Die Primer Fvelu_lip_fw und Fvelu_lip_rev sind unterstrichen dargestellt.

<u>ATGACTAGGG</u>	CGCCATTACC	ACATCTTTCC	CACCATGGTC	CGACTTCGGA	AGATTGTTTG	60
ACGATAAACG	TCGTCAAGCC	CGCGAATGTT	GAAGAGGGAG	CTCAACTTCC	TGTTGTTGCG	120
GTTAGCAGCT	TTGAAGTTGG	CGGGACCTCC	GAGTATAACG	GCACGAGCAT	CGTATCGCGG	180
TCCCTCGAGC	TACAGGAACC	AGTCATTTAT	GTGTCCTTTA	ACTATCGTCT	CAACGGCTTC	240
GGATTCTGG	CGAGCAAAGA	AGTTAAGGAA	GCCGGCGTAG	GCAACTTGGG	CTTACAGGAT	300
CAACGGTTGG	CCCTCAAGTG	GATACAGAAG	TATGTTGGTG	CATTCGGCGG	AGATCCTACC	360
AAAGTAACAA	TATGGGGAGA	ATCTGCGGGA	GCGGAGGCAG	TTGTCTACCA	CATGGTTTCG	420
AACGATGGTA	ACACGGAGGG	CCTCTACCGA	GCAGCTTTCG	CGCAATCGGG	TTCGGTTCGGT	480
TCCTATGGCG	GTCTTGAAAA	TGGACAAGAT	GCCTACGACG	GGATCGTCAA	CAAGACCGGC	540
TGTTCCAACG	CTTCAGATAC	CCTCGCTTGC	TTGCGAACCG	CCGATTTCGA	CACCTTGAAA	600
GCGGCTATCG	ACGAAGCGGA	ATTTGTATGG	ACGCCCCGAT	TTGATGGCGC	ACTCTTTAGC	660
GACCTCCCTC	AGAACCTTAT	ATTGCAGGGA	AAAGTAGCGG	ATGTCCCCCT	GATCACCGGA	720
AACTGTGGCG	ACGAGGGAAC	ACTCTATTCC	ATCAGCTATA	ACATCAGTAC	CGACGCCGAG	780
TTCAAGACAT	TCCTACAGAC	TCGCTGGCTT	CCCACAGCAT	CCGATGCAGA	GATCGACAGA	840
CTGCTAGCTT	TATACCCATC	AGATCCCTCC	CAAGGCTCGC	CGTTCGACAC	TGGCTCTGAC	900
AACGCCATAA	CGCCACAGTA	CAAACGTTCC	GCCGCTTTGC	TAGGAGACCT	TCTCTTCCAA	960
ACTTCTCGGA	GGTACCTGAT	TAACGAATTG	TCCGGCAAGC	AAGATATCTA	CACCTACATA	1020
CACAATCGTC	AGAGAAGACT	CCCAGTCTTG	GGATCGTTCC	ATGCTTCTGA	CCTTGTC AAT	1080
GTGTACGGCG	GTGGAGATAT	GTCCGATTAT	CTCATTCTGT	TCGTGCGCAC	ACTGGATCCT	1140
AACGGAAATA	CTGGGATTTT	CTGGCCGAAA	TGGACGTCCG	AAGCACCAA	CATGCTAGCA	1200
TTCAGCGATG	ACGAAGCCGT	CCCCTGAGT	CTTACGGAGG	ATACATATCG	CAAGGAGGCC	1260
ATGGCGGCTT	CCGGTATGAT	CCAATCATGT	TACATATATG	TCTGGCAGCG	CCAGATTAAG	1320
ACCCTCTCG	AAGCATACTG	ATATGGCCGC	TATCCCGATC	GTGCTAGCGA	GAAAGTCACC	1380
GCCACTCGAA	CGCTAAACAC	CGTCTCTATC	ACCGTCACCG	CGAAAGGAAA	GACAGGTCGA	1440
TTCTCCGCTA	CGTTAGCCCT	CCCTTCCAGG	GCTTCCAAGA	ATAAACCCGT	CCCGGCGGTT	1500
ATTGTTATTG	GATTTGCCGA	CTCAACTTTT	CTGAATAACG	GGATTGCGCA	GGCGACGTTT	1560
GACGCTAACA	GTGTGGCGGC	CGATTCTACC	TCCAAGACAG	GCGCGTTCCA	CAACATCTAT	1620
TCTGAGGATA	TTGGTTCACT	TCTAGCTTGG	GGATGGGGAT	CCCATCGTGT	CCTGGATGCG	1680
CTCGAGTTGG	TCGCGCCTGA	GATTGACTCG	ACACGTGTGG	GAGTTATGGG	ATGTAGTCGA	1740
TACGGCAAAG	GTGCCCTCGC	TGCTGGGATT	TTGATGATA	GACTGGTCGA	AACGAAAGGC	1800
TTGGCTCCAT	GGTCGAGGCT	ATTCCATGGT	GGACAAAAGC	GGGCTTGCAA	GACTACATAC	1860
CGGATGAGAA	TCGTCTTCCC	GTGGATGCCA	ATTTCTTAC	CGCTGCTGTT	GCTCCGCGCG	1920
CTGCCGTTTG	GGATCAAGAT	GAACCCAGAG	GGTGTGGCAG	GCGTTACCTT	CCCCGCTACT	1980
CAAATGGTAT	ACAAGTTTCT	TGGCGCCGAA	GAAAACGTCG	GAGTTGCACT	CCGTAACAGT	2040
GGGCACTGTG	ATCCTTCTGG	AACAAATAAT	GTATTGGACT	TCGTCAAGTC	AGTCCTTCTT	2100
GGCTCGCAGA	GGACGCGCAA	CTACACAACA	ATCTCTCCGT	ATCAGGCGCA	TCCTGAAGCC	2160
<u>TACCCATGGG</u>	<u>CCATTTGA</u>					2178

Abbildung 3.65 Nukleotidsequenz einer *putative carotenoid ester lipase* (UniProt Zugriffsnummer G8A515) aus *F. velutipes*. Die Primer Fvelu_lip_fw und Fvelu_lip_rev sind unterstrichen dargestellt

Die mit den oben genannten Primern erhaltenen Amplifikate durch die Umsetzung mit der cDNA aus *F. velutipes* sind in Abbildung 3.66 dargestellt. Dabei sind zwei Banden zu erkennen. Zum einen auf einer Höhe von 2500 Basenpaaren und zum anderen auf einer Höhe von 1500 Basenpaaren. Diese Banden wurden ausgeschnitten, mittels PCR Clean up Kit gereinigt (2.13.7) und sequenziert (2.13.8). Die Sequenzierergebnisse zeigten keine Übereinstimmung mit der codierenden Sequenz des gesuchten Gens aus *F. velutipes*.

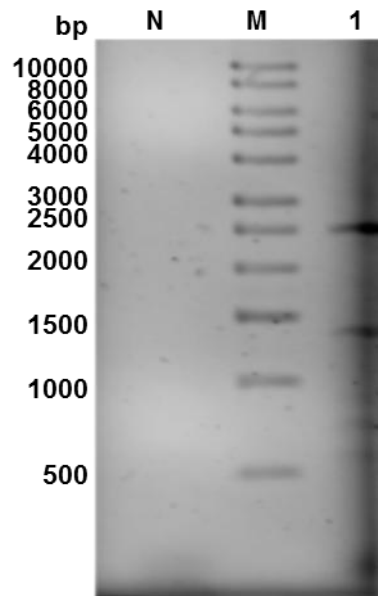


Abbildung 3.66 Agarosegel der mittels PCR erhaltenen Amplifikate aus cDNA aus *F. velutipes* mit den Primern Fvelu_lip_fw und Fvelu_lip_rev (mit M: Marker, N: Negativkontrolle, 1: cDNA von *F. velutipes*)

In Abbildung 3.67 ist ein Agarosegel mit Amplifikaten einer PCR mit genomischer DNA aus *F. velutipes*, welche mit den Primern Fvelu_lip_fw und Fvelu_lip_rev bei verschiedenen Temperaturen zur Anlagerung generiert wurden, dargestellt.

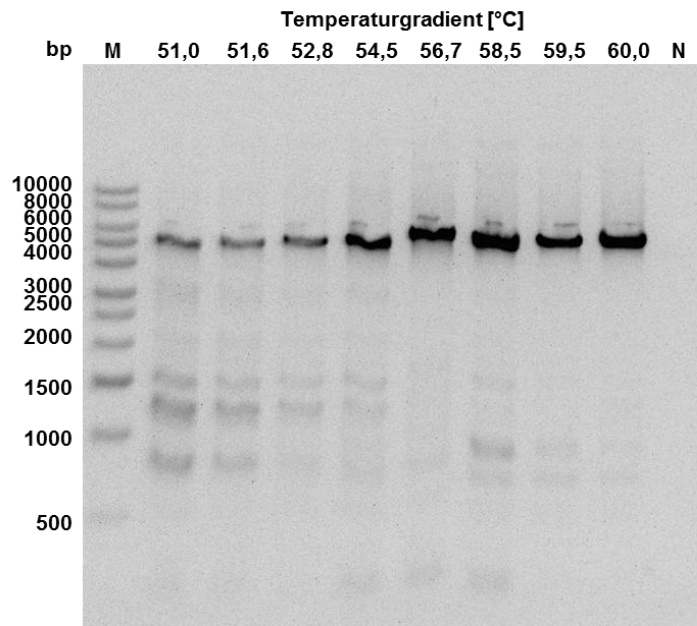


Abbildung 3.67 Agarosegel der mit den Primern Fvelu_lip_fw und Fvelu_lip_rev mittels PCR erhaltenen Amplifikate aus genomischer DNA aus *F. velutipes* bei verschiedenen Temperaturen

Bei allen Temperaturen wurde eine intensive Bande zwischen 4000 und 5000 bp detektiert. Diese Banden wurden ausgeschnitten, mittels PCR Clean up Kit gereinigt und sequenziert. Aufgrund der Größe des Amplifikats wurden zur vollständigen Sequenzierung des Enzyms aus der genomischen DNA sieben weitere Primer entworfen. In Abbildung 3.68 ist die vollständige Sequenz des Gens dargestellt. Die Primerbindungsstellen sind als grüne Balken eingezeichnet, die Exons als graue Balken. Die Exons wurden mit Hilfe des Programms Geneious 9.1.8 anhand der Nukleotidsequenz einer *putative carotenoid ester lipase* (UniProt Zugriffsnummer G8A515) aus *F. velutipes* abgeleitet.



Abbildung 3.68 Darstellung des vollständig sequenzierten Gens der *putative carotenoid ester lipase* (UniProt Zugriffsnummer G8A515) aus *F. velutipes*. Primerbindungsstellen sind grün markiert und Exons grau

Die codierende Sequenz wurde in die entsprechende Aminosäuresequenz umgeschrieben und mit der Sequenz einer *putative carotenoid ester lipase* (UniProt Zugriffsnummer G8A515) aus *F. velutipes* verglichen. In Abbildung 3.69 ist dieser Abgleich der translatierten codierenden Aminosäuresequenz der sequenzierten genomischen DNA, nach Herausschneiden der Introns und Zusammenfügen der Exons, dargestellt. Die Übereinstimmung der Sequenzen, welche bei 96,7% lag, ist in rot dargestellt. Es wurden nur wenige Punktmutationen gegen Ende der Sequenz detektiert.

	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130
Literatur	MTRAPLPHLSHHGPTSEDCLTINVYKPNVVEGAQLPVVAVSSFEVGGTSEYNGTSTVSRSELEQEPVIYVSFNRYLNGFGLASKEYKEAGVGNLGLQDQRLALKHAIQKYVGRFGGDPTKVTIMGESAG													
Sequenzierung	MTRAPLPHLSHHGPTSEDCLTINVYKPNVVEGAQLPVVAVSSFEVGGTSEYNGTSTVSRSELEQEPVIYVSFNRYLNGFGLASKEYKEAGVGNLGLQDQRLALKHAIQKYVGRFGGDPTKVTIMGESAG													
Consensus	MTRAPLPHLSHHGPTSEDCLTINVYKPNVVEGAQLPVVAVSSFEVGGTSEYNGTSTVSRSELEQEPVIYVSFNRYLNGFGLASKEYKEAGVGNLGLQDQRLALKHAIQKYVGRFGGDPTKVTIMGESAG													
	131	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240	250	260
Literatur	AEAVYVHMYSNDGTEGLYRAAFAGSGVSGYGGLENGQDARYDGTVMKTCGSNASDTLACLRTADFDTLKAIDEAEFVHTPFDFGALFSDLQNLILQKQVADYPLITGNCGDEGLYSISYNISTORE													
Sequenzierung	AEAVYVHMYSNDGTEGLYRAAFAGSGVSGYGGLENGQDARYDGTVMKTCGSNASDTLACLRTADFDTLKAIDEAEFVHTPFDFGALFSDLQNLILQKQVADYPLITGNCGDEGLYSISYNISTORE													
Consensus	AEAVYVHMYSNDGTEGLYRAAFAGSGVSGYGGLENGQDARYDGTVMKTCGSNASDTLACLRTADFDTLKAIDEAEFVHTPFDFGALFSDLQNLILQKQVADYPLITGNCGDEGLYSISYNISTORE													
	261	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360	370	380	390
Literatur	FKTFLQTRALPTASDAEIDRLLALYSPDSQSGSPFDGSDNAITPQYKRSRALLGDLLFQTSRRYLINELSGKQDIYTYIHNQRRLPVLGSFHASDLVHYVGGDHSYLRIRFVATLDPNGNTGISHPK													
Sequenzierung	FKTFLQTRALPTASDAEIDRLLALYSPDSQSGSPFDGSDNAITPQYKRSRALLGDLLFQTSRRYLINELSGKQDIYTYIHNQRRLPVLGSFHASDLVHYVGGDHSYLRIRFVATLDPNGNTGISHPK													
Consensus	FKTFLQTRALPTASDAEIDRLLALYSPDSQSGSPFDGSDNAITPQYKRSRALLGDLLFQTSRRYLINELSGKQDIYTYIHNQRRLPVLGSFHASDLVHYVGGDHSYLRIRFVATLDPNGNTGISHPK													
	391	400	410	420	430	440	450	460	470	480	490	500	510	520
Literatur	MTSEAPNHLAFSDDEAVPLSLTEDTYRKEAMARSGHMQSCYIYVQRQIKLLEARYVYGRYPDRASEKVATRIEINTVSIYVAKGKTGRFSATLALPSRASKNKPVPVAVIYVIGFADSTFLNNGIAQATF													
Sequenzierung	MTSEAPNHLAFSDDEAVPLSLTEDTYRKEAMARSGHMQSCYIYVQRQIKLLEARYVYGRYPDRASEKVATRIEINTVSIYVAKGKTGRFSATLALPSRASKNKPVPVAVIYVIGFADSTFLNNGIAQATF													
Consensus	MTSEAPNHLAFSDDEAVPLSLTEDTYRKEAMARSGHMQSCYIYVQRQIKLLEARYVYGRYPDRASEKVATRIEINTVSIYVAKGKTGRFSATLALPSRASKNKPVPVAVIYVIGFADSTFLNNGIAQATF													
	521	530	540	550	560	570	580	590	600	610	620	630	640	650
Literatur	DANSVARDSTSKTGAFHNIYSEDIGSLLAAGAGSHRVLDALELVAPEIDSTRVGVHGCSRYGKALAGIFDORLVEKGLAPHSRLFHGGQKRACTTYRHRIVFPMPISLPLLLLRALPFGIKHNPE													
Sequenzierung	DANSVARDSTSKTGAFHNIYSEDIGSLLAAGAGSHRVLDALELVAPEIDSTRVGVHGCSRYGKALAGIFDORLVEKGLAPHSRLFHGGQKRACTTYRHRIVFPMPISLPLLLLRALPFGIKHNPE													
Consensus	DANSVARDSTSKTGAFHNIYSEDIGSLLAAGAGSHRVLDALELVAPEIDSTRVGVHGCSRYGKALAGIFDORLVEKGLAPHSRLFHGGQKRACTTYRHRIVFPMPISLPLLLLRALPFGIKHNPE													
	651	660	670	680	690	700	710	720	725					
Literatur	GVAGVTFPATOIVYKFLGAEENIGVALRNSGHCDPSGTNNVLDVFKSVLLGSQRTNRYTISPYQAHPEAYPHAI													
Sequenzierung	GVAGVTFPATOIVYKFLGAEENIGVALRNSGHCDPSGTNNVLDVFKSVLLGSQRTNRYTISPYQAHPEAYPHAI													
Consensus	GVAGVTFPATOIVYKFLGAEENIGVALRNSGHCDPSGTNNVLDVFKSVLLGSQRTNRYTISPYQAHPEAYPHAI													

Abbildung 3.69 Abgleich der Translation der sequenzierten gDNA nach Herausschneiden der Introns mit der cDNA einer *putative carotenoid ester lipase* aus *F. velutipes* (UniProt Zugriffsnummer G8A515). Rot: Übereinstimmung

3.7.5 Amplifikation und Sequenzierung des Zielenzym aus *P. citrinopileatus*

Anhand der Nukleotidsequenz einer Carboxylesterase aus *Pleurotus ostreatus* wurden Primer für die Amplifizierung und anschließende Sequenzierung abgeleitet. Die entworfenen Primer wurden am Anfang der Sequenz (PCI_c1+2_for), direkt am Ende der Sequenz (PCI_c2_rev1) sowie in der Mitte (PCI_cons_for1 und PCI_cons_rev1), in einem hochkonservierten Bereich, angesetzt. In Abbildung 3.70 ist die entsprechende Nukleotidsequenz dieser Carboxylesterase (UniProt Zugriffsnummer A0A067NQW6) aus *P. ostreatus* dargestellt. Die Primer sind unterstrichen dargestellt.

<u>ATGTTCTTCG</u>	<u>TTCTACAGGT</u>	CGTGCTTGGG	CTCTTCGCCA	TTCAATCCAC	CGCAACCCCT	60
CTCCCAAGGG	CAAACAGCGT	AACCCTTGAC	TCTGCGACCT	TCACCGGCAC	TACCTCAGGT	120
CGCGTCACCA	AGTTTCTCGG	TATTCCCTTAC	GCCCAACCCC	CTACGGGAGA	CCGCCGGTTC	180
AGGCTACCAG	AGCCCATTCC	ACCGTACACA	GGAACAGTCC	GGGCGACAGC	ATTTGGCCCT	240
GCTTGCCCTC	AGCAAAGTGC	TCGCCTTCCC	TTGCCCGATG	GCCTAGCTAG	CGATGTGGTC	300
GACTTGATCG	TCAACACGGC	ATATAAAGCT	ATCTTCCCAG	ACAGCGAAGA	CTGCCTCTCG	360
ATCAACGTTG	TAGTACCCAC	AAGTGCAACG	CCGACATCCA	AGCTTCCTGT	GGCAGTGTGG	420
ATCTTTGGTG	GTGGTTTCGA	ACTGGGTAGC	CCCAGTCTAT	ATGATGGTGG	TCTGATAGTC	480
GAGCGATCCA	TACAGCTTGG	CGAGCCAGTC	ATCTACGTGA	GCATGAACTA	CAGATTAAGT	540
GCATTTGGCT	TTTTGGCGAG	CCAAGAAGTA	AAAGACGCTG	GCGTTGGAAA	TCTTGGACTG	600
CAAGATCAAC	GTGAAGCATT	ACGCTGGATC	CAGAAGTACA	TCAGCAGCTT	CGGAGGCGAC	660
CCCACGAAGG	TCACTATTTG	GGGAGAGAGT	GCGGGTGCTA	TTTCTGTTGC	ACTCCATATG	720
GTAGCGAACG	ATGGGAATCA	TGAGGGTCTC	TTCCGTGGTG	CCTTCATGCA	GTCTGGATCA	780
CCCATTCCCG	TGGGAGACAT	TTCACACGGT	CAAACGTACT	ATGAGGCTAT	CGCAGCCGAG	840
ACGGGTTGTT	CCAGCGCATC	TGACACCCCTG	GCGTGCTTGC	GATCGGTTCC	GTACTIONACA	900
TTGAAGACCG	CAGTTGATCA	TACACCCTTT	ATATTCGATT	ACCAGTCCCT	GGCGCTTGCA	960
TGGCTTCCCA	GAGCCGACGG	CGTTTTTCTT	ACGGACAACC	CACAGAAGCT	CGTCCAGGCT	1020
GGGAAAGTGG	CGAACGTGCC	ATTCGTAACC	GGCGACTGCG	ACGACGAAGG	CACCCTGTTC	1080
TCCCTAGCGA	ATCTCAACGT	CACTACCACC	AGTCAGGTCC	GGACTTATAT	CAAGACTTTC	1140
TTCATGCCCC	AATCAACGAA	CGCTGAACTG	GATCAAATGT	TGAATCATT	TCCACTGGAT	1200
CTTATACAAG	GATCTCCGTT	CGGCACAGGC	ATTCTGAATG	CATTGTCACC	GCAGTTTAAG	1260
AGGCTTGCTG	CATTTCAAGG	AGACGCTGTA	TTCCAAGCGC	CGCGACGATT	CTTCTTGCAA	1320
CAACGCTCTA	GCAAACAGAA	CACGTGGGCT	TTCTCAGCA	AGCGATTCAA	GGCCGCTCCT	1380
TTCTTTGGCT	CCTTCCACGC	CTCCGACATT	CTCAATGTGT	ACTTCGGTGG	TGAGCTGGGG	1440
GACTACCTCA	TCAACTTCGT	GAATAAGCTC	GATCCCAACG	GCCAAGGGCG	CGGAATCAAC	1500
TGGCCGAAGT	ACACCACATC	GTCGCCGAAC	CTAGTGACCT	TCAACGACAA	CCTCTTCTTC	1560
CCCGTTACAA	TTACCCAAGA	CACTTTCAGA	AAAGATGCCA	TCAACTTTTT	GACCGGTGTG	1620
<u>ACTCTAGCAA</u>	<u>ATCCACTTTG</u>	A				1641

Abbildung 3.70 Nukleotidsequenz der codierenden DNA einer Carboxylesterase (UniProt Zugriffsnummer A0A067NQW6) aus *Pleurotus ostreatus*. Die Primer sind unterstrichen dargestellt

In Abbildung 3.71 ist ein Agarosegel mit Amplifikaten nach Umsetzung der cDNA aus *P. citrinopileatus* mit den Primern PCI_c1+2_for und PCI_c2_rev1 bei verschiedenen Temperaturen dargestellt. Das Amplifikat, zwischen 1500 und 2000 bp, ist im Gel durch einen roten Rahmen hervorgehoben. Diese Bande wurde ausgeschnitten, mittels PCR Clean up Kit gereinigt (2.13.7) und sequenziert (2.13.8). Die Sequenziererergebnisse zeigten keine Übereinstimmung mit der codierenden Sequenz des gesuchten Gens aus *P. citrinopileatus*.

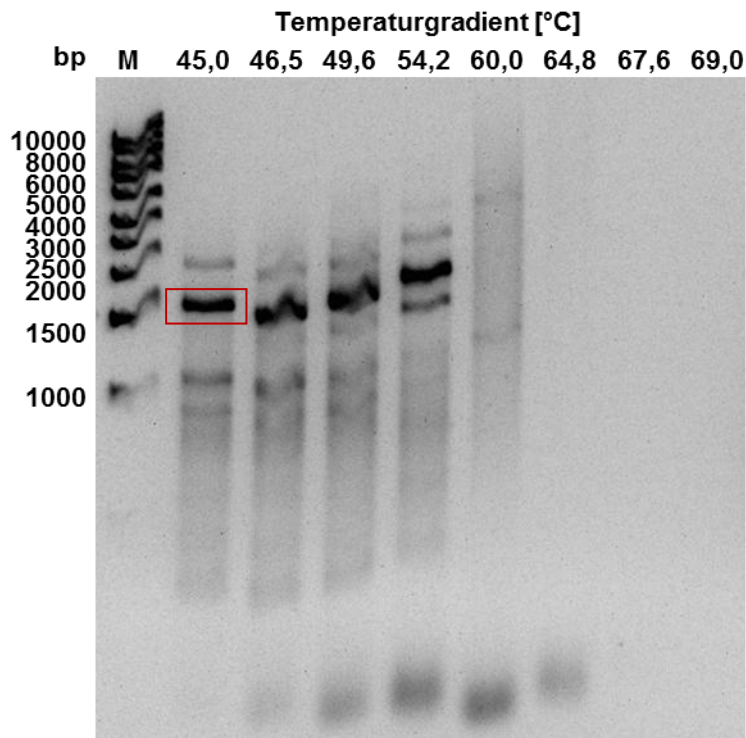


Abbildung 3.71 Agarosegel der mittels PCR erhaltenen Amplifikate aus der cDNA aus *P. citrinopileatus* bei verschiedenen Temperaturen zur Anlagerung der Primer PCI_c1+2_for und PCI_c2_rev1. Roter Kasten: Amplifikat mit entsprechender Größe.

Da das Genom von *P. ostreatus* bekannt ist, ist in Abbildung 3.72 die genomische Sequenz der entsprechenden Carboxylesterase (UniProt Zugriffsnummer A0A067NQW6) aus *P. ostreatus* dargestellt. Die für die Amplifikation des Enzyms aus der genomischen DNA entworfenen Primer sind unterstrichen und die Introns rot dargestellt.

ATGTTCTTCG	TTCTACAGGT	CGTGCTTGGG	CTCTTCGCCA	TTCAATCCAC	CGCAACCCCT	60
CTCCCAAGGG	CAAACAGCGT	AACCCTTGAC	TCTGCGACCT	TCACCGGCAC	TACCTCAGGT	120
CGCGTCACCA	AGTTTCTCGG	TATTCCTTAC	GCCCAACCCC	<u>CGTAAGCCAT</u>	<u>ATAAACCCAGC</u>	180
<u>TTGTAGACGG</u>	<u>TACCCATATA</u>	<u>CTCATTGACG</u>	<u>CGTTATAGTA</u>	CGGGAGACCG	CCGGTTCAGG	240
CTACCAGAGC	CCATTCCACC	GTACACAGGA	ACAGTCCGGG	<u>CGACAGCATT</u>	<u>TGGCCCTGCT</u>	300
<u>TGCCCTCAGC</u>	AAAGTGCTCG	CCTTCCCTTG	CCCATGGCC	TAGCTAGCGA	TGTGGTCGAC	360
TTGATCGTCA	ACACGGCATA	TAAAGCTATC	TTCCAGACA	GCGAAGACTG	<u>TGGGTTGCGC</u>	420
<u>ATTGGTCCAG</u>	<u>TAGTAGACGC</u>	<u>GACCTGAACG</u>	<u>TGTTCCTCCT</u>	<u>TTGCAGGCCT</u>	CTCGATCAAC	480
GTTGTAGTAC	CCACAAGTGC	AACGCCGACA	<u>TCCAAGCTTC</u>	<u>CTGTGGCAGT</u>	<u>GGTACGTTAT</u>	540
<u>TAATATTCTG</u>	<u>TCCGCGTGGT</u>	<u>GACGAAACTG</u>	<u>AACCCGGATG</u>	<u>CGTAGTGGAT</u>	CTTTGGTGGT	600
<u>ATGTCCGATT</u>	<u>TGACGGCGAC</u>	<u>CCTGCATTGG</u>	<u>TACTGATCAG</u>	<u>AGATTACCGC</u>	<u>ACCAGGTGGT</u>	660
TTCGAACTGG	GTAGCCCCAG	TCTGTGAGTG	<u>ACATTCCGAG</u>	<u>AGACTCCCAT</u>	<u>ACTCGTGGAT</u>	720
<u>TCTCATCATA</u>	<u>TGCTTCGCAC</u>	<u>CAATCAGATA</u>	TGATGGTGGT	CTGATAGTCG	<u>AGCGATCCAT</u>	780
<u>ACAGCTTGGC</u>	<u>GAGCCAGTCA</u>	TCTACGTGAG	CATGAACTAC	<u>AGGTATGATC</u>	<u>CTTCCTGTCA</u>	840
<u>CTGTATCGTT</u>	<u>CTAGCTCTGA</u>	<u>CATCGACCGA</u>	<u>ATTAGATTAA</u>	<u>GTGGTGGGTG</u>	<u>CTGTTATCCG</u>	900
<u>TACTTGGTGC</u>	<u>ATACGCACCC</u>	<u>TGACTTTTCT</u>	<u>TTTCCCTACT</u>	<u>CAGCATTGTTG</u>	CTTTTTGGCG	960
AGCCAAGAAG	TAAAAGACGC	TGGCGTTGGA	AATCTTGGAC	TGCAAGATCG	<u>TGCGTGTTTT</u>	1020
<u>CCCCTTTTGC</u>	<u>CCCCTTTCGC</u>	<u>CCCCTAAAGC</u>	<u>GACGCATGTA</u>	<u>GAACGTGAAG</u>	CATTACGCTG	1080
GATCCAGAAG	TACATCAGCA	GGTGAGTTAT	<u>ACTCATGTGG</u>	<u>ATCTGCGACA</u>	<u>ATCAGCTCAA</u>	1140
<u>TTCCCATGGA</u>	<u>GCTTCGGAGG</u>	CGACCCACG	AAGGTCACTA	<u>TGTAAGTGCA</u>	<u>TGGCGCACAC</u>	1200
<u>AGAAGCTTCT</u>	<u>TTCTCGGCTG</u>	<u>ATCCAATGTT</u>	<u>TAAAGTTGGG</u>	GAGAGAGTGC	GGGTGCTATT	1260
TCTGTTGCAC	TCCATATGGT	<u>AGCGAACGAT</u>	<u>GGGAATCATG</u>	AGGGTCTCTT	CCGTGGTGCC	1320
TTCATGCAGT	CTGGATCACC	CATTCCCGTG	GGAGACATTT	CACACGGTCA	AACGTACTAT	1380
GAGGCTATCG	CAGCCGAGAC	GGGTTGTTCC	AGCGCATCTG	ACACCCGGC	GTGCTTGCGA	1440
TCGGTTCGGT	ACTCAACATT	GAAGACCGCA	GTTGATCATA	CACCCTTTAT	ATTTCGATTAC	1500
CAG <u>GTAAGCC</u>	<u>TTACGCCATG</u>	<u>ATGACAAAAT</u>	<u>AACTTGACAA</u>	<u>TGAGACTGTG</u>	<u>ACATAGTCCC</u>	1560
TGGCGCTTGC	ATGGCTTCCC	AGAGCCGACG	<u>GCGTTTTTCT</u>	<u>TACGGACAAC</u>	CCACAGAAGC	1620
TCGTCCAGGC	TGGGAAAGTG	GCGAACGTGC	CATTTCGTAAC	CGGCGACTGC	GACGACGAAG	1680
GCACCCTGTT	CTCCCTAGCG	AATCTCAACG	<u>TCACGTATGA</u>	<u>CACCTTCCTC</u>	<u>TACTGCTTGG</u>	1740
<u>TGCTACGACT</u>	<u>AATGCACTGT</u>	<u>TTAGTACCAC</u>	CAGTCAGGTC	CGGACTTATA	TCAAGACTTT	1800
CTTCATGCCC	CAATCAACGA	ACGCTGAACT	GGATCAAATG	TTGAATCATT	ATCCACTGGA	1860
TCTTATACAA	GGATCTCCGT	TCGGCACAGG	CATTCTGAAT	GCATTGTCAC	CGCAGTTTAA	1920
GAGGCTTGCT	GCATTTCAAG	GAGACGCTGT	ATTCCAAGCG	CCGCGACGAT	TCTTCTTGCA	1980
ACAACGCTCT	AGCAAACAGA	<u>ACACGTGGGC</u>	<u>TTTCCGTACG</u>	<u>TTGATAGCAA</u>	<u>CTTTGATACT</u>	2040
<u>GGAGTGTTTT</u>	<u>GTGACATTCT</u>	<u>CTATAGTCAG</u>	CAAGCGATTTC	AAGGCCGCTC	CTTTCCTTGG	2100
CTCCGTACGC	<u>TTTCTTTTTT</u>	<u>TCTAAATCGA</u>	<u>GCGGTTACTT</u>	<u>AATTCAACTT</u>	<u>CCTCCTGTAG</u>	2160
TTCCACGCCT	CCGACATTCT	CAATGTGTAC	TTCCGTGGTG	AGCTGGGGGA	CTACCTCATC	2220
AACTTCGTGA	ATAAGCTCGA	TCCCAACGGC	CAAGGGCGCG	<u>GAATCAACTG</u>	<u>GCCGAAGTAC</u>	2280
ACCACATCGT	CGCCGAACCT	AGTGACCTTC	AACGACAACC	TCTTCTTCCC	CGTTACAATT	2340
ACCCAAGACA	CTTTCAGAAA	AGATGCCATC	AACTTTTGA	CCGGTGTGAC	TCTAGCAAAT	2400
CCACTTTGA						2409

Abbildung 3.72 Nukleotidsequenz der genomischen DNA einer Carboxylesterase (UniProt Zugriffsnummer A0A067NQW6) aus *Pleurotus ostreatus*. Die Primer sind unterstrichen und die Introns rot dargestellt

In Abbildung 3.73 ist ein Agarosegel der mittels PCR erhaltenen Amplifikate aus genomischer DNA aus *P. citrinopileatus* bei verschiedenen Temperaturen zur Anlagerung der Primer PCI_for1_gDNA, PCI_rev1_gDNA, PCI_rev2_gDNA, PCI_rev3_gDNA und PCI_rev4_gDNA dargestellt. Das Amplifikat, auf Höhe von ca. 2000 bp, ist im Gel durch einen roten Rahmen hervorgehoben. Diese Bande wurde ausgeschnitten, mittels PCR Clean up Kit gereinigt (2.13.7) und sequenziert (2.13.8). Die Sequenziererergebnisse zeigten keine

Übereinstimmung mit der Sequenz der genomischen DNA des gesuchten Gens aus *P. citrinopileatus*.

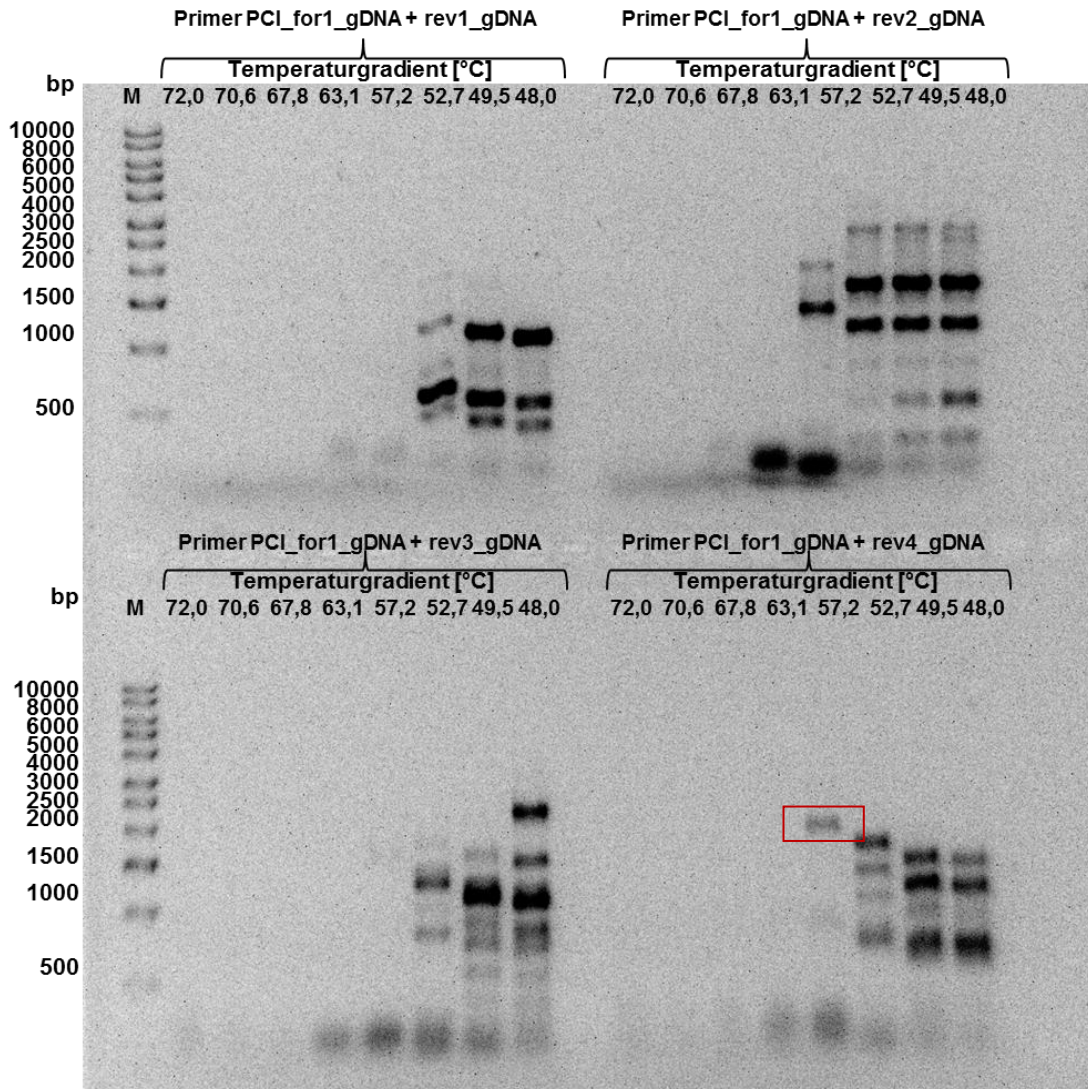


Abbildung 3.73 Agarosegel der mittels PCR erhaltenen Amplifikate aus genomischer DNA aus *P. citrinopileatus* bei verschiedenen Temperaturen zur Anlagerung der Primer PCI_for1_gDNA, PCI_rev1_gDNA, PCI_rev2_gDNA, PCI_rev3_gDNA und PCI_rev4_gDNA. Roter Kasten: Amplifikat mit entsprechender Größe

Weitere Amplifikationen wurden im Anschluss mit den Primern PCI_for1_gDNA und PCI_rev4_gDNA bei 57,2 °C als Hybridisierungstemperatur durchgeführt. Keine der Sequenzierungen war erfolgreich.

DNA-Amplifikate, die nach 2.13.7 isoliert wurden und zu geringe Konzentrationen für eine direkte Sequenzierung aufwiesen, wurden mittels Zero Blunt® Cloning Kit (Invitrogen) in *E. coli* zwischenkloniert. Die Transformation in *E. coli* blieb ohne Erfolg.

3.7.6 Bioinformatische Analyse der Sequenzen

Durch Einfügen der aus der genomischen DNA abgeleiteten Aminosäuresequenz aus *F. velutipes* in verschiedene freizugängliche Datenbanken im Internet (Tabelle 2.13), konnten weitere Parameter des Zielenzym ermittelt werden.

3.7.6.1 Zielenzym aus *F. velutipes*

Die cDNA des Zielenzym aus *F. velutipes* codiert ein Protein mit insgesamt 725 Aminosäuren und hat eine theoretische molekulare Masse von 78,2 kDa. Der berechnete isoelektrische Punkt beträgt 5,4 (ExpASy ProtParam, (Gasteiger *et al.*, 2005)). Das Zielenzym kann aufgrund des konservierten Bereiches der Aminosäuren 17 bis 27 (EDCLTINVVkp) dem Typ 2 der Carboxylesterasen zugeordnet werden. Die Aminosäuren 126 bis 130 bilden eine Pentapeptidsequenz mit dem Strukturmotiv GxSxG um das aktive Zentrum Serin herum, welches typisch für die Enzymklasse der Hydrolasen ist. Somit kann das Enzym der Superfamilie der α/β -Hydrolasen zugeordnet werden (ExpASy Prosite (Sigrist *et al.*, 2002, Sigrist *et al.*, 2013,) und EMBL-EBI InterProSan (Quevillon *et al.*, 2005, McWilliam *et al.*, 2013)). Mit den Programmen NetNglyc 1.0 (Gupta *et al.*, 2004b) und NetoGlyc 4.0 (Steentoft *et al.*, 2013) wurden potentielle N- bzw. O-Glykosylierungsstellen identifiziert. In der Sequenz befinden sich fünf potentielle N- und 19 potentielle O-Glykosylierungsstellen. Mit Hilfe des Programms SignalP 4.1 (Petersen *et al.*, 2011) zur Ermittlung potentieller Schnittstellen für Signalpeptidasen konnte keine Signalsequenz ermittelt werden.

3.7.6.2 Zielenzym aus *P. citrinopileatus*

Für *P. citrinopileatus* konnte keine Sequenz identifiziert werden, anhand von Peptidfragmenten konnte eine hohe Homologie zu einer Carboxylesterase (UniProt Zugriffsnummer A0A067NQW6) aus *P. ostreatus* festgestellt werden.

4 Diskussion

Das Interesse an herzhaften Käsesorten, die ohne Zusatz animalischer Enzyme hergestellt werden, steigt stetig. Da der Vertrieb dieser Produkte auch an ethnische Gruppen des Islams und des Judentums vorgedrungen ist, setzt das voraus, dass diese Produkte halal- bzw. kosher-zertifiziert sind. Der Einsatz animalischer Enzyme ist somit nur noch dann möglich, wenn die Produkte nicht für den Export in Länder dieser Glaubensgemeinschaften vorgesehen sind. Ziel dieser Arbeit war es deshalb diese animalischen Lipasen, welche aus den Zungenwurzeln von Ziegen, Schafen oder Kälbern gewonnen werden, durch mikrobielle Lipasen aus Speisepilzen zu ersetzen. In Deutschland wurden im Jahr 2016 insgesamt 2.494 Mio. Tonnen Käse hergestellt. Die größten Anteile entfallen auf Frischkäse und Schnittkäse. Die Erzeugung von Pasta Filata ist von 2000 bis 2016 um mehr als das Vierfache angestiegen (Tabelle 4.1). Der Pro-Kopf-Verbrauch an Weichkäse lag im Jahr 2016 bei insgesamt 2,3 kg, bei Pasta Filata lag der Verbrauch sogar bei 3,2 kg. Insgesamt wurden im Jahr 2016 in Deutschland pro Kopf 24,5 kg Käse verzehrt (Tabelle 4.2) (Milchindustrie-Verband e.V.). Diese Zahlen machen deutlich, wie groß der Markt ist. Des Weiteren werden bisher nur animalische Produkte eingesetzt, da mikrobielle Lipasen häufig seifige Fehlgerüche generieren.

Tabelle 4.1 Herstellung von Käse in Deutschland von 2000 bis 2016 in 1.000 Tonnen

Jahr	2000	2005	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016
	Angaben in 1.000 t								
Hartkäse	188	208	208	197	210	212	217	217	207
Schnittkäse	471	563	705	692	697	699	696	697	696
Halbfester Schnittkäse	42	48	49	50	49	49	46	55	56
Weichkäse	113	137	145	148	139	135	138	143	160
Frischkäse	759	773	787	812	825	845	848	844	815
Pasta Filata	81	171	245	270	311	305	327	339	359
Schmelzkäse und -zubereitungen	171	177	183	177	165	171	174	173	172
Käse insgesamt	1.857	2.107	2.350	2.373	2.421	2.440	2.472	2.495	2.494

Tabelle 4.2 Pro-Kopf-Verbrauch von Käse in Deutschland von 2010 bis 2016 in kg

Jahr	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016
	Angaben in kg je Kopf						
Hartkäse	1,9	2,0	2,1	2,2	2,2	2,4	2,2
Schnittkäse und halbfester Schnittkäse	6,7	6,9	6,7	6,7	6,9	6,8	7,1
Weichkäse	2,1	2,2	2,0	2,0	2,0	2,1	2,3
Frischkäse	6,8	6,9	6,9	6,7	6,4	8,1	7,7
Pasta Filata	3,4	3,7	4,2	4,2	4,5	3,1	3,2
Schmelzkäse und - zubereitungen	1,6	1,6	1,4	1,5	1,5	1,5	1,4
Käse insgesamt	22,8	23,7	23,7	23,7	24,1	24,6	24,5

4.1 Einsatz von Pilzen als Biokatalysatoren

Pilze spielen eine größere Rolle in unserem Leben als bisher von der Allgemeinheit angenommen. Sie sind in jedem Ökosystem auf der Erde vertreten und könne sowohl als pathogene aber auch als pflanzen-assoziierte, in Symbiose lebende Formen existieren. Einige Spezies sind aus der Biotechnologie nicht mehr weg zu denken (Grube *et al.*, 2017).

Unterschiedliche morphologische, physiologische und ökologische Eigenschaften von Pilzen (Hefen, Schimmelpilze und Fruchtkörper bildende Pilze) tragen zu den unterschiedlichsten Lebensformen bei. Dazu zählen Parasiten, Saprobionten, welche totes, organisches Material hauptsächlich aus Pflanzen abbauen und Symbionten, die Flechten und Mykorrhiza bilden. Spezifische artübergreifende Interaktionen, wie der Kampf um Ressourcen und die Abwehr von Krankheitserregern und Fraßfeinden in ihrer Umgebung, fordert die Produktion einer großen Reihe von bioaktiven Substanzen. Es gibt schätzungsweise 140.000 Pilzspezies, welche aufgrund der Ausbildung von dikariotischen Hyphen zur Klade der Dikarya zusammengefasst werden. Dazu gehören Ascomyceten und Basidiomyceten, die zu den höheren Pilzen zählen und sich durch die Bildung von Fruchtkörpern auszeichnen (Hibbett *et al.*, 2007).

Die Schätzungen der Deutschen Gesellschaft für Mykologie e.V. liegen ebenfalls bei ca. 140.000 pilzlichen Organismen weltweit. In Deutschland liegen die Schätzungen bei ca. 14.000 pilzlichen Organismen (Deutsche Gesellschaft für Mykologie e.V. 2015).

Pilze werden in vielen industriellen Prozessen eingesetzt, dabei haben sie sich vor allem in medizinischen und biotechnologischen Anwendungen bewährt, z.B. in der Produktion von Enzymen, Vitaminen, Polysacchariden und Lipiden. Sekundärmetabolite von Pilzen sind sehr wichtig für unsere Gesundheit und Ernährung und haben enorme ökonomische Bedeutung. Zusätzlich zum Einsatz in vielen Fermentationsprozessen sind sie sehr nützlich für die Ausführung von Biotransformationen (Adrio und Demain, 2003).

Pflanzliche Zellwände bestehen hauptsächlich aus Cellulose, Hemicellulose und Lignin, diese bilden ein komplexes und robustes Geflecht. Pilze nutzen diese Bestandteile als Kohlenstoff- und Energiequelle. Dabei bauen Weißfäulepilze bevorzugt Lignin und Hemicellulose ab, wohingegen Braunfäulepilze die Zersetzung von Cellulose und Hemicellulose bevorzugen (Eriksson *et al.*, 1990, Zabel und Morrell 1992, Schwarze *et al.* 2000, Singh Arora und Kumar Sharma, 2010, Bouws *et al.*, 2008). Für die Umwandlung und den Abbau solch komplexer Bestandteile sekretieren Pilze unter anderem Enzyme wie Laccasen, Peroxidasen, Peptidasen, Esterasen und Lipasen. Diese extrazellulären Enzyme aus Basidiomyceten finden in den unterschiedlichsten biotechnologischen Prozessen Anwendung (Zorn *et al.*, 2005b). Im Jahr 2016 wurde ein Marktwert zwischen 5.000 und 5.500 Millionen \$ für die Enzymentwicklung und die -produktion für industrielle Anwendungen abgeschätzt. Die Lebensmittelindustrie setzt vermehrt auf den Einsatz von Enzymen, z.B. in Milchprodukten, Backwaren, Fruchtsäften, Bier, Wein, aber auch in Reinigungsmitteln, Biokraftstoffen sowie Futtermitteln kommen sie zum Einsatz (Guerrand, 2017). Glycosidasen werden z.B. für die Herstellung von Süßstoffen eingesetzt, die Milchindustrie setzt auf Peptidasen aus Pilzen zur Milchgerinnung und Käseherstellung. Lipasen werden für die Fettmodifikation in der Back- und Milchindustrie eingesetzt. Schätzungen zur Folge stammen 60% der 260 kommerziell erhältlichen Enzyme von Pilzen und davon lediglich fünf von höheren Pilzen (Østergaard und Olsen, 2011).

Lipasen sind dank ihres Potenzials an verschiedenen industriellen Reaktionen, sowohl in wässrigen als auch organischen Systemen, beteiligt. Auf dem Welt-Enzymmarkt haben Lipasen ihren Platz hinter den Glycosidasen und Peptidasen mit einem Anteil von etwas unter 10% des Enzymmarktes eingenommen (Guerrand, 2017). Dabei spielen Lipasen mikrobieller Herkunft eine größere Rolle in der Industrie als Lipasen aus Pflanzen und Tieren, da sie im Vergleich stabiler sind. In der Milchindustrie werden Lipasen zur Ausbildung des Aromas in Käseprodukten (z.B. *enzyme-modified cheese flavour*) eingesetzt. Außerdem

beschleunigen sie den Reifungsprozess von Käse und die Lipolyse des Milchfettes trägt zum spezifischen Aroma bei (Marilley und Casey, 2004, Jooyandeh *et al.*, 2009).

4.2 *Flammulina velutipes*

Der Basidiomycet *Flammulina velutipes*, auch bekannt als Gemeiner Samtfußröbling (Chu *et al.*, 2017), ist ein Weißfäulepilz, der von Frühjahr bis in den späten Herbst auf verschiedenen Harthölzern wächst. Dabei ist er in gemäßigten bis kaltgemäßigten Zonen weit verbreitet. Die Kultivierung findet hauptsächlich in China und Japan statt. Bezogen auf die Produktion und den Verzehr liegt *Flammulina velutipes* auf dem vierten Platz der essbaren Pilze (Leifa *et al.*, 2001, Mizuno *et al.*, 2009). Er zeichnet sich durch seinen hohen Nährwert bezogen auf Vitamine, Aminosäuren, Polysaccharide und Ballaststoffe aus. Die Polysaccharide bilden dabei die Hauptkomponente mit großer biologischer Aktivität wie z.B. zur Verbesserung der Gedächtnisleistung und antioxidative Aktivität (Dong *et al.*, 2017).

4.3 *Pleurotus citrinopileatus*

Der zu den höheren Pilzen zählende *Pleurotus citrinopileatus*, auch bekannt als Zitronenseitling, zählt zur Gattung der *Pleuroten* aus der Familie der *Pleurotaceae* (Seitlinge) (Zhang *et al.*, 1994, Liu *et al.*, 2012). In China, Japan und Tawain ist er eine gefragte Spezialität bezüglich seines Geschmacks und seiner gesundheitsfördernder Eigenschaften. Die Spezies wächst in Gruppierungen von kleinen, hellgelben Trichtern auf umgestürzten Bäumen und Stümpfen von Laubbäumen. Der Extrakt dieser Pilze ist wirksam bei antioxidativen Prozessen, Herz-Kreislauf-Erkrankungen, Diabetes und Tumoraktivitäten (Liu *et al.*, 2012).

4.4 Referenzenzym opti-zym z10uc

4.4.1 Hydrolyseprofil des Referenzenzyms

Bei der Ziegenzungengrundlipase opti-zym z10uc handelt es sich um eine animalische Lipase, die für die Herstellung von Käsesorten wie Provolone, Feta oder Kaschkawal zum Einsatz kommt. Dieses Enzym wurde vom Projektpartner optiform GmbH zur Verfügung gestellt und diente als Referenz für das Screening geeigneter Basidiomyceten für den Einsatz im Käsereiprozess. Die optiform GmbH empfiehlt eine Dosage von 20 g bis 150 g in 1000 L Kesselmilch. Angelehnt an diese Mengen wurde ein Hydrolyseprofil dieser Lipase gegenüber sechs verschiedener Substrate *p*-Nitrophenylacetat, -butyrat, -valerat, -hexanoat, -octanoat und -palmitat im Esterase- bzw. Lipaseassay aufgenommen. Laut Herstellerangaben sollte das Referenzenzym gut in Wasser löslich sein, was nicht bestätigt werden konnte. Daher wurden unterschiedliche Konzentrationen des Enzyms in verschiedenen Lösungsmitteln angesetzt. Die Messungen der empfohlenen Konzentrationen erbrachten keine Ergebnisse, daher mussten die Konzentrationen um den Faktor 1000 angepasst werden, um Aktivität im Assay nachweisen zu können. Die schlechte Löslichkeit des Enzyms erforderte außerdem den Einsatz unterschiedlichster Lösungsmittel, wobei sich Kaliumphosphatpuffer (80 mM, pH 7) mit dem Zusatz von 0,5% Triton X-100 als Emulgator als am besten geeignet herausstellte. Dennoch war das Enzym in keinem verwendeten Lösungsmittel vollständig gelöst. Wenn man davon ausgeht, dass das Enzym zur Käseherstellung eingesetzt wird und daher in Milch gelöst wird, könnte das bedeuten, dass Milch das am besten geeignete Lösungsmittel sein könnte. Da es sich dabei aber um eine Emulsion handelt wäre eine photometrische Messung zur Bestimmung der Aktivität nicht möglich. Auch der Einsatz von Ultraschallwellen und Erhitzen brachte keinen Erfolg beim Versuch das Enzym in Lösung zu bringen.

Imran *et al.* (2008) untersuchten verschiedene physikochemische Parameter der Milch von Büffeln, Kühen und Ziegen. Sie ermittelten dabei pH-Werte von 6,9, 6,8 und 6,6. Das pH-Optimum von opti-zym z10uc wurde in dieser Arbeit nicht bestimmt. Wenn man von einer optimalen Stabilität des Enzyms in Milch ausgeht, dann sollte der optimale pH-Wert im schwach sauren Bereich liegen. Die optimalen Bedingungen bezogen auf pH-Wert und Temperatur von prägastrischen Enzymen aus verschiedenen Tierarten wurden von verschiedenen Arbeitsgruppen bestimmt. O'Connor *et al.* (1996) ermittelten einen optimalen pH-Wert von 6,4 für eine Lammlipase und von 6,0 für eine Ziegenlipase. Die optimalen Temperaturen betragen 43 °C bzw. 52 °C. Als Substrat für die Aktivitätsbestimmungen kam Tributyrin zum Einsatz. Ebenfalls mit prägastrischen Enzymen aus Ziegen beschäftigten sich

Lai *et al.* (1997); sie bestimmten einen optimalen pH-Bereich zwischen 5,6 und 6,5 und einen optimalen Temperaturbereich zwischen 43 °C und 60 °C. Laut Hersteller (Caglificio Clerici) des Referenzzyms opti-zym z10uc liegt das Temperaturoptimum bei 32 °C, somit deutlich unter den optimalen Werten der prägastrischen Enzyme aus der Literatur. Allerdings ist zu beachten, dass es sich um ein Gemisch handelt und nicht um ein gereinigtes Enzym.

Das Hydrolyseprofil des Referenzzyms zeigte eine Substratspezifität bevorzugt gegenüber kurz- und mittelkettigen Fettsäuren (Abbildung 3.2). Die höchsten Aktivitäten wurden demnach gegenüber pNPH, gefolgt von pNPO, pNPV, pNPB, pNPA und in geringem Maße auch pNPP generiert. Ein direkter Vergleich mit ähnlichen Enzymen anhand von Literaturdaten ist an dieser Stelle schwierig, da diese im Gegensatz zum verwendeten Enzymgemisch in den meisten Fällen gereinigt wurden. Die Stereo-, Substrat- und Regiospezifität prägastrischer Esterasen aus Ziegenkitz, Kalb und Lamm wurden von Villeneuve *et al.* (1996) untersucht. Die Lipasen wiesen bei der Hydrolyse chiraler Triglyceride eine Substratspezifität gegenüber kurzkettigen Fettsäuren und eine Stereospezifität in S_N-3-Position auf. Zu denselben Erkenntnissen kamen auch Lai *et al.* (1997) für die Hydrolyse kurzkettiger Acylreste aus bovinem Milchfett durch prägastrische Lipasen aus Ziegen und Kitzen.

4.4.2 Bestimmung der Molekülmasse des Referenzzyms mittels elektrophoretischer Methoden

Die Bestimmung der Molekülmasse des Referenzzyms erfolgte mittels elektrophoretischer Methoden. Abbildung 3.4 und Abbildung 3.5 zeigen ein halbnatives und ein denaturierendes SDS-PAGE-Gel. Im halbnativen Gel wurden insgesamt sieben Banden mit Molekülmassen zwischen 9 und 84 kDa sichtbar. Im denaturierenden Gel wurden mehrere teils sehr schwache Banden mit Molekülmassen zwischen ca. 10 und 93 kDa detektiert. Da es sich bei dem Referenzzym um ein nicht gereinigtes Enzymgemisch handelt und es mit Natriumchlorid, Molkenpulver und Milchpulver versetzt zum Verkauf angeboten wird, war zu erwarten, dass mehrere Banden in der Coomassie-Färbung sichtbar wurden. Die Färbung des halbnativen Gels mittels Aktivitätsfärbelösung machte keine Banden sichtbar. Tay und Gam (2011) untersuchten die Gesamtheit der Proteine in menschlicher sowie Kuh- und Ziegenmilch mittels SDS-PAGE. Dabei wurden unter anderem Caseine (α_{S2} -, α_{S1} -, β - und κ -Casein), β -Lactoglobulin und α -Lactalbumin identifiziert. Die aufgezählten Proteine konnten sowohl in Kuh- als auch in Ziegenmilch identifiziert werden, allerdings liegen in Ziegenmilch

mehr Proteine vor als in Kuhmilch. Der größte Unterschied zwischen Kuh- und Ziegenmilch ergibt sich ab Molekülmassen zwischen ~50 und ~73 kDa (Tay und Gam, 2011). Lee *et al.*, (1980) bestimmte die Molekülmassen kommerziell erhältlicher prägastrischer Esterasen aus dem Zungengrund von Kälbern, Kitzen und Lämmern. Die Reinigung der prägastrischen Esterasen erfolgte mittels Größenausschlusschromatographie und anschließender Polyacrylamidgel-Elektrophorese. Die prägastrische Esterase aus Kälbern war mit einer molekularen Masse von ~172 kDa am größten, gefolgt von der Kitzesterase mit 168 kDa und der Lammesterase mit 150 kDa. Zu anderen Erkenntnissen kamen hingegen Calvo und Fontecha (2004). Sie reinigten prägastrische Esterasen aus Kitzen mittels FPLC und ermittelten eine molekulare Masse von 53 kDa für das isolierte Enzym, welches die höchste Aktivität gegenüber pNPB aufwies. Lai *et al.* (1998) ermittelten mittels SDS-PAGE eine molekulare Masse von 50 kDa für die ebenfalls mittels chromatographischer Methoden gereinigten Enzymepräparationen aus Kitzen und Ziegen.

4.4.3 Ermittlung des isoelektrischen Punktes des Referenzenzym

Die Bestimmung des isoelektrischen Punktes erfolgte mittels IEF, dabei wurden mehrere Banden in einem Bereich von pI 4,5 und 6,9 sichtbar. Die Hauptbanden lagen bei pI ~4,5 und ~6,3. In der Aktivitätsfärbung wurden zwei schwache Banden bei pI ~5,3 und ~6,0 detektiert. Caro *et al.* (1995) reinigten und charakterisierten eine prägastrische Lammlipase und ermittelten ebenfalls mittels IEF den isoelektrischen Punkt des Enzyms. Dabei wurden vier schwache Banden mit isoelektrischen Punkten von 4,6, 4,7, 4,9 und 5,1 und eine Hauptbande mit einem pI von 4,8 sichtbar. Die im opti-zym z10uc ermittelten Werte liegen im selben Bereich wie die durch Caro *et al.* (1995) gereinigte und charakterisierte Lammlipase. Allerdings ist zu beachten, dass es sich bei opti-zym z10uc, im Gegensatz zu der beschriebenen Lammlipase, um kein gereinigtes Enzym handelt.

4.5 Screening geeigneter Basidiomyceten

4.5.1 Kultivierung der Basidiomyceten

Aus der institutseigenen Stammsammlung wurden insgesamt 31 verschiedenen Basidiomyceten ausgewählt (Tabelle 2.2). Dabei handelte es sich ausschließlich um Speisepilze. Das Screening der Basidiomyceten nach geeigneten Lipasen erfolgte in Submerskulturen in Malzextraktpepton-Medium (MEP). Zuvor wurden die Basidiomyceten zur Stammhaltung auf

Malzextraktpepton-Agarplatten (MEPA) kultiviert. Abbildung 3.7 zeigt die verschiedenen Basidiomyceten *Lentinus squarrosulus*, *Auricularia fuscusuccinea*, *Flammulina velutipes*, *Pleurotus eryngii* und *Pleurotus citrinopileatus* nach einwöchigem Wachstum auf Malzextraktpepton-Agarplatten. Bei diesen Basidiomyceten handelte es sich um Weißfäule-Pilze. Das Wachstum verlief in Bezug auf die Wachstumsdauer und die Myzelbeschaffenheit sehr unterschiedlich, zu erkennen an der nach einer Woche schon voll bewachsenen Platte mit *L. squarrosulus* im Gegensatz zu *P. eryngii*, der das langsamste Wachstum auf der Platte zeigte. Die Vorkulturen dieser Basidiomyceten in MEP-Medium wiesen nach sieben Tagen Kulturführung ebenfalls Unterschiede in der Farbe des Mediums, der Pelletform und -größe sowie in der Wachstumsdauer des Myzels auf (Abbildung 3.8). Das eingesetzte Medium wies nach einer Woche Kulturführung eine rotbraune Farbe auf, welche sich bei *L. squarrosulus* und *P. citrinopileatus* nach einer Woche hellgelb färbte. Bei den übrigen Basidiomyceten blieb das Medium bernsteinfarben. *F. velutipes* bildete runde, haarige Pellets aus, *P. citrinopileatus* und *S. squarrosulus* bildeten ebenfalls runde aber größere Pellets aus. Einzig *P. eryngii* bildete keine runden Pellets, sondern eher ein fadenförmiges Myzel in Submerskultur. In Abbildung 3.9 sind die Hauptkulturen der Basidiomyceten *F. velutipes* und *P. citrinopileatus* in Malzextraktpepton-, Kartoffel-Glucose-Medium und Standard-Nährlösung nach zweiwöchiger Kultivierung aufgeführt. Auch hier sind Unterschiede in der Färbung des Mediums sowie der Struktur und Form der Pellets zu erkennen. Vor allem die Kulturen von *P. citrinopileatus* waren nach zwei Wochen in SNL- und MEP-Medium voll bewachsen und viskos. Die Farbe des MEP-Mediums wurde hellgelb und das helle Medium der SN-Lösung verfärbte sich braun. Bei *F. velutipes* waren die Kulturen auch nach zwei Wochen nicht voll bewachsen, aber auch hier färbte sich die SN-Lösung braun.

4.5.2 Esterase- bzw. Lipaseaktivitäten in den Kulturüberständen

Das Sekretionsprofil von Esterasen bzw. Lipasen der Basidiomyceten wurde analog zum Referenzenzym anhand photometrischer Assays mittels sechs verschiedener Substrate quantitativ erfasst. Die Selektion vielversprechender Organismen erfolgte durch den Vergleich mit dem Hydrolyseprofil des Referenzzyms. Basierend auf den Resultaten des Screenings wurden zwei weitere Medien für die Hauptkulturführung zur Optimierung der Enzymexpression eingesetzt. Dabei handelte es sich um die Standardnährlösung und das Kartoffel-Glucose-Medium. Die oben genannten Basidiomyceten wurden entsprechend in

allen drei Medien kultiviert und die Esterase- bzw. Lipaseaktivität erneut über einen Zeitraum von 32 Tagen in den Kulturüberständen bestimmt.

Der Vergleich der Hydrolyseprofile des Basidiomyceten *F. velutipes* mit dem Referenzenzym zeigt die größte Übereinstimmung und die höchsten Aktivitäten in den Kulturen in KG- und MEP-Medium gegenüber den Substraten pNPH und pNPV (Abbildung 3.10). In SN-Lösung lag vor allem Enzymaktivität gegenüber dem Substrat pNPA vor. In den Kulturüberständen des Basidiomyceten *P. citrinopileatus* in den verschiedenen Medien lagen die geringsten Aktivitäten in KG-Medium und in SN-Lösung vor (Abbildung 3.11). Die Kultur in MEP-Medium erreichte dagegen höhere Enzymaktivitäten, wobei das Hydrolyseprofil nicht genau dem des Referenzenzym entspricht, denn die höchsten Aktivitäten wurden mit den länger-kettigen Substraten pNPO und pNPP ermittelt. Die höchsten Aktivitäten in den Kulturüberständen von *P. eryngii* wurden in SN-Lösung erreicht, allerdings nicht nur bezogen auf die Substrate pNPO und pNPP (Abbildung 3.12). Aufgrund dessen wurde auch bei diesem Basidiomyceten das MEP-Medium am geeignetsten, bezogen auf das Hydrolyseprofil, angesehen.

Den Hauptbestandteil der Medien (Tabelle 2.15, Tabelle 2.16, Tabelle 2.17) macht die Kohlenstoffquelle aus. Dabei besteht das KG-Medium neben Wasser hauptsächlich aus Glucose, auch in SN-Lösung macht die Glucose neben Wasser den größten Anteil aus. In MEP-Medium ist es der Malzextrakt. Neben der Kohlenstoffquelle sind in SN-Lösung Hefeextrakt und Asparagin als Stickstoffquellen enthalten; dieses Medium ist von diesen Medien das komplexeste. Im Gegensatz dazu besteht das MEP-Medium aus zwei Komponenten, dabei dient Sojapepton als Stickstoffquelle. Das KG-Medium besteht ebenfalls nur aus zwei Komponenten, beinhaltet aber hauptsächlich Kohlenhydrate und nur wenig Stickstoff. Die verschiedenen Basidiomyceten sind in allen Medien gewachsen. Bezogen auf die ermittelten Aktivitäten in den Kulturüberständen der verschiedenen Medien, wurde das Malzextraktpepton-Medium als das am besten geeignete Medium ausgewählt. Dass Pepton dabei eine entscheidende Rolle für die Lipaseproduktion spielt, wurde schon 1963 von Alford und Pierce festgestellt; sie kultivierten *Pseudomonas fragi* in einem 1%-igen Peptonmedium und erreichten darin die höchsten Lipaseaktivitäten. Chander *et al.* (1980) kultivierten *Aspergillus wentii* in einem Glucose-haltigen Medium mit 2% Pepton und ermittelten darin die höchsten Lipaseaktivitäten. Vor allem das Hydrolyseprofil des Basidiomyceten *Flammulina velutipes* kam dem Profil des Referenzenzym sehr nahe. Die beiden Pleuroten *P. citrinopileatus* und *P. eryngii* zeichneten sich durch ihre hohen Aktivitäten gegenüber den länger-kettigen Substraten pNPO und pNPP aus. Entscheidend war der Einsatz der Enzyme aus verschiedenen Basidiomyceten im Käse- und Fleischprozess; dabei setzten sich die Kandidaten *Flammulina velutipes* und *Pleurotus citrinopileatus*, aufgrund des ähnlichen Fettsäureprofils im Vergleich zum Referenzenzym, durch.

4.5.3 Aktivitätssteigerung durch Zusatz geeigneter Induktoren

Lipasen sind in verschiedenen metabolischen Prozessen involviert. Daraus folgt, dass die Genexpression streng reguliert ist (Lotti und Alberghina, 2007). Lipasen aus Pilzen kommen in den meisten Fällen extrazellulär vor (Ghosh *et al.*, 1996) und werden stark durch verschiedene Faktoren wie Temperatur, pH-Wert, Stickstoff- und Kohlenstoffquelle, aber auch durch Fette, Salze, Schüttelgeschwindigkeit und Sauerstoffgehalt beeinflusst (Gupta *et al.*, 2004a). Den größten Einfluss auf die Expression von Lipasen hat die Kohlenstoffquelle (Lotti *et al.*, 1998). Als Induktoren können z.B. Öl, Fettsäuren, Triglyceride, Ester, Salze, Tween oder auch Glycerol zum Einsatz kommen. Aber auch die Stickstoffquelle ist wichtig für das Wachstum und die Optimierung der Enzymproduktion. Das richtige Verhältnis der einzelnen Medienbestandteile spielt dabei auch eine entscheidende Rolle (Ghosh *et al.*, 1996, Lotti *et al.*, 1998, Gupta *et al.*, 2004a).

Durch den Zusatz geeigneter Induktoren zum Kulturmedium während der Submerskultivierung ist es möglich, die Sekretion gewünschter Enzyme zu steigern. Daher wurden dem Malzextraktpepton-Medium verschiedene Induktoren zugesetzt zur Steigerung der Sekretion der extrazellulären Esterasen/Lipasen. Bei diesen Induktoren handelte es sich um Fett, das mittels der Methode nach Weilbull-Stoldt aus Speisequark extrahiert wurde, Butterschmalz und Butter. In den Abbildung 3.13, Abbildung 3.14 und Abbildung 3.15 sind die Aktivitäten der Basidiomyceten *F. velutipes*, *P. citrinopileatus* und *P. eryngii* in MEP-Medium mit diesen Induktoren dargestellt.

Durch die Verwendung von Fett aus Quark als Induktor konnte die Aktivität bei *F. velutipes* im Mittel nicht gesteigert werden. Sowohl die Verwendung von Butter als auch von Butterschmalz bewirkten dagegen eine leichte Erhöhung der Enzymaktivität. Der Vergleich mit dem Hydrolyseprofil des Referenzzyms zeigte (Abbildung 3.1) hohe Übereinstimmungen. Bei *P. citrinopileatus* wurde die Enzymaktivität durch die Zugabe von Butter reduziert. Dagegen konnten sowohl Fett aus Quark als auch Butterschmalz die Aktivitäten steigern. Insbesondere gegen Ende der Kultivierung wurde nach Zugabe von Butterschmalz eine Aktivitätszunahme verzeichnet. Mit allen Kulturüberständen wurden hauptsächlich die Substrate *p*NPO und *p*NPP umgesetzt. Eine Aktivitätssteigerung wurde bei *P. eryngii* hauptsächlich durch die Zugabe von Butterschmalz erreicht.

Neben der Steigerung der Sekretion extrazellulärer Esterasen/Lipasen war auch eine Maßstabsvergrößerung entscheidend, um ausreichende Mengen für die Applikation im Käseprozess generieren zu können, auch im Hinblick auf den Einsatz im industriellen Maßstab. Die Kultivierung fand zu Anfang in 250-mL-Erlenmeyerkolben statt und wurde dann

auf 500-mL- bzw. 1-L-Erlenmeyerkolben ausgeweitet. Die Aktivitätsbestimmung erfolgte in diesem Fall bezogen auf das am besten umgesetzte Substrat des jeweiligen Basidiomyceten im photometrischen Assay. Die Maßstabsvergrößerung führte bei *F. velutipes* (Abbildung 3.16) zu keiner nennenswerten Änderung der Enzymaktivität (bezogen auf das Substrat pNPH). Durch die Vergrößerung des Kulturvolumens wurde die Enzymaktivität im Kulturüberstand des Basidiomyceten *P. citrinopileatus* (Abbildung 3.17) deutlich reduziert, was nicht zu erwarten war, da alle Kultivierungs-Parameter lediglich an das größere Volumen angepasst und nicht verändert wurden. Die Vergrößerung des Kulturvolumens hatte bei *P. eryngii* (Abbildung 3.18) zur Folge, dass das Aktivitätsmaximum bezogen auf das Substrat pNPO später erreicht wurde. Möglicherweise wurde durch ein größeres Volumen und eine größere Oberfläche in den größeren Kolben die Expression verzögert.

Die Bestimmung der Proteinkonzentrationen in den verschiedenen Medien zeigte im Vergleich die höchste Proteinkonzentration für *F. velutipes* und *P. citrinopileatus* in MEP-Medium und für *P. eryngii* in SN-Lösung. Allerdings korrelierten die höchsten Proteingehalte dabei nicht mit den höchsten enzymatischen Aktivitäten, was möglicherweise auf andere Enzyme in den Kulturüberständen, wie Peptidasen, Peroxidasen oder Laccasen, die nicht ermittelt wurden, zurückzuführen sein könnte.

4.6 Enzymreinigung

4.6.1 Verschiedene Reinigungsmethoden im Vergleich

Die Reinigung von Enzymen besteht meist aus mehreren aufeinanderfolgenden Schritten, welche oft mit hohen Verlusten der Enzymaktivität einhergehen. Für den Einsatz von Esterasen bzw. Lipasen aus Speisepilzen für den Käseprozess war es daher wichtig eine schonende, schnelle und vor allem kostengünstige Reinigungsmethode zu etablieren.

4.6.2 Reinigung mittels präparativer Schaumfraktionierung

Bei der Schaumfraktionierungsanalyse handelt es sich um ein sehr schonendes, kostengünstiges sowie schnelles Verfahren zur Reinigung von Enzymen. Schon 1920 hatte Ostwald die präparative Schaumfraktionierung patentieren lassen (Ostwald, 1920). Das Prinzip der Methode beruht auf der Abtrennung von oberflächenaktiven, löslichen

Verbindungen aus stark verdünnten, wässrigen Lösungen (Uraizee und Narsimhan, 1990). Um eine Grenzschicht zwischen Gas und Flüssigkeit zu generieren, wird ein inertes Gas in die mit Zielprotein enthaltene Lösung eingeleitet. Die oberflächenaktiven Verbindungen lagern sich an diese Phasengrenzfläche an und werden mit dem gebildeten Schaum abgetrennt (Loha *et al.*, 1997). Das Prinzip der Schaumfraktionierung macht sich die Eigenschaft zu Nutze, dass sich grenzflächenaktive Substanzen an die Gasblasen anlagern. Dabei ragen die hydrophoben Teile des Moleküls ins Innere der Gasblasen und die hydrophilen Teile nach außen in die wässrige Phase. Der sowohl mit oberflächenaktiven aber auch mit nicht-oberflächenaktiven Molekülen beladene Schaum steigt in der Säule auf und durch physikalische Mechanismen wie Koaleszenz und Drainage werden die adsorbierten Moleküle angereichert, wobei die mitgerissenen nicht-oberflächenaktiven Substanzen zurück in die Ausgangslösung fließen. Innerhalb der Säule kommt es zu einer Art chromatographischen Trennung durch unterschiedliche Hydrophobizitäten der einzelnen Molekülgruppen. Entscheidend für eine effektive Adsorption ist die Konzentration der Moleküle, die zwischen 10^{-7} und 10^{-3} mol L⁻¹ liegen sollte (Maas 1973). Durch Anlegen von Vakuum wird der Schaum mit dem konzentrierten Zielenzym in flüssiger Form aufgefangen. Die maximale Hydrophobizität von Proteinen liegt dabei an dem ihrem isoelektrischen Punkt entsprechenden pH-Wert. An diesem Punkt sind die Proteine in wässrigen Phasen schlecht löslich und adsorbieren daher verstärkt an die Phasengrenzfläche zwischen Gas und Flüssigkeit (Charm *et al.*, 1966, Desouza *et al.*, 1991, Loha *et al.*, 1997). Durch eine isoelektisch fokussierte, präparative Schaumfraktionierung ist daher eine selektive Trennung unterschiedlicher Proteine möglich. Neben den aufgeführten Einflussparametern wie dem pH-Wert und der Konzentration spielen auch die Gasflussrate, die Gasart, der Zusatz geeigneter Additive, die Säulendimension, der Flüssigkeitsstand der Ausgangslösung und die verwendete Fritte, entscheidend für die Gasblasengröße, eine wichtige Rolle.

Die Durchführung der Reinigung mittels isoelektrisch fokussierter, präparativer Schaumfraktionierung erfolgte insgesamt mit sechs verschiedenen Basidiomyceten, darunter *Pleurotus sapidus*, *Lentinus squarrosulus*, *Pleurotus eryngii*, *Auricularia fuscusuccinea*, *Pleurotus citrinopileatus* und *Flammulina velutipes*. Die Schaumfraktionierung führte nur unter Einsatz des Kulturüberstandes des Basidiomyceten *P. citrinopileatus* zum Erfolg. Die Parameter pH-Wert, Temperatur, Säulendimension und damit einhergehend das Volumen der Ausgangslösung sowie die Gasflussrate und die Schaumfraktionierungszeit wurden variiert. Nach Brown *et al.* (1999) sind sowohl der Säulendurchmesser als auch die Säulendimension entscheidend für den Prozess. Somit werden höhere Anreicherungen erzielt je länger die Säule ist, da der Schaum länger aufsteigt und damit die Koaleszenz und die Drainage begünstigt werden. Je mehr Ausgangslösung zur Verfügung steht, desto länger wird ein

Kontakt zwischen oberflächenaktiven Substanzen und der Phasengrenze gefördert (Uraizee und Narsimhan, 1996). Genau umgekehrt verhält es sich bei der Gasflussrate. Je höher diese ist, umso geringer fallen die Anreicherungsfaktoren aus, da mehr Flüssigkeit mit in den Schaum übergeht und somit eine schlechtere Trennung zwischen oberflächenaktiven und nicht-oberflächenaktiven Substanzen stattfindet. Entgegen dieser Erwartungen wurden bei der Schaumfraktionierung des Kulturüberstandes von *P. citrinopileatus* höhere Anreicherungsfaktoren bei Verwendung der kleineren Säule mit weniger Ausgangsvolumen und höherer Gasflussrate erreicht. Die Ergebnisse der Schaumfraktionierung des Kulturüberstands von *P. citrinopileatus* sind in Abbildung 3.22 und Abbildung 3.23 sowie Tabelle 3.1 aufgeführt. Die Proteinausbeute betrug 8,8% und es konnte eine Anreicherung um den Faktor 6,7 erzielt werden. Die Wiederfindung der Aktivität lag bei 11,6%. Allerdings wurden neben den Esterasen/Lipasen auch Peptidasen konzentriert. Linke *et al.* (2009) beschrieben die Schaumfraktionierung des Kulturüberstandes von *P. sapidus* zur Abtrennung extrazellulärer Esterasen aus Flüssigkulturen und erreichten den höchsten Anreicherungsfaktor von 62,0 bei niedriger Begasungsrate. Des Weiteren wird beschrieben, dass Peptidasen bei höheren Begasungsraten mit in den Schaum übergehen. Da eine Schaumfraktionierung im Falle von *P. citrinopileatus* aber nur bei hoher Gasflussrate möglich war, konnte keine vollständige Trennung der Esterasen/Lipasen von Peptidasen aus der Ausgangslösung erreicht werden. Aufgrund des Eintrags von Peptidasen in den Schaum erwies sich die Schaumfraktionierung als nicht optimal zur Reinigung der Enzympräparationen für den Einsatz im Käse, da durch Peptidasen Bitterpeptide im Käse entstehen, welche nicht erwünscht sind.

4.6.3 Reinigung mittels chromatographischer Methoden

In den meisten Fällen reicht eine einstufige chromatographische Reinigung nicht aus, um ein ausreichend gereinigtes Produkt zu erhalten (Gilbert *et al.*, 1991, Hiol *et al.*, 2000, Nieter *et al.*, 2014). Daher werden in der Regel mehrere chromatographische Reinigungsstufen kombiniert. Dabei kommt die Ionenaustauschchromatographie am häufigsten zum Einsatz, vor allem unter Nutzung der Diethylaminoethyl-Gruppe (DEAE) als Anionenaustauscher. Für den zweiten Reinigungsschritt wird vor allem die Gelfiltration herangezogen. Erst darauf folgen Reinigungen mittels Affinitäts- oder hydrophober Interaktionschromatographie (Saxena *et al.*, 2003). Saxena *et al.* (2003) haben verschiedene Methoden zum Reinigen von Lipasen verglichen und stellten fest, dass es keine optimale Methode gibt, die auf alle Lipasen eines jeden Organismus übertragen werden kann.

Zorn *et al.* (2003, 2005a) gelang es, eine Xanthophyllester-Hydrolase als erstes Enzym dieser Klasse aus dem Kulturüberstand des Basidiomyceten *Pleurotus sapidus* zu isolieren und auf molekularer Ebene zu charakterisieren. Linke *et al.* (2013) untersuchten die Sekretion von Esterasen des Basidiomyceten *Pleurotus sapidus* in einem mit Tween 80 angereicherten Nährmedium und entdeckten dabei eine Feruloyl-Esterase. Die Reinigung dieser Hydrolasen aus dem Kulturüberstand erfolgte jeweils über einen zweistufigen Reinigungsprozess mittels FPLC. Als erste Reinigungsstufe diente eine schwache Anionentauschersäule und die aktiven Fraktionen wurden anschließend vereint, konzentriert und einer Größenausschlusschromatographie unterzogen.

Die meisten mikrobiellen Lipasen liegen extrazellulär vor. Daher erfolgt nach der Kultivierung eine Trennung von Überstand und Zellen entweder mittels Zentrifugation oder Filtration. Im Anschluss wird der Kulturüberstand konzentriert, was mittels Ultrafiltration, Präzipitation mittels Ammoniumsulfat oder durch Zusatz von organischen Lösungsmitteln erfolgen kann. Die meisten der Reinigungsschemen setzen bisher auf den Einsatz einer Präzipitation, dabei wird häufig Ammoniumsulfat verwendet. Darauf folgen in der Regel chromatographische Reinigungsmethoden wie z.B. die Gelfiltration oder die Affinitätschromatographie. Die Reinigung der Lipasen hängt dabei von der eingesetzten Konzentration der Ammoniumsulfatlösung ab (Pabai *et al.*, 1995, Saxena *et al.*, 2003). Die Vorteile der Präzipitation sind unter anderem, dass große Mengen umgesetzt werden können. Außerdem resultiert diese Art der Reinigung in höheren Ausbeuten als andere Methoden (Aires-Barros und Cabral, 1991).

Angelehnt an diese Methoden wurden die Überstände der Basidiomyceten *F. velutipes* und *P. citrinopileatus* nach Kultivierung in MEP-Medium unter Zusatz von Butterschmalz als Induktor am Tag ihrer maximalen Aktivität mittels Filtration vom Myzel getrennt. Das Aktivitätsmaximum wurde bei *F. velutipes* am Kulturtag 14 und bei *P. citrinopileatus* am Tag 21 erreicht. Im Anschluss an die Ernte des Kulturüberstands fand eine erste Reinigung mittels Proteinpräzipitation mit Ammoniumsulfat statt. Die optimale Ammoniumsulfat-Sättigung wurde anhand einer fraktionierten Fällung für die zwei Basidiomyceten ermittelt. Für *F. velutipes* wurde eine optimale Sättigung bei 70% und für *P. citrinopileatus* bei 60% erreicht.

Die erhaltenen Pellets wurden in Puffer resuspendiert und anschließend mittels Tangentialfluss-Filtration Moleküle >300 kDa abgetrennt. Darauf folgte die Filtration mittels Vivaflow200 mit einer Ausschlussgröße von <10 kDa zum Konzentrieren und Umpuffern der Enzympräparationen.

Aufgrund der großen Aktivitätsverluste und der Zeit, die bei einem mehrstufigen chromatographischen Reinigungsprozess aufgewendet werden muss, haben sich Sztajer und Bryjak (1989) mit der Konzentrierung und Reinigung von Lipasen mittels Ultrafiltration beschäftigt. Sie testeten dabei zwei verschiedene Membrantypen, zum einen Polyacrylnitril und zum anderen Polysulfon, jeweils mit einer Ausschlussgröße von 10 kDa. Die Polysulfon-Membran eignete sich besser für die Konzentrierung, wohingegen die Polyacrylnitril-Membran besser für eine erste Fraktionierung geeignet war. Die Konzentrierung der Kulturüberstände nach der Fällung erfolgte in dieser Arbeit ebenfalls an einer Polysulfon-Membran und diente als Vorstufe zur chromatographischen Reinigung mittels FPLC.

Als Säule diente eine Diethylaminoethyl Sepharose *Fast Flow* Säule (DEAE-FF). Dabei handelt es sich um einen schwachen Anionenaustauscher. Als Laufmittel wurden zwei verschiedene Kaliumphosphat-Puffer verwendet (Laufpuffer A, 50 mM, pH 7,0 und Laufpuffer B, 50 mM, pH 7,0 mit 1 M NaCl). Durch Anlegen eines Salzgradienten von 0 M bis 1 M Natriumchlorid erfolgte die Trennung. Die gesammelten Fraktionen wurden auf ihre Esteraseaktivität hin untersucht. Die aktiven Fraktionen eluierten sowohl bei *F. velutipes* als auch bei *P. citrinopileatus* ab einer Salzkonzentration von ca. 0,7 M (Abbildung 3.24, Abbildung 3.25). Nach erneuter Konzentrierung und Umpufferung der aktiven Fraktionen, wurden diese auf eine Größenausschlusschromatographie-Säule aufgetragen. Die Trennung erfolgte dabei isokratisch mit einem Kaliumphosphatpuffer (50 mM, pH 7,0, 0,15 M NaCl). Auch hier wurden die gesammelten Fraktionen auf ihre Aktivität hin überprüft. Signifikante Aktivität verteilte sich bei *F. velutipes* auf vier Fraktionen (Abbildung 3.26). Beim Kulturüberstand von *P. citrinopileatus* verteilte sich die Aktivität auf 13 Fraktionen (Abbildung 3.27). Des Weiteren wurde auf die Größenausschlusschromatographie-Säule ein Standard (Tabelle 2.35) aufgetragen, um die molekularen Massen der Proteine in den erhaltenen Enzymfraktionen berechnen zu können. Dabei wurden für *F. velutipes* Molekülmassen in den aktivsten Fraktionen zwischen 17 und 71 kDa berechnet und bei *P. citrinopileatus* wurden für die Fraktionen 24 bis 29 Molekülmassen zwischen 423 und >670 kDa ermittelt.

Die Vielzahl der nacheinander durchgeführten Aufarbeitungsschritte ging mit hohen Aktivitätsverlusten einher. Die Ausbeute lag bei 0,4% für *F. velutipes* und 2,9% für *P. citrinopileatus*. Die spezifische Aktivität konnte aber bei beiden Basidiomyceten gesteigert werden, was sich in einem Reinigungsfaktor von 22,9 für *F. velutipes* und 19,5 für *P. citrinopileatus* widerspiegelt (Tabelle 3.4 und Tabelle 3.5). Linke *et al.*, (2013) reinigten eine Feruloyl-Esterase aus dem Kulturüberstand von *P. sapidus* über eine Anionenaustauschersäule und im Anschluss mittels Größenausschluss und erreichten dabei einen Reinigungsfaktor von 14,7 mit einer Ausbeute von 1,3%. Die ermittelten Werte liegen somit in einem ähnlichen Bereich.

4.6.4 Bestimmung der Molekülmassen der Zielenzyme mittels elektrophoretischer Methoden

Die aktivsten Fraktionen der verschiedenen Reinigungsstufen wurden auf unterschiedliche Gele aufgetragen. Dabei handelte es sich um denaturierende, halbnative SDS-PAGE- und im Falle von *P. citrinopileatus* auch native PAGE-Gele. In allen Gelen wurden auch nach mehreren Reinigungsstufen jeweils mehrere Banden in den Gelen sichtbar, eine mögliche Erklärung dafür wäre die Oligomerisierung der Zielenzyme, welche im reduzierten Zustand in ihre Einzeleinheiten zerfallen.

Mozaffar und Weete (1993) reinigten eine extrazelluläre Lipase aus *Pythium ultimum* mittels Präzipitation mit Ammoniumsulfat und anschließender zweistufiger Reinigung mittels einer Anionenaustauschersäule und Größenausschlusschromatographie. Dabei detektierten sie mittels Größenausschlusschromatographie eine Molekülmasse von 270 kDa, welche in der denaturierenden SDS-PAGE eine Bande mit einer Molekülmasse von 68 kDa zeigte. Diese Erkenntnisse deuten darauf hin, dass es sich bei dem Enzym im nativen Zustand um ein Tetramer handelt. Die meisten extrazellulären Lipasen aus Pilzen weisen als Monomer eine molekulare Masse zwischen 19 und 64 kDa auf (Mozaffar und Weete, 1993, Saxena *et al.*, 2003). Eine aus *Antrodia cinnamomea* erhaltene Lipase weist eine molekulare Masse von 60 kDa auf (Shu *et al.*, 2006), ebenso wie eine Lipase aus dem Basidiomyceten *Schizophyllum commune* (Singh *et al.*, 2014). Für eine extrazelluläre Lipase aus *Aspergillus niger* wurde eine molekulare Masse von 32,2 kDa ermittelt (Mhetras *et al.*, 2009).

Diese Beobachtungen machten auch Zorn *et al.* (2005a). Die von ihnen gereinigte und charakterisierte Carboxylesterase aus dem Kulturüberstand von *Pleurotus sapidus* wies in der SDS-PAGE eine Bande mit einer Molekülmasse von 54,9 kDa auf und unter nativen Bedingungen der Größenausschlusschromatographie eine Masse von 430 kDa, was bedeutet, dass das aktive Enzym ein Homo-Octamer bildet.

Im Falle von *F. velutipes* liegt die Vermutung nahe, dass es sich im nativen Zustand um ein Dimer handeln könnte, zu erkennen an den Banden im halbnativen Gel auf einer Höhe von ca. 34 kDa und ca. 70 kDa sowohl in Fraktion 14 als auch in Fraktion 15. Die Berechnung der molekularen Masse anhand des Standards der Größenausschlusschromatographie wies für Fraktion 14 eine molekulare Masse von 71 kDa und für Fraktion 15 von 35 kDa auf. In beiden Fraktionen wurden die gleichen Peptidfragmente sequenziert. Für dieses Enzym wurde eine molekulare Masse von 78,2 kDa berechnet. In Bezug auf die Banden in der nativen Page auf einer Höhe von ca. 530 kDa und 130 kDa und den berechneten

Molekülmassen zwischen >670 und 423 kDa, könnte es sich bei *P. citrinopileatus* um ein Octamer handeln. Die kalkulierte molekulare Masse von 59,2 kDa der Carboxylesterase aus *P. ostreatus*, welche anhand von Peptidfragmenten eine hohe Homologie zum Zielenzym aus *P. citrinopileatus* aufwies, stützt diese Vermutung.

4.6.5 Bestimmung der isoelektrischen Punkte der Zielenzyme

Die Bestimmung der entsprechenden isoelektrischen Punkte der Zielenzyme von *F. velutipes* und *P. citrinopileatus* erfolgte mittels isoelektrischer Fokussierung (Abbildung 3.32). Für *F. velutipes* lag der isoelektrische Punkt zwischen 3,5 und 4,3 und für *P. citrinopileatus* bei ca. 6,3. Der kalkulierte isoelektrische Punkt, der anhand der Aminosäuresequenz des Zielenzym aus *F. velutipes* berechnet wurde, betrug 5,4. Der pI für die Sequenz einer Carboxylesterase aus *P. ostreatus*, welche hohe Homologien zu dem Zielenzym aus *P. citrinopileatus* aufwies, lag bei 5,8. Der Vergleich der mittels IEF ermittelten Werte mit den aus den Sequenzen kalkulierten isoelektrischen Punkten, zeigte vor allem bei *F. velutipes* große Unterschiede. Für die Xanthophyll-Esterase von Zorn *et al.* (2005a) wurde ein isoelektrischer Punkt von 4,5 ermittelt. Die Feruloyl-Esterase, die von Linke *et al.* (2013) charakterisiert wurde, wies einen pI von 5,7 auf. Der theoretische pI, der anhand der Sequenz der Feruloyl-Esterase aus *P. sapidus* kalkuliert wurde lag hingegen bei 6,33. Der Vergleich zeigt, dass die ermittelten Werte mit den Werten für eine Xanthophyll-Esterase und eine Feruloyl-Esterase aus der Literatur in einem ähnlichen Bereich liegen. Das Beispiel der Feruloyl-Esterase zeigt außerdem, dass durchaus Abweichungen der berechneten und gemessenen Werte auftreten können.

4.7 Biochemische Charakterisierung

Eine umfassende biochemische Charakterisierung der Zielenzyme aus den Kulturüberständen von *F. velutipes* und *P. citrinopileatus* erfolgte nach den oben beschriebenen Aufarbeitungsschritten mit den jeweils aktivsten Fraktionen.

Die Bestimmung der nachfolgend aufgeführten Optima erfolgte für *F. velutipes* mit dem bevorzugt umgesetzten Substrat pNPH. *P. citrinopileatus* hingegen setzte bevorzugt das Substrat pNPO um, welches für die Ermittlung der folgenden Daten zum Einsatz kam.

4.7.1 Ermittlung der pH- und Temperaturoptima der Zielenzyme

Die Bestimmung des pH-Optimums erfolgte in einem breiten pH-Bereich von pH 5 bis pH 11 und wurde unter Verwendung zweier verschiedener Puffer durchgeführt. In beiden Puffern konnte für die Zielenzyme beider Organismen ein Optimum von 8,5 bestimmt werden. Die Aktivität lag aber auch in einem Bereich von pH 7,5 bis pH 9,5 noch bei ca. 80% der maximalen Aktivität (Abbildung 3.33). Piscitelli *et al.* (2017) bestimmten das pH-Optimum zweier rekombinanter Lipasen aus *Pleurotus ostreatus* in einem Bereich von pH 2 bis 12. Das Optimum lag bei pH 7, aber auch in einem Bereich von pH 6 bis 9 lag die Enzymaktivität noch bei ca. 50%. Diese Beobachtungen machten auch El-Ghonemy *et al.* (2017) mit einer extrazellulären Lipase aus einem neuen Pilz *Curvularia sp.*; bei dieser Lipase lag das Optimum bei pH 8, aber in einem Bereich zwischen pH 6 bis 9 konnte eine Aktivität von über 90% bestimmt werden. Die ermittelten Ergebnisse für *F. velutipes* und *P.citrinopileatus* sind mit den Daten aus der Literatur vergleichbar.

Die Ermittlung des Temperaturoptimums der Zielenzyme aus *F. velutipes* und *P. citrinopileatus* erfolgte in einem Temperaturbereich von 25 °C bis 65 °C. Für die Zielenzyme beider Basidiomyceten wurde eine optimale Temperatur von 60 °C ermittelt (Abbildung 3.34). Das Temperaturoptimum zweier rekombinanter Lipasen aus *Pleurotus ostreatus* wurde in einem Bereich von 30 °C bis 60 °C bestimmt und lag bei beiden Enzymen bei 40 °C. Bei 30 °C und 60 °C betrug die Aktivität noch $\geq 80\%$, abgesehen von einer der Lipasen, welche bei 60 °C nur noch ca. 60% der Anfangsaktivität aufwies (Piscitelli *et al.*, 2017). Die Lipase aus *Curvularia sp.* hatte ihr Optimum bei 50 °C, war aber auch bis zu 30 min bei 60 °C noch zu 100% aktiv. Nach 60 min sank die Aktivität auf ca. 60% (El-Ghonemy *et al.*, 2017). Das bestimmte Temperaturoptimum liegt deutlich über den Optima anderer charakterisierter Lipasen aus der Literatur. Aber auch hier sind die Enzyme meist über einen großen Temperaturbereich aktiv, was für Lipasen nicht ungewöhnlich ist.

4.7.2 Einfluss von Salzen auf die Aktivität der Zielenzyme

Aufgrund des Einsatzes verschiedener Salze während des Reinigungsprozesses der Proteine, wurden die Aktivitäten bei unterschiedlichen Natriumchlorid-Konzentrationen von 0 bis 1 M bestimmt. Dabei konnte die maximale Aktivität bei *F. velutipes* unter Zusatz einer Salzkonzentration von 0,2 M bestimmt werden, bei einer Salzkonzentration von 1 M betrug die Aktivität noch ca. 70%. Bei *P. citrinopileatus* lag die höchste Aktivität bei einem

Salzgehalt von 1 M (Abbildung 3.35). Die Aktivität betrug bei allen ermittelten Konzentrationen $\geq 80\%$.

Der Zusatz von Ammoniumsulfat führte zu einer Aktivitätsabnahme; ab einer Konzentration von 0,8 M war keine valide Messung mehr möglich. Bei einer Konzentration von 0,6 M wurden noch Aktivitäten $> 60\%$ bestimmt (Abbildung 3.36). Borkar *et al.* (2009) reinigten und charakterisierten eine extrazelluläre Lipase aus *Pseudomonas aeruginosa* und setzten unterschiedliche Reagenzien ein um eine inhibierende oder aktivierende Wirkung festzustellen. Dabei konnte die Aktivität des Enzyms durch den Zusatz von Natrium-, Calcium- und Magnesiumchlorid (jeweils 2 mM) gesteigert werden. Der Zusatz von EDTA, DMSO und β -Mercaptoethanol hingegen führte zu Aktivitätsverlusten. Bei *P. citrinopileatus* konnte die Enzymaktivität durch eine Natriumchlorid-Konzentration von 1 M gesteigert werden. Bei *F. velutipes* ging eine Konzentration von 0,2 M NaCl mit einer Steigerung der Aktivität einher, höhere Molaritäten hingegen inhibierten das Enzym. Der Einsatz von Ammoniumsulfat hatte auf die Zielenzyme beider Basidiomyceten eine inhibierende Wirkung. Durch Dialyse könnte ermittelt werden, ob die Inhibierung der Aktivität reversibel oder irreversibel ist.

4.7.3 Verschiedene Stabilitätsuntersuchungen der Zielenzyme

Aufgrund des Einsatzes der Zielenzyme im Käseprozess und der damit verbundenen erforderlichen Aktivität über einen längeren Zeitraum, wurde die Stabilität der Enzyme bei 24 °C, 37 °C und 60 °C über einen Zeitraum von 0 bis 24 h getestet. Bei Temperaturen von 24 °C und 37 °C hatte das Enzym aus *F. velutipes* schon nach 1 h ca. 50% seiner Anfangsaktivität verloren. Bei *P. citrinopileatus* lag die Aktivität nach 1 h und 24 °C noch bei 80 %, bei 37 °C hingegen nur noch bei ca. 20%. In beiden Fällen führte die Inkubation bei 60 °C, dem bestimmten Temperaturoptimum, zur Inaktivierung der enzymatischen Aktivität (Abbildung 3.37). Da die Bestimmung des Temperaturoptimums nach einer Inkubation von lediglich 10 min erfolgte, ist diese Temperatur anhand der hier gezeigten Ergebnisse nicht für den Einsatz über längerer Zeit geeignet. Zwischen Temperaturen von 24 °C und 37 °C können daher über längere Zeit höhere Umsatzraten erreicht werden. Für den Einsatz im Käse ist es von Vorteil, wenn die Lipase ihre Aktivität bei höheren Temperaturen verliert, da das Enzym in der zurückbleibenden Molke nicht mehr aktiv sein darf. Nach kurzzeitigem Erhitzen für 30 s auf 72 °C, wie es bei der Pasteurisation üblich ist, konnte keine Aktivität mehr nachgewiesen werden, was für die Verwendung der beim Käseprozess anfallenden Molke unabdingbar ist.

Die Bestimmung der Stabilität der Enzyme bei einer Lagerung von 4 °C, -20 °C und -80 °C erfolgte nach 0, 60, 94 und 121 Tagen. Das Enzym aus *F. velutipes* verlor nach 60 Tagen bei einer Lagerung bei 4 °C ca. 30% der Aktivität, bei -20 °C und -80 °C betrug der Verlust ca. 60%. Nach 121 Tagen wurden bei 4 °C noch 50% der Aktivität nachgewiesen, wohingegen bei -20 und -80 °C nur noch ca. 15% ermittelt werden konnten. Die Aktivität der Enzymfraktion aus *P. citrinopileatus* nahm über eine Lagerung von 121 Tagen weniger stark ab, außerdem war die Stabilität bei allen Temperaturen vergleichbar. Für *F. velutipes* wurde eine Lagertemperatur von 4 °C bevorzugt, für die Enzymfraktion aus *P. citrinopileatus* erwies sich eine Lagertemperatur von -20 °C als am besten geeignet (Abbildung 3.38).

4.7.4 Bestimmung der kinetischen Parameter K_M und v_{max} der Zielenzyme

Die kinetischen Parameter K_M und v_{max} wurden für *F. velutipes* und für *P. citrinopileatus* bestimmt, indem die Reaktionsgeschwindigkeit bei konstanter Enzymkonzentration und variierender Substratkonzentration ermittelt wurde. Somit wurden für das Enzym aus *F. velutipes* die kinetischen Parameter K_M mit 1,79 mM und v_{max} mit 0,45 $\mu\text{M min}^{-1}$ gegenüber dem Substrat pNPH bestimmt. Für das Enzym aus *P. citrinopileatus* ergab sich für das Substrat pNPO eine Michaelis-Menten-Konstante von 2,5 mM und v_{max} von 9,34 $\mu\text{M min}^{-1}$. Eine vollständige Substratsättigung während der Michaelis-Menten-Kinetik wurde nicht erreicht.

Liu *et al.* (2013) charakterisierten eine Esterase aus *Rhizomucor miehei* und ermittelten einen K_M -Wert von 0,12 mM und v_{max} von 1852,6 $\mu\text{M min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ gegenüber dem Substrat pNPH. Für das Substrat pNPO wurden die kinetischen Parameter K_M mit 0,82 mM und v_{max} mit 721 $\mu\text{M min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ bestimmt.

Der niedrigere K_M -Wert für das Substrat pNPH bei *F. velutipes* spricht für eine höhere Affinität des Enzyms zum Substrat als es bei *P. citrinopileatus* für das Substrat pNPO der Fall war, aber im Vergleich zu den Werten aus der Literatur sind die Affinitäten zu den Substraten in beiden Fällen deutlich niedriger (Borkar *et al.*, 2009).

Die Michaelis-Menten-Kinetik basiert darauf, dass die Biokatalyse in einer homogenen Phase stattfindet, in der sowohl das Substrat als auch das Enzym löslich sind. Lipasen hingegen arbeiten bevorzugt an einer Grenzfläche zwischen Substrat und Wasser, daher ist das klassische Modell der Enzymkinetik nicht anwendbar. Verger *et al.* (1973) sowie Verger und Haas (1976) haben dafür ein einfaches Modell vorgeschlagen, um die Kinetik der

Lipolyse an einer Grenzfläche zu beschreiben. Diese Theorie basiert darauf, dass sich zwei aufeinander folgende Gleichgewichte einstellen. In der ersten Phase adsorbiert das Enzym an die Grenzfläche und im zweiten Schritt folgt die Bindung an ein Substratmolekül, es wird der Enzym-Substrat-Komplex gebildet, welcher dem Michaelis-Menten-Gleichgewicht entspricht. Anschließend wird das Produkt freigesetzt und das Enzym regeneriert sich, bleibt aber an der Grenzfläche adsorbiert. Das Modell berücksichtigt die Tatsache, dass die Konzentration des Substrates in der Nähe der adsorbierten Lipase an der Grenzfläche der Konzentration an der Oberfläche entspricht und wird in Mol pro Flächeneinheit statt in Volumenkonzentration angegeben. Die regenerierte Lipase bleibt an der Grenzfläche adsorbiert und wird erst nach mehreren Katalysezyklen wieder freigesetzt (Collins *et al.*, 2004). Da die kinetischen Parameter anhand der kürzerkettigen Substrate ermittelt wurden, ist davon auszugehen, dass es sich vor allem bei *F. velutipes* eher um eine Esterase als um eine Lipase handelt. Da hohe Aktivitäten bei *P. citrinopileatus* nicht nur gegenüber pNPO sondern auch gegenüber dem längerkettigen Substrat pNPP nachgewiesen werden konnten, könnte es sich in diesem Fall auch um eine Lipase handeln.

Für eine eindeutige Zuordnung der Zielenzyme zur Klasse der Lipasen bzw. der Esterasen ist eine umfassende Bestimmung der kinetischen Parameter, anhand mehrerer Substrate, durchzuführen.

4.8 Käseherstellung

4.8.1 Chemische Prozesse während der Käsereifung

Gemäß § 1 Absatz 1 der Käseverordnung sind „Käse frische oder in verschiedenen Graden der Reife befindliche Erzeugnisse, die aus dickgelegter Käsereimilch hergestellt sind.“

Die Einteilung von Käse in verschiedene Gruppen erfolgt gemäß § 6 Absatz 1 der Käseverordnung anhand des Wassergehaltes in der fettfreien Käsemasse in insgesamt sechs Käsegruppen (Tabelle 4.3).

Tabelle 4.3 Käsegruppen und der entsprechende Wassergehalt in der fettfreien Käsemasse

Käsegruppe	Wassergehalt in der fettfreien Käsemasse
Hartkäse	56% oder weniger
Schnittkäse	mehr als 54% bis 63%
Halbfester Schnittkäse	mehr als 61% bis 69%
Sauermilchkäse	mehr als 60% bis 73%
Weichkäse	mehr als 67%
Frischkäse	mehr als 73%

Käse aus Ziegenmilch wird aufgrund besonderer sensorischer Eigenschaften sehr geschätzt. Dabei spielt die Lipolyse eine entscheidende Rolle für die sensorischen Eigenschaften. Es konnte gezeigt werden, dass einige freie Fettsäuren direkt zum charakteristischen Aroma mancher Käsesorten beitragen, oder indirekt als Präkursoren einiger Aromakomponenten dienen (Forss, 1979). Die Fettsäuren Hexan-, Octan- und Decansäure, welche auch als Capron-, Capryl- und Caprinsäure bezeichnet werden, werden für das charakteristische Aroma von Ziegenkäse verantwortlich gemacht. Zusätzlich tragen die verzweigtkettigen Fettsäuren 4-Methyloctan-, Methyldecan-, 3-Methylbutter- und 4-Ethyloctansäure, zum Ziegenaroma von Käse bei (Attaie und Richter, 1996, Le Quéré *et al.*, 1998).

In dieser Arbeit wurde Weichkäse vom Typ Feta hergestellt, da die Herstellung schnell und einfach durchzuführen war und mit einer vergleichsweise kurzen Reifezeit der Käselaibe einherging. Traditionell stammt Feta aus Griechenland. Es handelt sich dabei um einen weichen, weißen Käse, der aus Schafsmilch oder einem Gemisch aus Schafs- und Ziegenmilch hergestellt wird. Der Anteil der Ziegenmilch beträgt dabei maximal 20 bis 30%. Traditionell wird Feta aus nicht pasteurisierter Milch hergestellt, heutzutage werden die meisten Feta jedoch aus pasteurisierter Milch hergestellt (Anifantakis 1991, Manolopoulou *et al.*, 2003). In Abbildung 4.1 ist ein Fließdiagramm zur Herstellung von Weichkäse vom Typ Feta dargestellt (Mallatou *et al.*, 2003). Nach diesem Schema wurden die Käselaibe in dieser Arbeit aus 3 bzw. 10 L Milch hergestellt. Es kam ausschließlich pasteurisierte Kuhmilch zum Einsatz. Der Zusatz verschiedener Lipasen diente der Ausbildung des charakteristischen Aromas von Feta. Als Lipasen kamen das Referenzenzym opti-zym z10uc, Piccantase® KLC, eine rekombinante prägastrische Esterase der Firma DSM und Enzympräparationen von insgesamt acht verschiedenen Basidiomyceten (Tabelle 2.53), die mittels unterschiedlicher Verfahren gereinigt und konzentriert wurden, zum Einsatz.

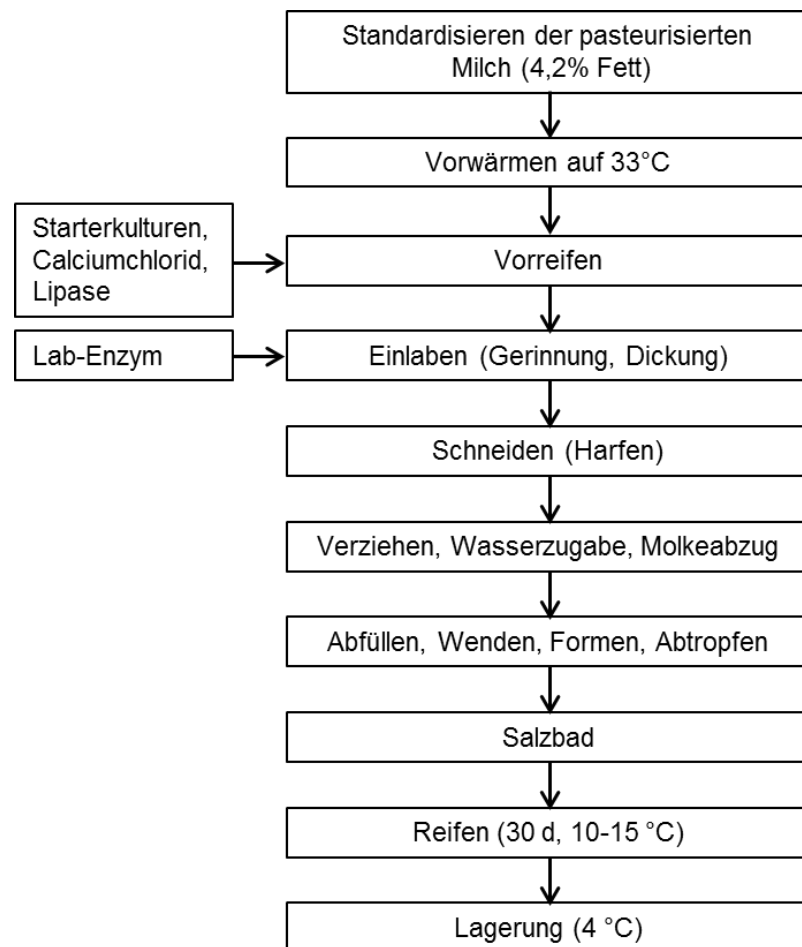


Abbildung 4.1 Fließdiagramm zur Herstellung von Weichkäse vom Typ Feta (modifiziert nach (Akin *et al.*, 2003, Mallatou *et al.*, 2003))

Es gibt zwei prinzipielle Arten zum Ausfällen der Caseine bei der Käseherstellung: Zum einen kann die Milch durch den Einsatz von Säuerungskulturen und zum anderen durch den Einsatz von Labenzymen koagulieren. In manchen Fällen kommen auch Säuerungskulturen und Labenzyme zum Einsatz. Am häufigsten wird Lab eingesetzt, welches früher hauptsächlich aus jungen Kälbermägen gewonnen wurde und heutzutage als rekombinantes Enzym zum Einsatz kommt (Jooyandeh *et al.*, 2009).

Die Reifezeit von Käse, die mittels Lab hergestellt werden, reichen von zwei Wochen bei Mozzarella über zwei Jahre oder länger bei Parmigiano-Reggiano. Während der Reifung finden verschiedene mikrobiologische und biochemische Veränderungen statt, die zum charakteristischen Aroma und der Textur der verschiedenen Sorten beitragen. Die biochemischen Veränderungen während der Reifung können in primäre und sekundäre Prozesse unterteilt werden. Die primären Abläufe werden in die Lipolyse, die Proteolyse und

den Metabolismus von Lactose und Lactat sowie Citrat unterteilt. Die sekundären Abläufe tragen vor allem zur Bildung von flüchtigen Aromakomponenten bei und schließen den

Metabolismus von Fettsäuren und Aminosäuren mit ein (Fox *et al.*, 1995, Fox und McSweeney, 1996, McSweeney, 2004).

Durch Hydrolyse der Triglyceride durch endogene und/oder exogene Lipasen während der Käsureifung werden Fettsäuren freigesetzt. Dabei sind Triglyceride aus dem Milchfett von Wiederkäuern besonders reich an kurzkettigen Fettsäuren, welche signifikant zum Aroma einiger Käsesorten beitragen. Neben dem direkten Einfluss auf das Aroma sind die Fettsäuren wichtige Präkusoren für die Produktion flüchtiger Aromakomponenten. Die originär in der Milch enthaltene Lipoprotein-Lipase, welche bevorzugt mittelkettige Fettsäuren (C_6 bis C_{12}) in S_{N1} und S_{N3} Position hydrolysiert, wird durch die Pasteurisation der Milch inaktiviert (Olivecrona *et al.*, 2003, Driessen 1989, Collins *et al.*, 2004). Kommerziell eingesetzte Labextrakte, die für die Herstellung vieler Käsesorten zum Einsatz kommen, enthalten keine Lipaseaktivität. Für die Herstellung verschiedener italienischer Käsesorten wie Provolone oder des typischen Feta aus Griechenland werden Labextrakte mit Lipaseaktivität eingesetzt. Dabei handelt es sich um prägastrische Esterasen, die bevorzugt kurzkettige Fettsäuren an der S_{N3} Position von Triglyceriden hydrolysieren (McSweeney, 2004).

Die Proteolyse ist ein sehr komplexer und einer der wichtigsten Prozesse der primären biochemischen Abläufe, welche während der Käsureifung stattfindet. Die Proteolyse hat Einfluss auf die Textur des Käses und auf das Aroma. Die enzymatische Hydrolyse des Caseins in unterschiedlich große Peptide bis hin zu freien Aminosäuren führt teilweise zu Fehleraromen, die sich in einem seifigen oder bitteren Geschmack des Käses niederschlagen. Die für die Proteolyse verantwortlichen Peptidasen können aus insgesamt sechs verschiedenen Quellen stammen. Zum einen aus Lab (Chymosin, Pepsin), milcheigenen Enzymen (Plasmin, Cathepsin), Starterbakterien und Nichtstarterbakterien (Proteinasen, Endo-, Amino- Di- und Tripeptidasen, prolinspezifische Peptidasen) sowie aus sekundären Kulturen wie *P. camembertii* in Camembert und Blauschimmelkäse, die nicht für die Säuerung zuständig sind. Zum anderen können exogene Proteinasen und/oder Peptidasen zur Milch oder zum Bruch dazugegeben werden, um die Reifung zu beschleunigen. Das am häufigsten eingesetzte proteolytische Enzym ist Chymosin (Fox, 1989, Fox und Law, 1991, Sousa *et al.*, 2001, McSweeney, 2004).

4.8.2 Herstellung von Testkäse unter Einsatz verschiedener Lipasen

In Kooperation mit dem Projektpartner optiform GmbH wurden Applikationstests durchgeführt. Dazu wurden Käselaiibe der Käsesorte Weichkäse vom Typ Feta unter Lipase-Zusatz erzeugt. Die Testkäse wurden für 30 Tage bei 10 bis 15 °C gereift und anschließend für weitere 12 Wochen bei 4 °C gelagert. Über den Reifungs- und Lagerungszeitraum hinweg wurden die generierten Käsespezialitäten jeweils im Vergleich zum Referenzprodukt Ziegenlipase sensorisch beurteilt. Die Herstellung von Käselaiiben erfolgte insgesamt mit Enzympräparationen aus acht verschiedenen Basidiomyceten, welche mittels unterschiedlicher Verfahren gereinigt und konzentriert wurden. Am erfolgreichsten in Bezug auf die sensorischen Eigenschaften und den Vergleich der freien Fettsäuren war die Umsetzung mittels *P. citrinopileatus* und *F. velutipes* nach Fällung mit Ammoniumsulfat und Konzentrierung mittels Vivaflow200. Alle anderen Kandidaten erwiesen sich als weniger geeignet für den Einsatz im Käse.

4.8.3 Sensorische Beurteilung der hergestellten Testkäse

Der Referenzkäse ohne Lipase wurde über die Dauer der Verkostungen insgesamt als geschmacklich neutral, rein und bis auf die feste, trockene Konsistenz fehlerfrei bewertet. Konsistenz und Textur wurden grundsätzlich bei allen Proben als zu fest und trocken und damit nicht Feta-typisch bewertet. Dies wurde jedoch nicht durch den Einsatz bzw. Nicht-Einsatz der Lipasen verursacht, sondern ist vielmehr auf Fehler im Produktionsablauf (insgesamt zu viel Molkenentzug aus dem Bruch), die dem kleinen Versuchsmaßstab geschuldet sind, zurückzuführen. Bei der Beurteilung des Geschmacks wurden die Fehler in der Textur und Konsistenz vernachlässigt.

Die mit opti-zym z10uc hergestellten Feta-Proben entwickelten den typischen, durch Ziegenlipase erzeugten Geruch und Geschmack, vergleichbar mit dem pikanten Aroma eines Parmesans, wobei der Geruch – besonders der der Lake – grundsätzlich als intensiver als der Geschmack bewertet wurde. Die Piccantase[®]-Proben schnitten grundsätzlich schlechter ab als die mit dem Referenzenzym opti-zym z10uc hergestellten Proben. Zwar entwickelten die mit Piccantase[®] hergestellten Proben ein dezentes, an Ziegenlipase erinnerndes Aroma, allerdings sehr viel weniger intensiv und über die Dauer weniger stabil. Je länger die Lagerung bei 4°C andauerte, desto mehr bildete sich ein fehlerhafter Beigeschmack (leicht bitter/seifig) aus.

Bei den mit Enzympräparationen hergestellten Proben fiel zunächst auf, dass Geruch und Geschmack nicht unbedingt übereinstimmten. Während der Geruch der mit Enzympräparation aus *F. velutipes* hergestellten Feta-Proben sehr neutral bis leicht säuerlich empfunden wurde, wurde der Geschmack durchaus als (leicht) würzig bewertet. Allerdings entwickelten die Proben auch seifige und bittere Geschmackskomponenten.

Die mit Enzympräparation aus *P. citrinopileatus* hergestellten Feta-Proben entwickelten einen ausgeprägten, intensiv würzigen Geruch, der sich mit zunehmender Reifedauer noch verstärkte. Dieser Geruch wurde als intensiv und im Vergleich zu den mit Ziegenlipase hergestellten Proben sehr ähnlich empfunden. Dieser würzig-pikante, mit dem von Ziegenlipase erzeugten Aroma vergleichbare Geruch der Proben spiegelte sich auch im Ergebnis der Fettsäure-Analyse wider. Geschmacklich wurden die Proben aus *P. citrinopileatus* ebenfalls als (leicht) würzig und vergleichbar mit den Ziegenlipase-Proben, allerdings auch als (leicht) bitter und seifig bewertet. Die Intensität der würzigen Aromatik korrelierte nicht mit der Dosage der Lipasen. Die Diskrepanz zwischen Geruch und Geschmack lässt sich dadurch erklären, dass ein potentiell Lipase-Aroma möglicherweise durch den bitteren Fehlgeschmack überdeckt wurde. Bei den späteren Verkostungen wirkte sich die vermutlich mit der Reifung einhergehende Fett- und Proteinspaltung auch auf die Textur des Käses aus. Diese veränderte sich von trocken zu cremig.

4.8.4 Instrumentell-analytische Charakterisierung der hergestellten Testkäse mittels HS-SPME-GC-MS/MS

Begleitend zur sensorischen Beurteilung der hergestellten Testkäse, erfolgt eine umfassende instrumentell-analytische Charakterisierung der durch die Lipasen freigesetzten Fettsäuren. Die erste Messung fanden nach 30 Tagen Reifung des Käses bei 13 °C (Runde 1) statt, anschließend wurden die Proben bei 4 °C gelagert und zusätzlich nach vier (Runde 2), acht (Runde 3) und zwölf (Runde 4) Wochen Lagerung erneut verkostet und mittels Festphasenmikroextraktion (SPME) in Kopplung mit der gaschromatographischen Analyse mit massenspektrometrischer Detektion auf die Anwesenheit von freien Fettsäuren hin untersucht. Bei den detektierten Hauptfettsäuren handelte es sich um Essig- ($C_{2:0}$), Butter- ($C_{4:0}$), Capron- ($C_{6:0}$), Capryl- ($C_{8:0}$) und Caprinsäure ($C_{10:0}$) (Abbildung 4.2).

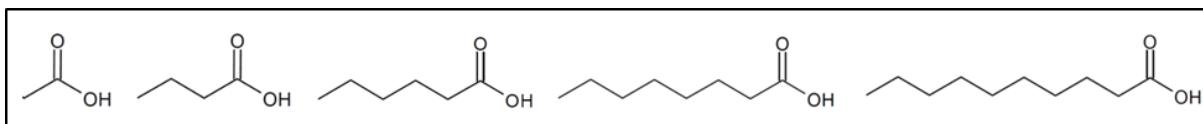


Abbildung 4.2 Strukturen der detektierten Fettsäuren Essig- (C_{2:0}), Butter- (C_{4:0}), Capron- (C_{6:0}), Capryl- (C_{8:0}) und Caprinsäure (C_{10:0}) (von links nach rechts)

Nach der ersten Messung wurden in der Kontrollprobe ohne Lipase sowie in der Probe mit Enzympräparation aus *F. velutipes* sehr geringe Intensitäten der fünf Hauptfettsäuren detektiert. In den Proben mit dem Referenzenzym opti-zym z10uc, Piccantase® und Enzympräparation aus *P. citrinopileatus* waren hingegen deutliche Peaks im Chromatogramm zu erkennen. Die zweite Messung nach zusätzlichen vier Wochen Lagerung bei 4 °C führte bei allen Proben zur Steigerung der Peak-Intensitäten, vor allem bei Käse mit Enzympräparation aus *F. velutipes* wurden deutliche Peaks detektiert. Weitere vier Wochen Lagerung führten bei allen Proben zu konstanten Intensitäten, ähnlich zur zweiten Messung. Ein deutlicher Anstieg der Intensitäten wurde nach der vierten Messung detektiert, auch erkennbar an den Trendlinien der aufgeführten Flächen der fünf Hauptfettsäuren in Abbildung 3.47. Im Referenzkäse, hergestellt mit opti-zym z10uc, wurde Capronsäure anhand der ermittelten Intensität im Chromatogramm als Hauptfettsäure detektiert, gefolgt von Capryl- Butter-, Caprin- und Essigsäure. In den Käseläiben, die mit Enzympräparation aus *F. velutipes* hergestellt wurden, wurde eine ähnliche Verteilung der fünf Fettsäuren erreicht. In den Käseläiben, welche mit Enzympräparation aus *P. citrinopileatus* hergestellt wurden, wurden für die Fettsäuren Capron-, Capryl- und Caprinsäure ähnlich hohe Intensitäten detektiert, im Vergleich dazu waren Butter- und Essigsäure weniger intensiv. Unter Einsatz von Enzympräparationen aus *P. citrinopileatus* wurden im Vergleich zum Referenzenzym opti-zym z10uc die ähnlichsten Ergebnisse generiert.

Akin *et al.*, (2003) untersuchten die unterschiedlichen Gehalte an freien Fettsäuren in eingelegten Käse über den Verlauf der Reifung. Dazu stellten sie Käse mit unterschiedlichen Konzentrationen einer kommerziellen prägastrischen Lipase her und analysierten die Proben nach unterschiedlichen Reifungsperioden. Sie stellten dabei Zusammenhänge zwischen der Lipasekonzentration und der Reifungsdauer für verschiedene Fettsäuregehalte, unter anderem Essig-, Butter- Capron-, Capryl und Caprinsäure fest. Wie schon in der Literatur beschrieben, spielen die Konzentration und die Reifungsdauer eine entscheidende Rolle bei der Ausbildung der verschiedenen Fettsäuren. Sowohl die sensorischen Ergebnisse als auch die Daten der gaschromatographischen Analyse bestätigen diese Aussage. Daher sind in Zukunft weitere Applikationstests mit unterschiedlichen Konzentrationen an mikrobiellen Lipasen im Herstellungsprozess zu testen.

Felice *et al.* (1991) stellten Käse unter Zusatz animalischer Lipasen aus Kitz, Lamm und Kalb und mikrobieller Lipasen aus *Aspergillus niger* und *Mucor miehei* her und untersuchten den Einfluss der verschiedenen Lipasen auf die Bildung freier Fettsäuren während der Käsureifung. Die hergestellten Käseproben wurden nach zehn und 20 Tagen auf den Gehalt an flüchtigen freien Fettsäuren sowie auf die Gesamtkonzentration der freien Fettsäuren hin untersucht. Dabei bevorzugten die animalischen Lipasen aus Kitz und Lamm kurzkettige Fettsäuren, besonders C_{4:0} und C_{6:0}, während die mikrobiellen Lipasen keine Präferenz gegenüber kurz- oder langkettigen Fettsäuren zeigten. Des Weiteren konnte der gewünschte würzige Geschmack unter Zusatz der animalischen Lipasen in kürzerer Zeit erreicht werden als in Käseproben, die ohne den Zusatz von Lipasen hergestellt wurden. Der Einsatz der mikrobiellen Lipasen resultierte in Produkten mit geringeren Gehalten an freien Fettsäuren und mit einem milderem Aroma. Im Vergleich zu den aufgeführten Literaturdaten wurden in Käse der mit Enzympräparation aus *P. citrinopileatus* hergestellt wurde vor allem die Fettsäuren C_{6:0}, C_{8:0} und C_{10:0} freigesetzt. Unter Einsatz der Enzympräparation von *F. velutipes* waren es vor allem die Fettsäuren C_{6:0} und C_{8:0} wie es auch unter Einsatz des Referenzzyms der Fall war. Das Aroma der Käselaibe, die mit Enzympräparationen aus den Basidiomyceten hergestellt wurde, war etwas milder.

Mallatou *et al.* (2003) stellten Teleme-Käse aus Schafs-, Ziegen- und Kuhmilch sowie aus einer Mischung aus Schafs- und Ziegenmilch her und untersuchten die Veränderungen des Profils der freien Fettsäuren während der Reifung über eine Dauer von 180 Tagen. Sie stellten fest, dass der Anteil an kurzkettigen freien Fettsäuren von C_{2:0} bis C_{8:0} in allen hergestellten Käseproben innerhalb von 60 Tagen der Reifung anstieg, während der Anteil an mittelkettigen Fettsäuren von C_{10:0} bis C_{14:0} im selben Zeitraum zurückging. Im Gegensatz dazu blieben die Gehalte an langkettigen Fettsäuren von C_{16:0} bis C_{18:2} über den Verlauf der Reifung konstant. Essigsäure hat einen wichtigen Einfluss auf die Bildung des charakteristischen Aromas, vor allem bei eingelegten Käsesorten wie Feta. Der Gehalt der Essigsäure war dabei in allen Käseproben sehr hoch und machte einen Flächenanteil von 35% bis 77% der gesamten freien Fettsäuren aus. Den größten Flächenanteil am Gesamtgehalt der freien Fettsäuren wurde dabei im Käse aus Kuhmilch festgestellt, während in den anderen Käseproben keine signifikanten Unterschiede erkennbar waren. In allen hergestellten Käselaiben wurde Essigsäure nachgewiesen, die Gehalte lagen zwischen 4% und 11% im Käse, der mit opti-zym z10uc hergestellt wurde. Käse der mit Enzympräparation aus *P. citrinopileatus* hergestellt wurde wies Gehalte von 3% bis 9% auf und Käse mit Enzympräparation von *F. velutipes* Gehalte von 11% bis 42%. Dabei wurden die Flächenanteile im Verlauf der Reifungsdauer immer geringer.

Die Lipolyse während des Reifeprozesses (120 Tage) von traditionellem Feta-Käse wurde von Georgala *et al.* (2005) untersucht. Der Feta-Käse wurde aus einer Mischung aus Schaf- und Ziegenmilch (Verhältnis 4:1), Joghurt als Starterkultur und zum einen mit Lab aus Lamm- und Kitzmägen (Käse A) und zum anderen mit einem Gemisch aus traditionellem und kommerziellem Kälber-Lab (Käse B) hergestellt. Der Vergleich der Fettsäuren in Käse A und B zeigte ähnlich hohe Gehalte an Essigsäure. Der Gehalt an Buttersäure, welche eine wichtige Komponente für das Aroma und den pikanten Geschmack von Feta darstellt, stieg über den Verlauf der Reifung sowohl in Käse A als auch in Käse B kontinuierlich an, wobei der Gehalt in Käse A signifikant höher als in Käse B war. Der Gehalt an Buttersäure schwankte in allen Käseläuben zwischen 7% und 30%, die höchsten Gehalte wurden in Käse, der mit opti-zym z10uc hergestellt wurde, ermittelt. In allen Proben stieg der Gehalt im Laufe der Lagerung an.

4.8.5 Durchführung der instrumentell-analytischen Charakterisierung

Eine instrumentell-analytische Charakterisierung wie z.B. die Analyse von Aromakomponenten mittels Gaschromatographie setzt eine Probenaufarbeitung voraus. Diese kann mittels Extraktion, Konzentration, Fraktionierung oder Isolierung einzelner Analyten erfolgen (Kataoka *et al.*, 2000). Die „*solvent assisted flavor evaporation*“ kurz SAFE wurde von Engel (1999) entwickelt. Diese Methode der Probenaufarbeitung wird zur Isolierung flüchtiger Komponenten aus wässrigen Lebensmittelproben wie Bier, Milch oder Fruchtsäften eingesetzt. Dabei handelt es sich um eine Modifikation der traditionellen Hoch-Vakuum-Technik. Die Festphasenmikroextraktion, besser bekannt als „*solid-phase microextraction*“ (SPME), ist eine lösungsmittelfreie Methode, die in einem Schritt die Extraktion und Konzentration flüchtiger Komponenten aus verschiedenen Matrices an einer Faser vereint (Arthur und Pawliszyn, 1990, Zhang *et al.*, 1994).

Mondello *et al.* (2005) bestimmten flüchtige Aromakomponenten in Ziegenkäse mittels automatischer HS-SPME-GC. Dazu wurde der Käse auf Raumtemperatur gebracht und die Rinde entfernt. Anschließend wurde der Käse mechanisch gerieben und ca. 3 g in ein Headspace-Vial eingewogen. Die Analyse erfolgte im Anschluss voll automatisch. Insgesamt wurden fünf verschiedene SPME-Fasern getestet. Neben den Fasern spielen auch die Parameter Inkubationszeit, Extraktionszeit und –temperatur sowie die Desorptionszeit eine wichtige Rolle. Die unterschiedlichen Beschichtungen der Fasern gehen mit unterschiedlichen Polaritäten einher. An eine Faser aus Divenylbenzen/Carboxen/Polydimethylsiloxan (DVB/Car/PDMS) können aufgrund der drei verschiedenen Beschichtungen

Moleküle unterschiedlicher Flüchtigkeit gebunden werden, weshalb diese Fasern sehr häufig eingesetzt werden. Im Vergleich dazu ist die Faser mit einer Beschichtung aus Carboxen/Polydimethylsiloxan (Car/PDMS) vor allem für niedermolekulare Analyten bis zu C_{8:0} geeignet. Pérez Olivero und Pérez Trujillo (2010) testeten ebenfalls verschiedene Fasern und stellten fest, dass Car/PDMS-Fasern für Analyten mit molekularen Massen <115 Da geeignet sind. Wohingegen Fasern mit einer Beschichtung aus Polydimethylsiloxan und Divenylbenzen für Analyten mit höheren molekularen Massen als 115 Da geeignet sind. In dieser Arbeit wurde zu Anfang mit einer DVB/Car/PDMS-Faser gearbeitet. Als Hauptkomponenten in den Käseproben wurden Essig-, Butter-, Capron-, Capryl und Caprinsäure bestimmt. Aufgrund von Verschleppungen auf der Faser, welche auch durch Ausheizen nach jeder Messung nicht vollständig entfernt werden konnten, wurden weitere Messungen an einer PDMS/DVB-Faser durchgeführt. Diese Faser wurde aufgrund der Hauptfettsäure in den Käseproben, der Capronsäure, ausgewählt, welche mit einer Retentionszeit von ca. 25 min und einer molaren Masse von 116 g mol⁻¹ als weniger flüchtig eingestuft wurde. Trapp *et al.* (2018) verwendeten ebenfalls eine PDMS/DVB-Faser für die Analyse weniger flüchtiger Komponenten. Dufour *et al.* (2001) untersuchten das Aroma von Cheddar mittels HS-SPME-GC-MS-O und testeten ebenfalls unterschiedliche Fasern. Sie stellten fest, dass PDMS/DVB und Car/PDMS die höchste Empfindlichkeit aufwiesen. Pinho *et al.* (2002) bestimmten die flüchtigen freien Hauptfettsäuren in Schafskäse mittels SPME-GC/MS und detektierten Butter-, Capron-, Capryl- und Caprinsäure als Hauptfettsäuren, vergleichbar mit den in dieser Arbeit bestimmten Hauptfettsäuren. Schon 1974 untersuchten Wirotama und Ney (1974) das Aroma von Provolone-Käse und ermittelten ebenfalls Essig-, Butter-, Capron-, Capryl und Caprinsäure als Hauptfettsäuren. Verschiedene Käsesorten darunter Blauschimmelkäse (zwei starke und ein milder), Cheddar (unterschiedlicher Reifep perioden von 12 bis 20 Monaten) und Hartkäse wie Parmesan, Pecorino und Grana Padano wurden mittels SPME-GC/MS-O auf ihre charakteristischen Aromakomponenten hin untersucht. Dabei wurden vor allem in den Blauschimmelsorten sowie in Pecorino-Käse die oben aufgeführten Fettsäuren detektiert. Der Essigsäure wird dabei eine milde bis würzige scharfe Essignote zugeordnet. Buttersäure war eine der Hauptaromakomponenten mit einem charakteristisch würzigen Käsearoma. Der Capronsäure wurde ein milder bis kräftig würziger ziegenähnlicher Geruch zugeordnet (Frank *et al.*, 2004).

Delgado *et al.* (2011) und Bezerra *et al.* (2017) untersuchten verschiedene Arten von Ziegenkäse mittels Festphasenmikroextraktion und ermittelten ebenfalls die oben genannten Fettsäuren. Außerdem untersuchte Delgado *et al.* (2010) auch einen spanischen Weichkäse mittels SPME-GC-MS und detektierte ebenfalls die genannten Fettsäuren.

Der Vergleich der ermittelten Ergebnisse mit denen aus der Literatur zeigt, dass die gleichen Hauptfettsäuren nachgewiesen wurden. Aufgrund von Verschleppungen, welche auf der DVB/Car/PDMS festgestellt werden konnten, wurde die PDMS/DVB-Faser als die geeignetere Faser angesehen. Die Parameter Inkubationszeit, Extraktionszeit und –temperatur sowie die Desorptionszeit spielten bei der Methodenoptimierung ebenfalls eine entscheidende Rolle.

4.9 Toxikologische Beurteilung

Um zytotoxische und mutagene Wirkungen der im Käse eingesetzten Enzympräparationen von *F. velutipes* und *P. citrinopileatus* ausschließen zu können, wurden die Enzympräparationen analog zur Herstellung für den Einsatz im Käsereiprozess hergestellt und aufgearbeitet und im Rahmen eines Unterauftrags an Prof. Dr. Dr. Dieter Schrenk an der TU Kaiserslautern weitergeleitet. Dort wurden die Enzympräparationen mittels Resazurin-Test auf Zytotoxizität und mittels Ames-Test auf Mutagenität hin überprüft.

Zur Prüfung der Enzympräparate auf zytotoxische Eigenschaften wurden primäre Rattenhepatozyten in Kultur als Testsystem verwendet. Die Proben wurden 24, 48 und 72 h inkubiert und anschließend die Vitalität der Zellen überprüft. Im Anschluss wurden die Zellen 90 min mit Resazurin inkubiert und die entstandene Menge Resorufin mittels Fluoreszenzmessung detektiert (O'Brien *et al.*, 2000).

Bei Resazurin handelt es sich um einen blauen, wasserlöslichen Redox-Farbstoff, der in einer zweistufigen Reaktion reduziert werden kann. Die erste irreversible Reduktion führt zum rosafarbenen und fluoreszierenden Resorufin. Im zweiten, reversiblen Schritt wird das Resorufin zum farblosen nicht fluoreszierenden Dihydroresorufin reduziert (Twigg, 1945).

Resazurin wurde schon Mitte des 20. Jahrhunderts als chemischer Indikator in der Milchindustrie eingesetzt, um mikrobielle Kontaminationen in Milch zu überprüfen (Erb und Ehlers, 1950).

Der Vergleich aller Proben mit der Medienkontrolle nach 24 h und 48 h erbrachte in der ANOVA-Analyse zum Vergleich der Mittelwerte, verbunden mit dem Dunnett-Posttest keine signifikanten Unterschiede. Für die Proben PCI, PCI (*heated*) und FVE-D zeigten sich nach 48 h geringfügige, signifikante Unterschiede ($p < 0,01$) bei den Konzentrationen 5 Vol% und 10 Vol%. In der Probe FVE-D (*heated*) ergab sich bei einer Konzentration von 10 Vol% ein schwacher, signifikanter Unterschied ($p < 0,01$) im Vergleich zur Medienkontrolle.

Bei Betrachtung der Ergebnisse kann die biologische Relevanz als sehr gering eingestuft werden, da zwar signifikante Unterschiede zur Medienkontrolle in der Vitalität nachgewiesen wurden, diese aber immer höher als 80% der Kontrolle ausgefallen sind. Außerdem wurde keine deutliche Abnahme bei höheren Konzentrationen beobachtet. Die Positivkontrolle mit Triton-X100 zeigt hingegen eine signifikant ($p < 0,01$) reduzierte Vitalität.

Zur Ermittlung der Mutagenität wurde ein sehr sensibler und einfacher Test mit Bakterien entwickelt (Ames, 1971, Ames *et al.*, 1973b, Ames *et al.*, 1973a, McCann *et al.*, 1975, Ames *et al.*, 1975). Dazu werden die Verbindungen mit speziell konstruierten Mutanten von *Salmonella Typhimurium* (Ames *et al.*, 1973b, Ames *et al.*, 1973a, McCann *et al.*, 1975, Ames *et al.*, 1975) mit einer Histidin-Auxotrophie auf Petrischalen getestet. Durch die Zugabe von Homogenaten aus Rattenleber (S9-Mix) direkt auf die Petrischale wurde ein wichtiger Aspekt für den Metabolismus von Säugetieren mit einbezogen, um Chemikalien, die humankarzinogen oder mutagen wirken im *in vitro* Test nachweisen zu können. Auf diese Weise können eine Vielzahl von Karzinogenen, die eine metabolische Aktivierung benötigen, als mutagen nachgewiesen werden (Ames *et al.*, 1973a, Ames *et al.*, 1975, McCann *et al.*, 1975, McCann und Ames, 1976)

Es wurden zwei Stämme von *S. Typhimurium* verwendet, TA 98 für Leserasterverschiebungen und TA 100 für Basenpaarsubstitutionen (McCann *et al.*, 1975). Die Tests wurden sowohl mit als auch ohne S9-Mix aus Rattenleber durchgeführt. Der S9-Mix zur metabolischen Aktivierung der Testsubstanzen wurde aus mit Aroclor 1254 induzierten Rattenlebern hergestellt.

In keinem der mit *S. Typhimurium* TA 98 und TA 100 durchgeführten Tests zeigte sich eine Mutagenität der untersuchten Kulturüberstände, die über die der Negativkontrollen signifikant hinausging.

Die Überstände sind als nicht relevant zytotoxisch und als nicht mutagen zu bewerten. Daher sind die aufgearbeiteten Kulturüberstände der Basidiomyceten *F. velutipes* und *P. citrinopileatus* für den Einsatz in Lebensmitteln, speziell für den Käseprozess, geeignet.

4.10 Molekularbiologische Charakterisierung

4.10.1 Identifizierung der Zielenzyme aus *F. velutipes* und *P. citrinopileatus*

Zur molekularen Charakterisierung der Zielenzyme wurden diese nach der zweiten Reinigungsstufe der FPLC auf SDS-PAGE-Gele aufgetragen und die entsprechenden Banden ausgeschnitten und aufgearbeitet (Shevchenko *et al.*, 2006, Gundry *et al.*, 2009). Die Proben wurden nach tryptischem Verdau mittels HPLC-ESI-MS/MS sequenziert (durchgeführt von Frau Pegah Khomehghir-Silz aus dem Institut für Anorganische und Analytische Chemie der JLU Gießen). Aufgrund der hohen Verluste durch die Reinigung aus dem Gel wurden die Fraktionen nach 2.9.4 konzentriert, entsalzt und direkt zum tryptischen Verdau eingesetzt und sequenziert.

Mittels Sequenzierung der Fraktionen aus *F. velutipes* durch HPLC-ESI-MS/MS wurden in zwei Fraktionen überwiegend die gleichen Peptidfragmente identifiziert. Die gefundenen Peptidfragmente (Tabelle 3.13) zeigten beim Datenbankvergleich hohe Homologien zu einer *putative carotenoid ester lipase* aus *Flammulina velutipes* (UniProt Zugriffsnummer G8A515). Anhand der erhaltenen Peptiddaten wurden degenerierte PCR-Primer abgeleitet, um die für das Zielenzym codierende cDNA mittels PCR amplifizieren zu können. Dazu wurden an Tagen maximaler spezifischer Enzymaktivität im Kulturüberstand Myzel entnommen und zur RNA-Isolierung unter flüssigem Stickstoff im Mörser aufgeschlossen. Die isolierte Gesamt-RNA wurde im Anschluss mittels reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Bei der Ableitung von Primern wurde darauf geachtet, dass der G/C-Gehalt zwischen 40% und 60% lag und die Schmelztemperatur der Primerpaare maximal 2 °C auseinander lagen. Die berechnete molekulare Masse des Zielenzym lag bei 78,2 kDa, die cDNA-Sequenz der *putative carotenoid ester lipase* aus *F. velutipes* hat eine Größe von 2178 Basenpaaren, welche für ein Protein aus 725 Aminosäuren codiert. Nachdem auch nach Optimierungsversuchen der PCR-Methode und Einsatz verschiedener Primer kein Sequenzierergebnis erhalten wurde, das der codierenden cDNA aus *F. velutipes* zugeordnet werden konnte, wurde auf die genomische DNA zurückgegriffen. In mehreren Schritten gelang es mit insgesamt neun Primern, die komplette Sequenz der genomischen DNA zu identifizieren. Die Größe des Enzyms war mit 4305 Basenpaaren sehr viel größer als erwartet und ergab nach Herausschneiden der insgesamt 17 Introns, gemäß der GT-AG-Regel (Padgett *et al.*, 1984) und Zusammenfügen der Exons, mit dem Programm Geneious 9.1.8, die codierende DNA-Sequenz. Diese Sequenz wurde in die entsprechende Aminosäuresequenz umgeschrieben und mit der Aminosäuresequenz der *putative*

carotenoid ester lipase (UniProt Zugriffsnummer G8A515) aus *F. velutipes* verglichen (Abbildung 3.69). Die Übereinstimmung der Sequenz betrug 96,7%. In der Regel beläuft sich die Länge der Introns bei den meisten Pilzen auf eine Größe von ca. 60 Basenpaaren, in diesem Fall waren die Introns allerdings bis zu 466 Basenpaare lang (Gurr *et al.*, 1987).

In gleicher Weise wurde mit der Aufklärung der Proteinstruktur des Zielenzym aus *P. citrinopileatus* verfahren. Die entscheidende Fraktion wurde in diesem Fall von Dr. Andrzej Majcherczyk (Georg-August-Universität Göttingen, Büsgen-Institut, Abteilung Molekulare Holzbiotechnologie und technische Mykologie) nach tryptischem Verdau mittels HPLC-ESI-MS/MS sequenziert. Da von *P. citrinopileatus* noch keine Genomdaten vorliegen, wurden die Daten von *Pleurotus ostreatus*, dessen Genom vollständig sequenziert ist, herangezogen. Insgesamt wurden 13 Peptidfragmente (Tabelle 3.14) identifiziert und zeigten beim Datenbankvergleich hohe Homologien zu einer Carboxylesterase aus *Pleurotus ostreatus* (UniProt Zugriffsnummer A0A067NQQW6). Die berechnete molekulare Masse des Zielenzym beträgt 59,2 kDa, die cDNA-Sequenz der Carboxylesterase aus *Pleurotus ostreatus* hat eine Länge von 1641 Basenpaaren, die für ein Protein aus 546 Aminosäuren codiert. Anhand dieser Daten wurden Primer abgeleitet und zur PCR eingesetzt, um die für das Zielenzym codierende cDNA amplifizieren zu können. Keins der erhaltenen Sequenziererergebnisse konnte der cDNA-Sequenz der Carboxylesterase aus *Pleurotus ostreatus* zugeordnet werden, weshalb auch hier auf die genomische DNA zurückgegriffen wurde. Die genomische Sequenz hat eine Länge von 2409 Basenpaaren mit insgesamt 14 Introns, die zwischen 50 und 64 Basenpaaren lang sind. Die Introns fingen mit den Basen GT an und endeten auf AG, wie es auch schon beim Enzym aus *F. velutipes* der Fall war. Es wurden erneut Primer entworfen, welche in Abbildung 3.72 unterstrichen dargestellt sind. Die erhaltenen Amplifikate auf entsprechender Höhe wurden aus den Gelen ausgeschnitten, aufgearbeitet und sequenziert, allerdings konnte lediglich ein Sequenzier-Ergebnis einem uncharakterisierten Enzym aus *P. ostreatus* zugeordnet werden. Eine Aufklärung der Sequenz des Zielenzym aus *P. citrinopileatus* blieb auch unter Einsatz verschiedener Polymerasen sowie verschiedene Primer ohne Erfolg. Eine Transformation des Amplifikats in *E. coli*, um größere Mengen zur Sequenzierung generieren zu können, war ebenfalls erfolglos.

4.10.2 Sequenz- und modellorientierte Analyse des Zielenzym aus

F. velutipes

In der Enzym-Klasse der Hydrolasen sind vor allem die Lipasen (EC 3.1.1.3, Triacylglycerol Hydrolasen) und die wahren Esterasen (EC 3.1.1.1, Carboxylester Hydrolasen) von Bedeutung, denn die dreidimensionale Struktur beider Enzyme zeigt ein charakteristisches Faltungsmuster, das sogenannte α/β -Hydrolase-Faltungsmuster, eine festgelegte Anordnung von insgesamt sechs α -Helices und acht β -Faltblattstrukturen. Die β -Faltblattstrukturen sind dabei bis auf eine parallel angeordnet (Ollis *et al.*, 1992). Das aktive Zentrum von α/β -Hydrolasen besteht aus einer katalytischen Triade, diese setzt sich aus den Aminosäuren Serin, Asparaginsäure und Histidin (Glutaminsäure statt Asparaginsäure für manche Lipasen) zusammen. Zudem befindet sich üblicherweise um das Serin im aktiven Zentrum eine übereinstimmende Pentapeptidsequenz bestehend aus Gly- X_1 -Ser- X_2 -Gly. Dabei entspricht X_1 entweder Tyrosin oder Histidin, X_2 entweder Glutamin oder Asparaginsäure (Brady *et al.*, 1990, Schrag *et al.*, 1991, Ollis *et al.*, 1992, Bornscheuer, 2002, Rajendran *et al.*, 2009, Muralidharan *et al.*, 2013).

Das Zielenzym aus *F. velutipes* kann aufgrund des konservierten Bereiches der Aminosäuren 17 bis 27 (EDCLTINVVKP) dem Typ 2 der Carboxylesterasen zugeordnet werden. Somit kann das Enzym der Superfamilie der α/β -Hydrolasen zugeordnet werden.

Ein Homologiemodell der Proteinstruktur wurde (Abbildung 4.3) mit dem Programm SWISS-Model angefertigt. Die Sequenz-Übereinstimmung des Modells mit der höchsten Homologie lag bei 42,3%. Dabei handelte es sich um eine Lipase 2 aus *Candida rugosa* (PDB 1gz7.1.A). Die Übereinstimmung der Sequenzen erstreckte sich von Aminosäure zwölf bis 431. Ab Aminosäure 432 konnte keine Übereinstimmung festgestellt werden.

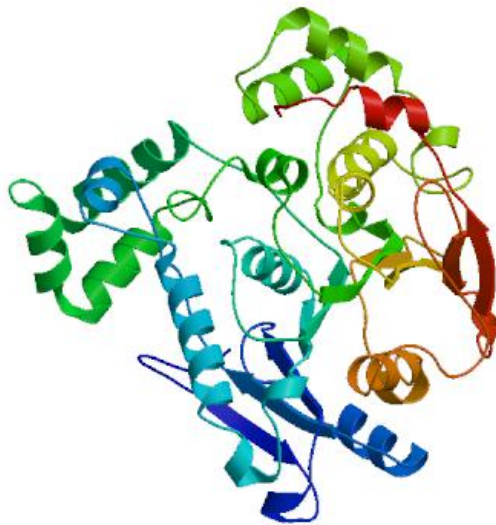


Abbildung 4.3 3D-Proteinstrukturmodell einer Lipase 2 aus *Candida rugosa* (1gz7.1.A), erstellt mittels SWISS-MODEL Homology Modelling Report

Der Vergleich der Aminosäuresequenz aus dem Basidiomyceten *F. velutipes* mit anderen Lipasen/Esterasen aus Basidiomyceten zeigte Homologien zu Carboxylesterasen aus *Cylindrobasidium torrendii* (58,3%; UniProt Zugriffsnummer A0A0D7BQ11), *Heterobasidion irregulare* (57%; UniProt Zugriffsnummer W4JZ43), *Moniliophthora roreri* (57,4%, UniProt Zugriffsnummer A0A0W0FQU9) und *Lentinula edodes* (57,1%; UniProt Zugriffsnummer A0A1Q3EP41). In Abbildung 4.4 sind die Sequenzen der verschiedenen Carboxylesterasen aus den verschiedenen Organismen zum Vergleich untereinander aufgeführt. Dabei sind konservierte Bereiche grau hinterlegt und hochkonservierte Aminosäuren mit einem * gekennzeichnet dargestellt. Beim Vergleich der Sequenzen fällt auf, dass die Sequenz aus *F. velutipes*, mit insgesamt 725 Aminosäuren im Gegensatz zu 557 Aminosäuren für die Carboxylesterase aus *L. edodes*, wesentlich länger ist. Für die Sequenz konnte daher ab der Aminosäure 434 keine Übereinstimmung mit den anderen Sequenzen festgestellt werden. Vergleichbar mit dem Ergebnis zur Erstellung eines Homologiemodells, dabei konnte ab Aminosäure 432 ebenfalls keine Übereinstimmung der Sequenzen festgestellt werden. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass das Gen früher endet.

F_velutipes	1	-----	0
C_torrendii	1	-----MLFRLVLP-FLQVGTAAAVISGRAAGPTVTLDDGGSVVGTRTGAV	43
H_irregulare	1	-----MSRFLRTAAVLLALEAGL-TVAAPTARATGPTVKLDNGTFVGTTSGSV	47
M_roreri	1	-----MHLAIWVVALYA---TLAAAAPLAAPTVQLDSATVIGSTVLRV	40
L_edodes	1	MSSSLAFQAPRGFTAMLSEIIA-LVLQ---ACVFASPLAGPTVTLDSAVVTGVTSGNT	55
F_velutipes	1	-----MTR	3
C_torrendii	44	DKFLGIPFGKAPVGDRLRNLPEAVDAYSGETIDATSYGSPCPQQALKPLLDGLPAETVEH	103
H_irregulare	48	SKFLGIPPAQSPTGDLRFRLPKTIIDPYTGTQTVSAFGPACPCQQEITLPIINNALAQDAIDF	107
M_roreri	41	SKFLGIPPAQPPTGNRRFRLEPEIPTYGTSSSALSMPGACPCQQAVKLPILQGLPADAVNF	100
L_edodes	56	QEFLGIPPAQPPTGPLRNLPPQVPSYNASFSATAMGPACPCQQTIDLPILTGLAAETIDF	115
F_velutipes	4	APLPHLSHHGTSDEDCLTINVVKPSANSTSNLEPVVAVIFGGGFELGGTSMYDCASTVAR	60
C_torrendii	104	ILNSIFNAVLSDEDCLTINVVKPSANSTSNLEPVVAVIFGGGFELGGTSMYDCASTVAR	163
H_irregulare	108	IVNELYSVVSSEDEDCLTINVVKPSATASAKLEPVVWIFGGGFELGGTSMYDCASTVAR	167
M_roreri	101	IVNSIYAAVFEDEDCLTINVVKPSATSDSKLEPVVWIFGGGFELGGTSMYDCASTVAR	160
L_edodes	116	IVNSIYGFVFEDEDCLTINVIKPSATSSKLEPVVWIFGGGFELGGTSMYDCASTVAR	175
F_velutipes	61	STELQEPVIYVSFNVRNNGFGFLASKEVKEAGVGNLGLQDQRLALKWIQKYVGAFGGDP	120
C_torrendii	164	SIAMGKPIIYVSMAYRVSAGFLASQEVKDGAGVGNLGLQDQRLALKWIQKYVGAFGGDKS	223
H_irregulare	168	SIDLGEFVYVSMNRVSAFGFLASEEVKNAGIGNLGLQDQREALRWIKQYVGAFGGDE	227
M_roreri	161	SIQLGQFVIYVSMNRVTFGFLASKEVKEAGVGNLGLQDQREALRWIKQYVGAFGGDP	220
L_edodes	176	STELDEPVIYVSMNRVTFGFLSSQEVKDGAGVGNLGLQDQREAFRWIKQYVGAFGGDP	235
F_velutipes	121	KVTIWGESAGAEVYVHMVSNNGNTEGLYRAAFQSGSVGSYEGLENGODAYGIVNKTG	180
C_torrendii	224	KVTIWGESAGAIISVALHMSNCGDTEGLFRAGFMOSGSPIPVGDITGGQKYVDIADKFG	283
H_irregulare	228	KVTIWGESAGAIISVALHMITNCGDTEGLFRAGFMOSGSPIPVGDITSGQKYVDIADKFG	287
M_roreri	221	KVTIWGESAGAIISVSLQMLANGDTEGLFRAGFMOSGSPIPVGDITNGQKYVDIADKFG	280
L_edodes	236	KVTIWGESAGAIISASLHMVSNNGNTEGLFRAGFMOSGSPIPVGDITDQAYYDITVEATG	295
F_velutipes	181	CSNASDTLACLRTADFDTLKAAIDEE-----FVWTFRFDGALFSLDQNLILQK	231
C_torrendii	284	CSGAADSLQCLREVDYNTLKAAVDSDPFIPDYQSLLLAWLFRADGVLFSNDRQRLVQCGK	343
H_irregulare	288	CSGTADTLQCLRAAPYGLTKSAVDKSPMIFAYQSLNLAWLFRVGDSTFLITDFEVLVQCGS	347
M_roreri	281	CSGSVDTLQCLREVPYTSKAAIINNSPDIFAYQSLNLAWLFRADGKFLADAPQKLVQCGK	340
L_edodes	296	CSSESDTLDCLRGVDTYTLKAAVDASPGIFAYQSLNLAWLFRADGVFLITDQKLVQCGQ	355
F_velutipes	232	VADVPLITGNCDEGTLFSLASLNVTTQSDIATVYQTIPLFNISDSDLAELLETVPADIT	290
C_torrendii	344	IAHIPVSGDCCDEGTLFSLAQLNVTTNEAVRKYIQEIFLPKVPDADIDALLKLFQDIT	403
H_irregulare	348	VANIPFITGDCDDDEGTLFSLSNVTNVTDDADVVDYISSIYLTASSADVDHLLDLVTDIT	407
M_roreri	341	VAKIPVSGDCCDEGTLFSLSTLNVTTAEQVKEVVKTEFVSTIPDADLDRLKLFQDII	400
L_edodes	356	VSAIPVSGDCCDEGTLFSLASLNVTTQSDIATVYQTIPLFNISDSDLAELLETVPADIT	415
F_velutipes	291	QGSPEDTGSDNAITPQYKRSAAALLGDLDFQTSRRYLINELSGKQDIYTYIHNQRRLPVL	350
C_torrendii	404	QGSPEDTGIFNAITPQPKRIASFQGDVAFQAPRRYFEDALSGKSDIWAFAKRLKGLLEV	463
H_irregulare	408	KGSPYSTGILNATIPQFKRLAALQGDVVFQAPRRFFLKNRADKQNAWSFLSKRLKLEVL	467
M_roreri	401	QGSPEYNTGIFNAITPQPKRFASFQGDVAFQAPRRFFLESLSGKQPIWSEFLSKRLKALPIL	460
L_edodes	416	EGSPEDTGILNATIPFKRIAAFQGDVAFQAPRRFFLQSLSGKQPIWSEFINKRLKLDLVL	475
F_velutipes	351	GSFHASDLNVVYSGSDMADYLIRFVATLDBNGNTGISWEKWTSEANMMLAFSDDEAVPLS	410
C_torrendii	464	GSFHASDILNVYGGDLADYLIRFVAVLDBTGGNASSWEKWTSSSENMMLSLND---IGKS	520
H_irregulare	468	GSVHASDLLNVYSGDMVDYLVRFAATLDBNGNTGINWVQYTTASEQLLTFOD-GLIPLT	526
M_roreri	461	GSVHASDLLNVYSGGLADYLIRFAATLDBNGNTGINWVQYTTASEQLLTFOD-GLIPLT	519
L_edodes	476	GSAGCTDILNVYSGSDMADYLIRFAATLDBNGNTGIEWVQYTTGSENMMLQFND-GLIPLT	534
F_velutipes	411	LTEDTYRKEAMASGMTQSCYIYVWRQRIKALLEAYVYGRYPDRSSEKVTATRTGNTVSI	470
C_torrendii	521	VIQDITYRKEAMAKLNEVLLTYPV-----	543
H_irregulare	527	ITQDITYRQAGMEFLMQLSLVNPL-----	549
M_roreri	520	ITQDITYRKEAMQALTEIMLVNVP-----	542
L_edodes	535	LSLDNYRESAMSFTTQLLITNVP-----	557

F_velutipes	471	TVTAKGKTGRFSATLALPSGASNDKPFVPAVIVIGFADSTFLNNGIAQATFDANSVAADST	530
C_torrendii	544	-----	543
H_irregulare	550	-----	549
M_roreri	543	-----	542
L_edodes	558	-----	557
F_velutipes	531	SKTGAFRNIIYSEDAGSLLAAGWGSHRVLDLELVAPEIDSTRVGMGCSRYGKALAAI	590
C_torrendii	544	-----	543
H_irregulare	550	-----	549
M_roreri	543	-----	542
L_edodes	558	-----	557
F_velutipes	591	FDDRLVETKGLAPWSRFLFLGGQKRACKTISPRIIVFPWMTSSPLLLPRAPQFGIKMNP	650
C_torrendii	544	-----	543
H_irregulare	550	-----	549
M_roreri	543	-----	542
L_edodes	558	-----	557
F_velutipes	651	GVAGVTFPATQAVYKFLGAEANIGVALRNSGHCDFSGTTNVLDFVKSVLLGSQRTRNYTT	710
C_torrendii	544	-----	543
H_irregulare	550	-----	549
M_roreri	543	-----	542
L_edodes	558	-----	557
F_velutipes	711	ISPYQAHPEAYFWAI	725
C_torrendii	544	-----	543
H_irregulare	550	-----	549
M_roreri	543	-----	542
L_edodes	558	-----	557

Abbildung 4.4 Vergleich der Aminosäuresequenzen von verschiedenen Carboxylesterasen aus Basidiomyceten mit dem Zielenzym aus *F. velutipes*. *Cylindrobasidium torrendii* (58,3%; UniProt Zugriffsnummer A0A0D7BQI1), *Heterobasidion irregulare* (57%; UniProt Zugriffsnummer W4JZ43), *Moniliophthora roreri* (57,4%, UniProt Zugriffsnummer A0A0W0FQU9) und *Lentinula edodes* (57,1%; UniProt Zugriffsnummer A0A1Q3EP41). Grau hinterlegt: konservierte Bereiche, * hoch konservierte Aminosäuren

4.10.3 Ermittlung einer Signalsequenz für das Zielenzym aus *F. velutipes*

Signalsequenzen steuern sowohl in eukaryotischen als auch in prokaryotischen Zellen den Eintritt von nahezu allen Proteinen in den Sekretionsweg (Gierasch, 1989, Heijne, 1990, Rapoport, 1992). Sie sind an den N-Terminus der Aminosäuresequenz gebunden und werden nach dem Durchtritt des Proteins durch die Membran abgespalten. Die Struktur der Signalsequenzen der meisten Proteine setzt sich häufig aus einem hydrophoben Kern (h-Region mit sieben bis 15 Resten), welcher durch positiv geladene Aminosäuren am N-Terminus (n-Region mit ein bis fünf Resten) und neutralen aber polaren Aminosäuren am C-Terminus (c-Region mit drei bis sieben Resten) flankiert wird, zusammen. Die Schnittstelle zwischen der Signalsequenz und dem eigentlichen Protein wird durch kleine und neutrale Aminosäurereste in den Positionen -3 und -1 der polaren Region des C-Terminus in der Signalsequenz definiert (Gunnar, 1983, Heijne, 1985, Heijne, 1990).

Das Zielenzym aus *F. velutipes* wurde aus dem Kulturüberstand gewonnen, daher handelte es sich um ein sekretiertes Enzym, welches über eine Signalsequenz verfügen sollte. Das Programm SignalP 4.1 (Petersen *et al.*, 2011) dient zur Ermittlung von Schnittstellen von Signalsequenzen. Dazu wurde die Aminosäuresequenz des Zielenzym aus *F. velutipes* in das Programm eingefügt. Die Berechnung ergab jedoch keine Schnittstellen. Im Vergleich

dazu verfügen die in Abbildung 4.4 aufgeführten Sequenzen alle über eine Signalsequenz, die bis zu 32 Aminosäuren umfasst. Das verwendete Programm ermittelt Signalsequenzen, die sich am N-Terminus der Aminosäuresequenz befinden, möglicherweise befindet sich die Signalsequenz des Zielenzym am C-Terminus. Des Weiteren könnte die entsprechende Signalpeptidase, die die Signalsequenz nach Membrandurchtritt abspaltet ein anderes Muster zum Schneiden aufweisen, welches nicht bekannt ist. Wenn sich die Schnittstelle woanders befindet und somit mehr als 30 Aminosäuren abgespalten werden, könnte das eine mögliche Erklärung für die ermittelte molekulare Masse von etwa 71 kDa statt der theoretischen molekularen Masse von 78,2 kDa sein. Die Ermittlung von Signalsequenzen mittels SignalP 4.1 scheint für Enzyme aus Basidiomyceten nur bedingt geeignet zu sein. Da sowohl für eine Arylalkoholoxidase als auch für eine Dyp-Typ Peroxidase aus *Pleurotus sapidus* abweichende Schnittstellen im Vergleich zu verwandten Enzymen aus anderen Basidiomyceten berechnet wurden (Lauber 2015).

4.10.4 Ermittlung des Glykosylierungsgrades des Zielenzym aus *F. velutipes*

Bei einer Glykosylierung werden bei der eukaryotischen Expression sekretierter Proteine an verschiedene Aminosäuren Zuckerreste gebunden. Vor allem extrazelluläre Proteine liegen häufig glykosyliert vor. Dabei kann zwischen N- und O-Glykosylierungsstellen unterschieden werden. Die Glykosylierung dient als Schutz vor protolytischem Verdau sowie der Stabilität und Löslichkeit von Proteinen, was mit höheren molekularen Massen einhergeht (Romdhan *et al.*, 2012, Lis und Sharon, 1993).

Da es sich bei dem Zielenzym aus *F. velutipes* um ein sekretiertes Enzym handelt, wurde die aus der cDNA abgeleitete Aminosäuresequenz mit Hilfe der Programme NetNGly 1.0 (Gupta *et al.*, 2004b) und NetOGly 4.0 (Steentoft *et al.*, 2013) auf potentielle N- und O-Glykosylierungsstellen überprüft. Dabei wurden insgesamt fünf potentielle N-Glykosylierungsstellen gefunden, von denen zwei mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit glykosyliert vorliegen. Insgesamt wurden 19 potentielle O-Glykosylierungsstellen ermittelt. Dabei ist zu beachten, dass aufgrund einer fehlenden Signalsequenz eine Glykosylierung (*in vivo*) unwahrscheinlich ist, auch wenn die entsprechenden Motive dafür in der Sequenz enthalten sind. Die ermittelte molekulare Masse von 71 kDa, statt der berechneten molekularen Masse von 78,8 kDa, spricht ebenfalls gegen eine Glykosylierung. Im Vergleich dazu weist die Carboxylesterase aus *Cylindrobasidium torrendii* (UniProt Zugriffsnummer A0A0D7BQ11) zwei potentielle N-Glykosylierungs- und vier potentielle O-Glykosylierungsstellen auf. Die Carboxylesterase aus *Heterobasidion irregulare* (UniProt Zugriffsnummer

W4JZ43) weist ebenfalls zwei potentielle N-Glykosylierungs- und neun potentielle O-Glykosylierungsstellen auf. Bei *Moniliophthora roreri* (UniProt Zugriffsnummer A0A0W0FQU9) sind es eine potentielle N-Glykosylierungs- und neun potentielle O-Glykosylierungsstellen und bei *Lentinula edodes* (UniProt Zugriffsnummer A0A1Q3EP41) entsprechend zwei und acht potentielle N- bzw. O-Glykosylierungsstellen.

Des Weiteren kann eine Glykosylierung den isoelektrischen Punkt eines Enzyms beeinflussen. Der experimentell ermittelte *pI* des Zielenzym lag zwischen 3,5 und 4,3 und weicht stark von dem aus der Sequenz berechneten *pI* (5,4) ab. Die Bindung von Zuckerresten an geladene Aminosäuren an der Proteinoberfläche können aufgrund ihrer Größe Ladungen abschirmen und somit den isoelektrischen Punkt beeinflussen (Shaw *et al.*, 2001).

In Abbildung 4.5 ist die Aminosäuresequenz des Zielenzym aus *F. velutipes* dargestellt. Hervorgehoben sind Reste mit potentiellen Funktionen sowie potentielle N- und O-Glykosylierungsstellen.

MTRAPLPHLS	HHGPTSEDCL	TINVVKPANV	EEGAQLPVVA	VSSFVGGTS	EYNGTSIVSR	60
SLELQEPVIY	VSFNYRLNGF	GFLASKEVKE	AGVGNLGLQD	QRLALKWIQK	YVGAFFGGDPT	120
KVTIWGESAG	AEAVVYHMVS	NDGNTEGLYR	AAFAQSGSVG	SYGGLENGQD	AYDGIVNKTG	180
CSNASDTLAC	LRTADFDLTK	AAIDEAEFVW	TPRFDGALFS	DLPQNLILQG	KVADVPLITG	240
NCGDEGTLYS	ISYNISTDAE	FKTFLQTRWL	PTASDAEIDR	LLALYPSDPS	QGSPFDTGSD	300
NAITPQYKRS	AALLGDLLFQ	TSRRYLINEL	SGKQDIYTYI	HNRQRRLPVL	GSFHASDLVN	360
VYGSMDMADY	LIRFVATLDP	NGNTGISWPK	WTSEAPNMLA	FSDDEAVPLS	LTEDTYRKEA	420
MAASGMTQSC	YIYVWQRQIK	ALLEAYVYGR	YPDRSSEKVT	ATRTGNTVSI	TVTAKGKTGR	480
FSATLALPSG	ASNDKPVPVAV	IVIGFADSTF	LNNGIAQATF	DANSVAADST	SKTGAFRNIY	540
SEDAGSLLAW	GWGSHRVLDA	LELVAPEIDS	TRVGMGCSR	YGKGALAAGI	FDDRLVETKG	600
LAPWSRFLFG	GQKRACKTIS	PMRIVFPWMP	TSSPLLLPRA	PQFGIKMNPE	GVAGVTFPAT	660
QAVYKFLGAE	ANIGVALRNS	GHCDPSGTTN	VLDFVKSPLL	GSQRTRNYTT	ISPYQAHPEA	720
YPWAI						725

Abbildung 4.5 Aminosäuresequenz des Zielenzym aus *F. velutipes*. Hervorgehoben sind Reste mit potentiellen Funktionen sowie N- und O-Glykosylierungsstellen. grün: potentiell an der Katalyse beteiligte Aminosäuren; flieder: konserviertes G-X-S-X-G-Motiv; rot: potentielle N-Glykosylierungsstellen; orange: potentielle O-Glykosylierungsstellen

Das katalytische Zentrum des Zielenzym aus *F. velutipes* befindet sich relativ weit vorne in der Sequenz. Das an der katalytischen Triade beteiligte Histidin befindet sich wahrscheinlich an Position 345 der Aminosäuresequenz. Dies bedeutet, dass den Aminosäuren ab Position 360, entsprechend etwa der Hälfte der Sequenz, keine Funktionen am Katalysemechanismus des Enzyms zugeordnet werden können. Die meisten potentiellen O-Glykosylierungsstellen befinden sich ebenfalls in der zweiten Hälfte der Sequenz, welche vorausgesetzt, dass sie glykosyliert sind, zu einer wesentlich höheren molekularen Masse

des nativen Enzyms führen müssten. Da die ermittelte molekulare Masse aber ca. 8 kDa unter der berechneten molekularen Masse lag, ist eine Glykosylierung unwahrscheinlich. Möglicherweise befindet sich die Signalsequenz in diesem Bereich der Sequenz wodurch der Unterschied der molekularen Masse erklärt werden könnte.

In Abbildung 4.6 ist der Reaktionsmechanismus einer lipasekatalysierten Hydrolyse von Estern aufgeführt und verdeutlicht das Zusammenspiel der katalytischen Triade aus Serin, Asparaginsäure und Histidin bei der Umsetzung eines Substrates.

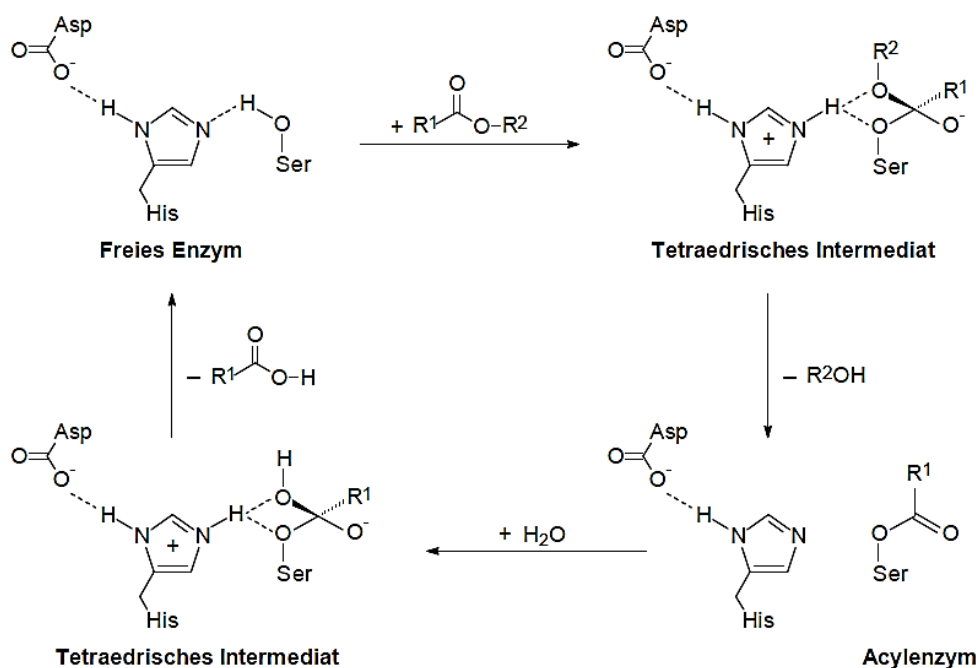


Abbildung 4.6 Reaktionsmechanismus einer lipasekatalysierten Hydrolyse (Borgdorf, 2005, modifiziert nach Kazlauskas, 1994, Schmid und Verger, 1998)

Dieser Reaktionsmechanismus erfolgt in zwei Schritten und ist mit dem Mechanismus der Serin-Proteasen vergleichbar (Dodson und Wlodawer, 1998, Nardini und Dijkstra, 1999, Jaeger *et al.*, 1999). Im ersten Schritt, einer Acylierung, wird nach der Bindung des Substrates an das katalytische Zentrum des freien Enzyms ein Proton von der Hydroxygruppe des katalytischen Serins auf die Imidazolseitenkette des katalytischen Histidins übertragen. Die saure Aminosäure der katalytischen Triade interagiert während des Protonentransfers mit der Imidazolseitenkette und beeinflusst so die richtige Ausrichtung des Histidins. Durch den Protonentransfer wird außerdem die Nukleophilie der Serinseitenkette gesteigert, wodurch ein nukleophiler Angriff des Serins auf das Carbonyl-Kohlenstoffatom des Substrates ermöglicht wird. Es wird ein tetraedrisches Intermediat gebildet, dabei wird

eine negative Ladung auf das Carbonyl-Sauerstoffatom übertragen und durch Wasserstoff-Brückenbindungen zu den NH-Gruppen das sogenannte „*oxyanion hole*“ stabilisiert. Durch den Protontransfer vom Histidinrest auf das Sauerstoffatom der Esterbindung wird ein Alkohol freigesetzt. Durch die Spaltung der Bindung entsteht ein Acylenzym, bei dem der Fettsäureteil des Substrates mit dem katalytischen Serinrest verestert ist. Im zweiten Schritt, der Deacylierung, wird durch Übertragung eines Protons von einem Wasser-Molekül auf die aktive Seite des Serins ein Hydroxid-Ion gebildet, welches am Carbonyl-Kohlenstoffatom des Fettsäureteils des Substrats angreift und zu einem zweiten tetraedrischen Intermediat führt. Dieser negativgeladene Übergangszustand wird ebenfalls durch die Ausbildung von Wasserstoff-Brückenbindungen zum „*oxyanion hole*“ des Enzyms stabilisiert. Zum Schluss wird ein Proton vom Histidinrest auf das Sauerstoffatom des aktiven Serins übertragen, wodurch die Acylgruppe freigesetzt wird und das Enzym in seiner ursprünglichen freien Form vorliegt und für einen neuen Reaktionszyklus zur Verfügung steht (Verschueren *et al.*, 1993, Derewenda *et al.*, 1994, Grochulski *et al.*, 1994, Egloff *et al.*, 1995, Longhi *et al.*, 1997, Dodson und Wlodawer, 1998, Lang *et al.*, 1998, Jaeger *et al.*, 1999, Lotti und Alberghina, 2007).

5 Ausblick

Der Einsatz von Enzympräparationen aus Basidiomyceten im Käseprozess als Ersatz für die bisher eingesetzten animalischen Enzyme aus der Zungenwurzel von Ziege, Lamm und Kalb konnte anhand von Enzympräparationen aus *F. velutipes* und *P. citrinopileatus* erfolgreich umgesetzt werden.

Die Käseherstellung fand bisher in kleinem Maßstab statt. Um ein Produkt auf den Markt bringen zu können ist daher eine Maßstabsvergrößerung sowohl in Bezug auf die Enzymproduktion als auch auf den Käseprozess selbst unabdingbar. Daher muss das Kulturvolumen vergrößert werden. In diesem Zuge ist auch ein geeignetes Reinigungsverfahren der Enzympräparate aus der Fermentationsbrühe zu etablieren. Zur Vermeidung unerwünschter Fehlgerüche durch Bitterpeptide, welche durch Peptidase-Verunreinigungen der Enzympräparate entstehen können, sind umfassende Qualitätskontrollen der hergestellten Enzymchargen durchzuführen. Bisher wurden Käselaibe der Käsesorte Weichkäse vom Typ Feta hergestellt, in Zukunft sollten die Enzympräparate auch für die Herstellung anderer Käsesorten zum Einsatz kommen. Des Weiteren sind die Stabilität und die optimalen Lagerbedingungen der Enzympräparate zu bestimmen, z.B. durch den Zusatz von Salz, Glycerol oder durch Lyophilisation, um auch ein entsprechendes Mindesthaltbarkeitsdatum zu ermitteln.

Die Kultivierungsdauer der Hauptkulturen der Basidiomyceten *F. velutipes* und *P. citrinopileatus* waren mit 14 bzw. 21 Tagen sehr lang. Durch Variation der Kohlenstoff- und Stickstoffquelle sowie des pH-Wertes und der Temperatur können gegebenenfalls kürzere Kultivierungsperioden und höhere Aktivitäten generiert werden.

Die in dieser Arbeit durchgeführte Reinigung der Enzyme aus den Kulturüberständen war mit hohen Aktivitätsverlusten verbunden, in diesem Zuge, sollten Alternativen zur Reinigung herangezogen werden. Vor allem in Bezug auf das Enzym aus *P. citrinopileatus*, welches anhand elektroporetischer Methoden eine molekulare Masse im nativen Zustand von ca. 530 kDa aufwies, ist der Einsatz der Tangentialfluss-Filtration zur Abtrennung von höhermolekularen Bestandteilen > 300 kDa kontraproduktiv.

Zur genaueren Charakterisierung der mittels SPME-GC-MS/MS generierten Fettsäuren (Essig-, Butter-, Capron-, Capryl- und Caprinsäure) in den mittels Referenzenzym opti-zym z10uc sowie den Enzympräparationen aus *F. velutipes* und *P. citrinopileatus* hergestellten Käselaiben könnten weitere Methoden wie die SBSE-TDU-CIS-GC-MS sowie ein interner

Standard zur Quantifizierung zum Einsatz kommen. Des Weiteren könnten das gesamte Aromaprofil der Käselaiibe genauer untersucht werden.

Die molekularbiologische Charakterisierung sollte durch eine heterologe Expression der Zielenzyme in einem geeigneten Organismus vervollständigt werden. Des Weiteren könnten auf diesem Wege größere Mengen der Enzyme generiert werden und somit der Einsatz der rekombinanten Enzyme im Käseprozess getestet werden. Anschließend wäre ein Vergleich zwischen Käselaiiben, die unter Einsatz von Enzympräparationen bzw. unter Einsatz der rekombinanten Enzyme hergestellt wurden, anzustellen.

6 Literatur

- Accerbi M, Schmidt SA, Paoli Ed, Park S, Jeong D-H, Green PJ. 2010.** Methods for isolation of total RNA to recover miRNAs and other small RNAs from diverse species. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* **592**: 31–50.
- Adrio JL, Demain AL. 2003.** Fungal biotechnology. *International Microbiology* **6**: 191–199.
- Ainsworth GC, Kirk PM. 2008.** Ainsworth & Bisby's dictionary of the fungi. 10. Aufl., CABI, Wallingford.
- Aires-Barros MR, Cabral JMS. 1991.** Selective separation and purification of two lipases from chromobacterium viscosum using AOT reversed micelles. *Biotechnology and Bioengineering* **38**: 1302–1307.
- Akin N, Aydemir S, Koçak C, Yildiz MA. 2003.** Changes of free fatty acid contents and sensory properties of white pickled cheese during ripening. *Food Chemistry* **80**: 77–83.
- Alford JA, Pierce DA. 1963.** Production of lipase by *Pseudomonas fragi* in a synthetic medium. *Journal of Bacteriology* **86**: 24–29.
- Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ. 1997.** Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* **25**: 3389–3402.
- Ames BN. 1971.** The detection of chemical mutagens with enteric bacteria. In: Hollaender A, ed. *Chemical mutagens: principles and methods for their detection volume 1*. Boston, MA: Springer US, 267–282.
- Ames BN, Durston WE, Yamasaki E, Lee FD. 1973a.** Carcinogens are mutagens: a simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **70**: 2281–2285.
- Ames BN, Lee FD, Durston WE. 1973b.** An improved bacterial test system for the detection and classification of mutagens and carcinogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **70**: 782–786.
- Ames BN, McCann J, Yamasaki E. 1975.** Methods for detecting carcinogens and mutagens with the salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects* **31**: 347–363.
- Anifantakis, EM. 1991.** Greek cheeses-a tradition of centuries, cheeses in brine-Feta cheese. *National Dairy Committee of Greece, Athens, Greece*, pp. 27–42.
- Anon 2008.** Applications of lipases. www.aukbc.org/beta/bioproj2/uses.html, AU-KBC Research Center, Chennai, India

- Arnold K, Bordoli L, Kopp J, Schwede T. 2006.** The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics (Oxford, England)* **22**: 195–201.
- Arthur CL, Pawliszyn J. 1990.** Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. *Analytical Chemistry* **62**: 2145–2148.
- Attaie R, Richter RL. 1996.** Formation of volatile free fatty acids during ripening of cheddar-like hard goat cheese. *Journal of Dairy Science* **79**: 717–724.
- Beisson F, Arondel V, Verger R. 2000.** Assaying *Arabidopsis* lipase activity. *Biochemical Society Transactions* **28**: 773.
- Bellemain E, Carlsen T, Brochmann C, Coissac E, Taberlet P, Kauserud H. 2010.** ITS as an environmental DNA barcode for fungi: an in silico approach reveals potential PCR biases. *BMC Microbiology* **10**: 189.
- Benjamin S, Pandey A. 1998.** *Candida rugosa* lipases: molecular biology and versatility in biotechnology. *Yeast (Chichester, England)* **14**: 1069–1087.
- Bezerra TKA, Arcanjo NMdO, Araújo ARRd, Queiroz ALMd, Oliveira MEGd, Gomes AMP, Madruga MS. 2017.** Volatile profile in goat coalho cheese supplemented with probiotic lactic acid bacteria. *SLACA 2015: "Food Science for quality of life and health ageing"* **76**: 209–215.
- Biasini M, Bienert S, Waterhouse A, Arnold K, Studer G, Schmidt T, Kiefer F, Cassarino TG, Bertoni M, Bordoli L, Schwede T. 2014.** SWISS-MODEL: Modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. *Nucleic Acids Research* **42**: W252-8.
- Bordoli L, Kiefer F, Arnold K, Benkert P, Battey J, Schwede T. 2009.** Protein structure homology modeling using SWISS-MODEL workspace. *Nature Protocols* **4**: 1–13.
- Borgdorf R. 2005.** Substratselektivität von Lipasen bei der Veresterung und Umesterung cis/trans-isomerer Fettsäuren und Fettsäureester. Dissertation, Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen
- Borges KB, Borges WdS, Durán-Patrón R, Pupo MT, Bonato PS, Collado IG. 2009.** Stereoselective biotransformations using fungi as biocatalysts. *Tetrahedron: Asymmetry* **20**: 385–397.
- Borkar PS, Bodade RG, Rao SR, Khobragade CN. 2009.** Purification and characterization of extracellular lipase from a new strain: *Pseudomonas aeruginosa* SRT 9. *Brazilian Journal of Microbiology* **40**: 358–366.
- Bornscheuer UT. 2002.** Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application in biocatalysis. *FEMS Microbiology Reviews* **26**: 73–81.

- Bouws H, Wattenberg A, Zorn H. 2008.** Fungal secretomes—nature’s toolbox for white biotechnology. *Applied Microbiology and Biotechnology* **80**: 381.
- Bradford MM. 1976.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**: 248–254.
- Brady L, Brzozowski AM, Derewenda ZS, Dodson E, Dodson G, Tolley S, Turkenburg JP, Christiansen L, Huge-Jensen B, Norskov L et al. 1990.** A serine protease triad forms the catalytic centre of a triacylglycerol lipase. *Nature* **343**: 767–770.
- Brown AK, Kaul A, Varley J. 1999.** Continuous foaming for protein recovery: Part I. Recovery of β -casein. *Biotechnology and Bioengineering*. **62**: 278–290.
- Calvo MV, Fontecha J. 2004.** Purification and characterization of a pregastric esterase from a hygienized kid rennet paste. *Journal of Dairy Science* **87**: 1132–1142.
- Caro Jd, Ferrato F, Verger R, Caro Ad. 1995.** Purification and molecular characterization of lamb pregastric lipase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* **1252**: 321–329.
- Carvalho CCCRd. 2011.** Enzymatic and whole cell catalysis: finding new strategies for old processes. *Biotechnology advances* **29**: 75–83.
- Chander H, Batish VK, Sannabhadti SS, Srinivasan RA. 1980.** Factors affecting lipase production in *Aspergillus wentii*. *Journal of Food Science* **45**: 598–600.
- Charm SE, Morningstar J, Matteo CC, Paltiel B. 1966.** The separation and purification of enzymes through foaming. *Analytical Biochemistry* **15**: 498–508.
- Chu PY, Sun HL, Ko JL, Ku MS, Lin LJ, Lee YT, Liao PF, Pan HH, Lu HL, Lue KH. 2017.** Oral fungal immunomodulatory protein-*Flammulina velutipes* has influence on pulmonary inflammatory process and potential treatment for allergic airway disease: A mouse model. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection* **50**: 297–306.
- Collins YF, McSweeney PLH, Wilkinson MG. 2004.** Lipolysis and catabolism of fatty acids in cheese. In *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, Vol 1: *General Aspects*, 3rd edn: 373–389.
- Delgado FJ, González-Crespo J, Cava R, García-Parra J, Ramírez R. 2010.** Characterisation by SPME–GC–MS of the volatile profile of a spanish soft cheese P.D.O. Torta del casar during ripening. *Food Chemistry* **118**: 182–189.
- Delgado FJ, González-Crespo J, Cava R, Ramírez R. 2011.** Formation of the aroma of a raw goat milk cheese during maturation analysed by SPME–GC–MS. *Food Chemistry* **129**: 1156–1163.
- Deutsche Gesellschaft für Mykologie e.V.** Aufgerufen am 08.03.2018 unter:
<https://www.dgfm-ev.de/wissenswertes/pilze-biodiversitaet>.

- Derewenda U, Swenson L, Green R, Wei Y, Dodson GG, Yamaguchi S, Haas MJ, Derewenda ZS. 1994.** An unusual buried polar cluster in a family of fungal lipases. *Nature Structural Biology* **1**: 36–47.
- Desouza AHG, Tanner RD, Effler WT. 1991.** The effect of pH and gas composition on the bubble fractionation of proteins. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **28**: 655–666.
- Dodson G, Wlodawer A. 1998.** Catalytic triads and their relatives. *Trends in Biochemical Sciences* **23**: 347–352.
- Dong Y-r, Cheng S-j, Qi G-h, Yang Z-p, Yin S-y, Chen G-t. 2017.** Antimicrobial and antioxidant activities of *Flammulina velutipes* polysaccharides and polysaccharide-iron(III) complex. *Carbohydrate Polymers* **161**: 26–32.
- Driessen FM. 1989.** Inactivation of lipases and proteinases (indigenous and bacterial). In *Heat-induced changes in milk*. Brussels: International Dairy Federation. IDF Bulletin No. **238**: 71–93.
- Dufour J-P, Delbecq P, Albela LP. 2001.** Solid-phase microextraction combined with gas chromatography-olfactometry for analysis of cheese aroma. In: *Gas chromatography-olfactometry*. American Chemical Society, 123–137.
- Efthymiou CC, Mattick JF. 1964.** Development of domestic feta cheese. *Journal of Dairy Science* **47**: 593–598.
- Egloff MP, Marguet F, Buono G, Verger R, Cambillau C, van Tilbeurgh H. 1995.** The 2.46 Å resolution structure of the pancreatic lipase-colipase complex inhibited by a C11 alkyl phosphonate. *Biochemistry* **34**: 2751–2762.
- EI-Ghonemy DH, EI-Gamal M, Tantawy AE, Ali TH. 2017.** Extracellular alkaline lipase from a novel fungus *Curvularia* sp. DHE 5: Optimization of physicochemical parameters, partial purification and characterization. *Food Technology and Biotechnology* **55**.
- Ellaiah P, Prabhakar T, Ramakrishna B, Taleb A, Adinarayana K. 2004.** Production of lipase by immobilized cells of *Aspergillus niger*. *Process Biochemistry* **39**: 525–528.
- Engel W. 1999.** Solvent assisted flavour evaporation--a new and versatile technique for the careful and direct isolation of aroma compounds from complex food matrices. *European Food Research and Technology* **v. 209**: pp. 237-241-1999 v.209 no.3/4.
- Erb RE, Ehlers MH. 1950.** Resazurin reducing time as an indicator of bovine semen fertilizing capacity¹. *Journal of Dairy Science* **33**: 853–864.
- Eriksson K-EL, Blanchette RA, Ander P. 1990.** Morphological aspects of wood degradation by fungi and bacteria. In: *Microbial and enzymatic degradation of wood and wood components*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, pp. 1-87.
- Fox P, L. H. McSweeney P, Singh T. 1995.** Methods for assessing proteolysis in cheese during maturation. *Advances in experimental medicine and biology* **367**.

- Felice Md, Gomes T, Leonardis Td. 1991.** Addition of animal and microbial lipases to curd. Effects on free fatty acid composition during ripening. *Lait* **71**: 637–643.
- Fojan P, Jonson PH, Petersen MT, Petersen SB. 2000.** What distinguishes an esterase from a lipase: a novel structural approach. *Lipase 2000* **82**: 1033–1041.
- Forss DA. 1979.** Review of the progress of dairy science: Mechanisms of formation of aroma compounds in milk and milk products. *Journal of Dairy Research* **46**: 691-706.
- Fox PF. 1989.** Proteolysis during cheese manufacture and ripening¹. *Journal of Dairy Science* **72**: 1379–1400.
- Fox PF, Law J. 1991.** Enzymology of cheese ripening. *Food Biotechnology* **5**: 239–262.
- Fox PF, McSweeney PLH. 1996.** Proteolysis in cheese during ripening. *Food Reviews International* **12**: 457–509.
- Frank DC, Owen CM, Patterson J. 2004.** Solid phase microextraction (SPME) combined with gas-chromatography and olfactometry-mass spectrometry for characterization of cheese aroma compounds. *LWT - Food Science and Technology* **37**: 139–154.
- Gasteiger E, Hoogland C, Gattiker A, Duvaud S, Wilkins MR, Appel RD, Bairoch A. 2005.** Protein identification and analysis tools on the ExPASy Server. In: Walker JM, (ed). *The Proteomics Protocols Handbook*. Totowa, NJ: Humana Press, 571–607.
- Georgala A, Moschopoulou E, Aktypis A, Massouras T, Zoidou E, Kandarakis I, Anifantakis E. 2005.** Evolution of lipolysis during the ripening of traditional Feta cheese. *Food Chemistry* **93**: 73–80.
- Ghosh PK, Saxena RK, Gupta R, Yadav RP, Davidson S. 1996.** Microbial lipases: production and applications. *Science Progress* **79 (Pt 2)**: 119–157.
- Gierasch LM. 1989.** Signal sequences. *Biochemistry* **28**: 923–930.
- Gilbert EJ, Cornish A, Jones CW. 1991.** Purification and properties of extracellular lipase from *Pseudomonas aeruginosa* EF2. *Journal of General Microbiology* **137**: 2223–2229.
- Gomori G, Colowick S, Kaplan N. 1955.** Preparation of buffers for use in enzyme studies. *Methods in Enzymology* **1**:138–148
- Grochulski P, Bouthillier F, Kazlauskas RJ, Serreqi AN, Schrag JD, Ziomek E, Cygler M. 1994.** Analogs of reaction intermediates identify a unique substrate binding site in *Candida rugosa* lipase. *Biochemistry* **33**: 3494–3500.
- Grube M, Gaya E, Kauserud H, Smith AM, Avery SV, Fernstad SJ, Muggia L, Martin MD, Eivindsen T, Köljalg U, Bendiksby M. 2017.** The next generation fungal diversity researcher. *Fungal Biology Reviews* **31**: 124–130.
- Guerrand D.** Lipases industrial applications: focus on food and agroindustries. *Oilseed and fats Crops and Lipids, volume 24 number 4 (D403)*.

- Gulati R, Saxena R, Gupta R, Yadav R, Davidson W. 1999.** Parametric optimisation of *Aspergillus terreus* lipase production and its potential in ester synthesis. *Process Biochemistry* **35**: 459–464.
- Gundry RL, White MY, Murray CI, Kane LA, Fu Q, Stanley BA, Van Eyk JF. 2009.** Preparation of proteins and peptides for mass spectrometry analysis in a bottom-up proteomics workflow. *Current protocols in molecular biology*, Chapter: Unit 10.25.
- Gunnar H. 1983.** Patterns of amino acids near signal-sequence cleavage sites. *European Journal of Biochemistry* **133**: 17–21.
- Gupta R, Gupta N, Rathi P. 2004a.** Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. *Applied Microbiology and Biotechnology* **64**: 763–781.
- Gupta R, Jung E, Brunak S. 2004b.** Prediction of N-glycosylation sites in human proteins. *In preparation*.
- Gupta R, Rathi P, Gupta N, Bradoo S. 2003.** Lipase assays for conventional and molecular screening: an overview. *Biotechnology and Applied Biochemistry* **37**: 63–71.
- Gurr SJ, Unkles SE, Kinghorn JR. 1987.** The structure and organization of nuclear genes of filamentous fungi. In: Kinghorn JR (ed) *Gene structures in eukaryotic microbes*. IRL Press, Oxford. 93±139
- Heijne G von. 1985.** Signal sequences: the limits of variation. *Journal of Molecular Biology* **184**: 99–105.
- Heijne G von. 1990.** The signal peptide. *The Journal of Membrane Biology* **115**: 195–201.
- Hibbett DS, Binder M, Bischoff JF, et al. 2007.** A higher-level phylogenetic classification of the fungi. *Mycological Research* **111**: 509–547.
- Hiol A, Jonzo MD, Rugani N, Druet D, Sarda L, Comeau LC. 2000.** Purification and characterization of an extracellular lipase from a thermophilic *Rhizopus oryzae* strain isolated from palm fruit. *Enzyme and Microbial Technology* **26**: 421–430.
- Hollmann F, Arends IWCE, Buehler K, Schallmeyer A, Bühler B. 2011.** Enzyme-mediated oxidations for the chemist. *Green Chemistry* **13**: 226–265.
- Houde A, Kademi A, Leblanc D. 2004.** Lipases and their industrial applications: an overview. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **118**: 155–170.
- Imran M, Khan H, Hassan SS, Khan R. 2008.** Physicochemical characteristics of various milk samples available in Pakistan. *Journal of Zhejiang University. Science. B* **9**: 546–551.
- ISO 11350:2012.** Water quality - Determination of the genotoxicity of water and waste water - Salmonella/microsome fluctuation test (Ames fluctuation test).
- Jaeger KE, Dijkstra BW, Reetz MT. 1999.** Bacterial biocatalysts: molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases. *Annual Review of Microbiology* **53**: 315–351.

- Jagella T, Grosch W. 1999.** Flavour and off-flavour compounds of black and white pepper (*Piper nigrum* L.) I. Evaluation of potent odorants of black pepper by dilution and concentration techniques. *European Food Research and Technology* **209**: 16–21.
- Jooyandeh H, Kaur A, Minhas KS. 2009.** Lipases in dairy industry: a review. *Journal of Food Science and Technology (Mysore)* **46**: 181–189.
- Käseverordnung** in der Fassung der Bekanntmachung vom 14. April 1986 (BGBl. I S. 412), die zuletzt durch Artikel 18 der Verordnung vom 5. Juli 2017 (BGBl. I S. 2272) geändert worden ist (https://www.gesetze-im-internet.de/k_sev/K%C3%A4seV.pdf).
- Kang D, Gho Y, Suh M, Kang C. 2002.** Highly sensitive and fast protein detection with coomassie brilliant blue in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Communications to the Editor Bull. Korean Chemical Society* **23**.
- Kataoka H, Lord HL, Pawliszyn J. 2000.** Applications of solid-phase microextraction in food analysis. *Journal of Chromatography A* **880**: 35–62.
- Kazlauskas RJ. 1994.** Elucidating structure-mechanism relationships in lipases: prospects for predicting and engineering catalytic properties. *Trends in biotechnology* **12**: 464–472.
- Kilcawley K, Wilkinson M, Fox P. 2002.** Determination of key enzyme activities in commercial peptidase and lipase preparations from microbial or animal sources. *Enzyme and Microbial Technology* **31**: 310–320.
- Kirk O, Borchert TV, Fuglsang CC. 2002.** Industrial enzyme applications. *Current Opinion in Biotechnology* **13**: 345–351.
- Kováts E. 1958.** Gas-chromatographische Charakterisierung organischer Verbindungen Teil 1: Retentionsindices aliphatischer Halogenide, Alkohole, Aldehyde und Ketone. *Helvetica Chimica Acta*: 1915–1932.
- Laemmli UK. 1970.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680–685.
- Lai DT, Mackenzie AD, O'Connor CJ, Turner KW. 1997.** Hydrolysis characteristics of bovine milk fat and monoacid triglycerides mediated by pregastric lipase from goats and kids. *Journal of Dairy Science* **80**: 2249–2257.
- Lai DT, Stanley RD, O'Connor CJ. 1998.** Purification of pregastric lipases of caprine origin. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **75**: 411–416.
- Lang DA, Manesse ML, Haas GHd, Verheij HM, Dijkstra BW. 1998.** Structural basis of the chiral selectivity of *Pseudomonas cepacia* lipase. *European Journal of Biochemistry* **254**: 333–340.
- Lauber C. 2015.** Molekulare Charakterisierung lignocellulolytischer Enzyme aus dem Sekretom von *Pleurotus sapidus*, Dissertation, Justus-Liebig-Universität, Gießen.
- Larios A. 2004.** Synthesis of flavor and fragrance esters using *Candida antarctica* lipase. *Applied Microbiology and Biotechnology* v. **65**: pp. 373-376-2004 v.65 no.4.

- Le Quéré J-L, Pierre A, Riaublanc A, Demaizères D. 1998.** Characterization of aroma compounds in the volatile fraction of soft goat cheese during ripening. *Lait* **78**: 279–290.
- Lee HJ, Olson NF, Ryan DS. 1980.** Characterization of pregastric esterases. *Journal of Dairy Science* **63**: 1834–1838.
- Leifa F, Pandey A, Soccol CR. 2001.** Production of *Flammulina velutipes* on coffee husk and coffee spent-ground. *Brazilian Archives of Biology and Technology* **44**: 205–212.
- Leresche JE, Meyer H-P. 2006.** Chemocatalysis and biocatalysis (biotransformation): some thoughts of a chemist and of a biotechnologist. *Organic Process Research and Development* **10**: 572–580.
- Linke D, Matthes R, Nimtz M, Zorn H, Bunzel M, Berger RG. 2013.** An esterase from the basidiomycete *Pleurotus sapidus* hydrolyzes feruloylated saccharides. *Applied Microbiology and Biotechnology* **97**: 7241–7251.
- Linke D, Nimtz M, Berger RG, Zorn H. 2009.** Separation of extracellular esterases from pellet cultures of the basidiomycete *Pleurotus sapidus* by foam fractionation. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **86**: 437–444.
- Lis H, Sharon N. 1993.** Protein glycosylation. *European Journal of Biochemistry* **218**: 1–27.
- Liu J, Sun Y, Yu H, Zhang C, Yue L, Yang X, Wang L, Liu J. 2012.** Purification and identification of one glucan from golden oyster mushroom (*Pleurotus citrinopileatus* (Fr.) Singer). *Carbohydrate Polymers* **87**: 348–352.
- Liu Y, Xu H, Yan Q, Yang S, Duan X, Jiang Z. 2013.** Biochemical characterization of a first fungal esterase from *Rhizomucor miehei* showing high efficiency of ester synthesis. *Public Library of Science one* **8**: e77856.
- Loha V, D. Tanner R, Prokop A. 1997.** The effect of pectinase on the bubble fractionation of invertase from alpha-amylase. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **63-65**.
- Longhi S, Mannesse M, Verheij HM, Haas GHd, Egmond M, Knoops-Mouthuy E, Cambillau C. 1997.** Crystal structure of cutinase covalently inhibited by a triglyceride analogue. *Protein Science A Publication of the Protein Society* **6**: 275–286.
- Lotti M, Alberghina L. 2007.** Lipases: molecular structure and function. In: Polaina J, MacCabe AP, eds. *Industrial enzymes: structure, function and applications*. Dordrecht: Springer, 263–281.
- Lotti M, Monticelli S, Luis Montesinos J, Brocca S, Valero F, Lafuente J. 1998.** Physiological control on the expression and secretion of *Candida rugosa* lipase. *Chemistry and Physics of Lipids* **93**: 143–148.
- Loughlin WA. 2000.** Biotransformations in organic synthesis. *Bioresource Technology* **74**: 49–62.

- Lozano PR, Drake M, Benitez D, Cadwallader KR. 2007.** Instrumental and sensory characterization of heat-induced odorants in aseptically packaged soy milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **55**: 3018–3026.
- Maas K. 1973.** Schaumfraktionierungsanalyse. In: Korte F. (Hrsg.) *Methodicum Chemicum, Volume 1, Academic Press New York*: 170-177.
- Mallatou H, Pappa E, Massouras T. 2003.** Changes in free fatty acids during ripening of Teleme cheese made with ewes', goats', cows' or a mixture of ewes' and goats' milk. *International Dairy Journal* **13**: 211–219.
- Manolopoulou E, Sarantinopoulos P, Zidou E, Aktypis A, Moschopoulou E, Kandarakis IG, Anifantakis EM. 2003.** Evolution of microbial populations during traditional Feta cheese manufacture and ripening. *International Journal of Food Microbiology* **82**: 153–161.
- Marilley L, Casey MG. 2004.** Flavours of cheese products: metabolic pathways, analytical tools and identification of producing strains. *International Journal of Food Microbiology* **90**: 139–159.
- McCann J, Ames BN. 1976.** A simple method for detecting environmental carcinogens as mutagens. *Annals of the New York Academy of Sciences* **271**: 5–13.
- McCann J, Spingarn NE, Kobori J, Ames BN. 1975.** Detection of carcinogens as mutagens: bacterial tester strains with R factor plasmids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **72**: 979–983.
- McDonell MW, Simon MN, Studier FW. 1977.** Analysis of restriction fragments of T7 DNA and determination of molecular weights by electrophoresis in neutral and alkaline gels. *Journal of Molecular Biology* **110**: 119–146.
- McSweeney PLH. 2004.** Biochemistry of cheese ripening. *International Journal of Dairy Technology* **57**: 127–144.
- McWilliam H, Li W, Uludag M, Squizzato S, Park YM, Buso N, Cowley AP, Lopez R. 2013.** Analysis tool web services from the EMBL-EBI. *Nucleic Acids Research* **41**: W597-600.
- Mhetras NC, Bastawde KB, Gokhale DV. 2009.** Purification and characterization of acidic lipase from *Aspergillus niger* NCIM 1207. *Bioresource Technology* **100**: 1486–1490.
- Milchindustrie-Verband e.V. 2017.** Zahlen, Daten, Fakten 2016; Herstellung von Käse nach Sorten in Deutschland, Stand September 2017, Aufgerufen am 08.03.2018 unter: https://milchindustrie.de/wp-content/uploads/2017/10/Produktion_K%C3%A4se_DE_2000-2016_Homepage.pdf.

- Milchindustrie-Verband e.V. 2017.** Pro-Kopf-Verbrauch von Milchprodukten in Deutschland, Stand: September 2017, Aufgerufen am 08.03.2018 unter: https://milchindustrie.de/wp-content/uploads/2017/10/ProkopfDeutschland_Mopro_2010-2016x_Homepage.pdf.
- Mizuno R, Ichinose H, Honda M, Takabatake K, Sotome I, Takai T, Maehara T, Okadome H, Isobe S, Gau M, Kaneko S. 2009.** Use of whole crop sorghums as a raw material in consolidated bioprocessing bioethanol production using *Flammulina velutipes*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **73**: 1671–1673.
- Mondello L, Costa R, Tranchida PQ, Chiofalo B, Zumbo A, Dugo P, Dugo G. 2005.** Determination of flavor components in Sicilian goat cheese by automated HS-SPME-GC. *Flavour and Fragrance Journal* **20**: 659–665.
- Mozaffar Z, Weete JD. 1993.** Purification and properties of an extracellular lipase from *Pythium ultimum*. *Lipids* **28**: 377–382.
- Muralidharan M, Buss K, Larrimore KE, Segerson NA, Kannan L, Mor TS. 2013.** The *Arabidopsis thaliana* ortholog of a purported maize cholinesterase gene encodes a GDSL-lipase. *Plant Molecular Biology* **81**: 565–576.
- Nardini M, Dijkstra BW. 1999.** α/β Hydrolase fold enzymes: the family keeps growing. *Current Opinion in Structural Biology* **9**: 732–737.
- Nelson JH, Jensen RG, Pitas RE. 1977.** Pregastric esterase and other oral lipases—a review. *Journal of Dairy Science* **60**: 327–362.
- Nieter A, Haase-Aschoff P, Linke D, Nimtze M, Berger RG. 2014.** A halotolerant type A feruloyl esterase from *Pleurotus eryngii*. *Fungal Biology* **118**: 348–357.
- Nomenclatur of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology, NC-IUBMB.**
- O'Brien J, Wilson I, Orton T, Pognan F. 2000.** Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *European Journal of Biochemistry* **267**: 5421–5426.
- O'Connor CJ, Barton RH, Butler PA, Mackenzie AD, Manuel RD, Lai DT. 1996.** Ruminant pregastric lipases: experimental evidence of their potential as industrial catalysts in food technology. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **7**: 189–205.
- Ogawa J, Shimizu S. 1999.** Microbial enzymes: new industrial applications from traditional screening methods. *Trends in Biotechnology* **17**: 13–21.
- Olivecrona T, Vilaró S, Olivecrona G. 2003.** Lipases in milk. In: Fox PF, McSweeney PLH, eds. *Advanced Dairy Chemistry—1 Proteins: Part A/Part B*. Boston, MA: Springer US, 473–494.

- Ollis DL, Cheah E, Cygler M, Dijkstra B, Frolow F, Franken SM, Harel M, Remington SJ, Silman I, Schrag J *et al.* 1992. The alpha/beta hydrolase fold. *Protein Engineering* 5: 197–211.
- Østergaard LH, Olsen HS. 2011. Industrial applications of fungal enzymes. In: Hofrichter M, ed. *Industrial Applications*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 269–290.
- Ostwald W. 1920. Verfahren zum Verdampfen von Flüssigkeiten, Patentschrift-Nr. 327976, Klasse 12 a, Gruppe 2. Reichspatentamt.
- Pabai F, Kermasha S, Morin A. 1995. Lipase from *Pseudomonas fragi* CRDA 323: partial purification, characterization and interesterification of butter fat. *Applied Microbiology and Biotechnology* 43: 42–51.
- Padgett RA, Konarska MM, Grabowski PJ, Hardy SF, Sharp PA. 1984. Lariat RNA's as intermediates and products in the splicing of messenger RNA precursors. *Science (New York, N.Y.)* 225: 898–903.
- Patel AK, Singhania RR, Pandey A. 2016. Novel enzymatic processes applied to the food industry. *Food Chemistry and Biochemistry • Food Bioprocessing* 7: 64–72.
- Pérez Olivero SJ, Pérez Trujillo JP. 2010. A new method for the determination of carbonyl compounds in wines by headspace solid-phase microextraction coupled to gas chromatography–ion trap mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 58: 12976–12985.
- Petersen TN, Brunak S, Heijne G von, Nielsen H. 2011. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nature methods* 8: 785–786.
- Pinho O, Ferreira IMPLVO, Ferreira MA. 2002. Solid-phase microextraction in combination with GC/MS for quantification of the major volatile free fatty acids in ewe cheese. *Analytical Chemistry* 74: 5199–5204.
- Piscitelli A, Tarallo V, Guarino L, Sannia G, Birolo L, Pezzella C. 2017. New lipases by mining of *Pleurotus ostreatus* genome. *Public Library of Science one* 12: e0185377.
- Purdy RE, Kolattukudy PE. 1973. Depolymerization of a hydroxy fatty acid biopolymer, cutin, by an extracellular enzyme from *Fusarium solani f. pisi*: isolation and some properties of the enzyme. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 159: 61–69.
- Quevillon E, Silventoinen V, Pillai S, Harte N, Mulder N, Apweiler R, Lopez R. 2005. InterProScan: protein domains identifier. *Nucleic Acids Research* 33: W116–W120.
- Quin MB, Wawrzyn G, Schmidt-Dannert C. 2013. Purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of Omp6, a protoilludene synthase from *Omphalotus olearius*. *Acta crystallographica. Section F, Structural Biology and Crystallization Communications* 69: 574–577.
- Rajendran A, Palanisamy A, Thangavelu V. 2009. Lipase catalyzed ester synthesis for food processing industries. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 52: 207–219.

- Rapoport TA. 1992.** Transport of proteins across the endoplasmic reticulum membrane. *Science* **258**: 931.
- Ray A. 2012.** Application of lipase in industry. *Asian Journal of Pharmacy and Technology* **2**: 33–37.
- Rehm H, Letzel T. 2015.** Der Experimentator. Proteinbiochemie, Proteomics. 7. Aufl., Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- Riva S. 2001.** Biocatalytic modification of natural products. *Current Opinion in Chemical Biology* **5**: 106–111.
- Romdhan Ib-b, Fendri A, Frikha F, Gargouri A, Belghith H. 2012.** Purification, physico-chemical and kinetic properties of the deglycosylated *Talaromyces thermophilus* lipase. *International Journal of Biological Macromolecules* **51**: 892–900.
- Sarda L, Desnuelle P. 1958.** Action de la lipase pancréatique sur les esters en émulsion. *Biochimica et Biophysica Acta* **30**: 513–521.
- Saxena R, Sheoran A, Giri B, Davidson W. 2003.** Purification strategies for microbial lipases. *Journal of Microbiological Methods* **52**: 1–18.
- Schlutt B, Moran N, Schieberle P, Hofmann T. 2007.** Sensory-directed identification of creaminess-enhancing volatiles and semivolatiles in full-fat cream. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **55**: 9634–9645.
- Schmid RD, Verger R. 1998.** Lipases: interfacial enzymes with attractive applications. *Angewandte Chemie International Edition* **37**: 1608–1633.
- Schrag JD, Li Y, Wu S, Cygler M. 1991.** Ser-His-Glu triad forms the catalytic site of the lipase from *Geotrichum candidum*. *Nature* **351**: 761 EP -.
- Schüttmann I. 2011.** Sekretomanalyse von *Pleurotus sapidus* zum effizienten Aufschluss von Lignocellulosen, Dissertation, Justus-Liebig-Universität, Gießen.
- Schwarze FW, Engels J, Mattheck C. 2000.** Fungal strategies of wood decay in trees. Springer, Berlin.
- Sharma R, Chisti Y, Banerjee UC. 2001.** Production, purification, characterization, and applications of lipases. *Biotechnology Advances* **19**: 627–662.
- Shaw KL, Grimsley GR, Yakovlev GI, Makarov AA, Pace CN. 2001.** The effect of net charge on the solubility, activity, and stability of ribonuclease Sa. *Protein Science A Publication of the Protein Society* **10**: 1206–1215.
- Shevchenko A, Tomas H, Havlis J, Olsen JV, Mann M. 2006.** In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nature Protocols* **1**: 2856–2860.
- Shu C-H, Xu C-J, Lin G-C. 2006.** Purification and partial characterization of a lipase from *Antrodia cinnamomea*. *Process Biochemistry* **41**: 734–738.

- Sigrist CJA, Castro Ed, Cerutti L, Cucho BA, Hulo N, Bridge A, Bougueleret L, Xenarios I. 2013.** New and continuing developments at PROSITE. *Nucleic Acids Research* **41**: D344-7. doi:10.1093/nar/gks1067.
- Sigrist CJA, Cerutti L, Hulo N, Gattiker A, Falguet L, Pagni M, Bairoch A, Bucher P. 2002.** PROSITE: a documented database using patterns and profiles as motif descriptors. *Briefings in Bioinformatics* **3**: 265–274.
- Singh AK, Mukhopadhyay M. 2012.** Overview of fungal lipase: a review. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **166**: 486–520.
- Singh MK, Singh J, Kumar M, Thakur IS. 2014.** Novel lipase from basidiomycetes *Schizophyllum commune* ISTL04, produced by solid state fermentation of *Leucaena leucocephala* seeds. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **110**: 92–99.
- Singh Arora D, Kumar Sharma R. 2010.** Ligninolytic fungal laccases and their biotechnological applications. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **160**: 1760–1788.
- Sousa M, Ardö Y, McSweeney P. 2001.** Advances in the study of proteolysis during cheese ripening. *Cheese Ripening and Technology* **11**: 327–345.
- Southern E. 1979.** Gel electrophoresis of restriction fragments. In: *Methods in Enzymology Recombinant DNA*: Academic Press, 152–176.
- Stentoft C, Vakhrushev SY, Joshi HJ, Kong Y, Vester-Christensen MB, Scholdager KT, Lavrsen K, Dabelsteen S, Pedersen NB, Marcos-Silva L, Gupta R, Bennett EP, Mandel U, Brunak S, Wandall HH, Levery SB, Clausen H. 2013.** Precision mapping of the human O-GalNAc glycoproteome through SimpleCell technology. *The EMBO Journal* **32**: 1478–1488.
- Steinhaus P, Schieberle P. 2007.** Characterization of the key aroma compounds in soy sauce using approaches of molecular sensory science. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **55**: 6262–6269.
- Sweers HM, Wong CH. 1986.** Enzyme-catalyzed regioselective deacylation of protected sugars in carbohydrate synthesis. *Journal of the American Chemical Society* **108**: 6421–6422.
- Sztajer H, Bryjak M. 1989.** Capillar membranes for purification of *Pseudomonas fluorescens* lipase. *Bioprocess Engineering* **4**: 257–259.
- Tan T, Zhang M, Wang B, Ying C, Deng L. 2003.** Screening of high lipase producing *Candida sp.* and production of lipase by fermentation. *Process Biochemistry* **39**: 459–465.
- Tao J, Xu J-H. 2009.** Biocatalysis in development of green pharmaceutical processes. *Current Opinion in Chemical Biology* **13**: 43–50.
- Tay E-P, Gam L-H. 2011.** Proteomics of human and the domestic bovine and caprine milk. *Asia-Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology* **19**.

- Trapp T, Zajul M, Ahlborn J, Stephan A, Zorn H, Fraatz MA. 2018.** Submerged cultivation of *Pleurotus sapidus* with molasses: aroma dilution analyses by means of solid phase microextraction and stir bar sorptive Extraction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **66**: 2393–2402.
- Twigg RS. 1945.** Oxidation-reduction aspects of resazurin. *Nature* **155**: 401 EP -.
- Uraizee F, Narsimhan G. 1990.** Foam fractionation of proteins and enzymes. II. Performance and modelling. *Enzyme and Microbial Technology* **12**: 315–316.
- Uraizee F, Narsimhan G. 1996.** Effects of kinetics of adsorption and coalescence on continuous foam concentration of proteins: comparison of experimental results with model predictions. *Biotechnology and Bioengineering* **51**: 384–398.
- Verger R. 1997.** 'Interfacial activation' of lipases: facts and artifacts. *Trends in Biotechnology* **15**: 32–38.
- Verger R, Haas GH de. 1976.** Interfacial enzyme kinetics of lipolysis. *Annual Review of Biophysics Bioengineering* **5**: 77–117.
- Verger R, Mieras MC, Haas GHd. 1973.** Action of phospholipase A at interfaces. *The Journal of Biological Chemistry* **248**: 4023–4034.
- Verschueren KH, Seljee F, Rozeboom HJ, Kalk KH, Dijkstra BW. 1993.** Crystallographic analysis of the catalytic mechanism of haloalkane dehalogenase. *Nature* **363**: 693–698.
- Villeneuve P, Pina M, Graille J. 1996.** Determination of pregastric lipase specificity in young ruminants. *Chemistry and Physics of Lipids* **83**: 161–168.
- White, Bruns T, Lee S, Taylor J. 1990.** Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA Genes for phylogenetics. In book: PCR - Protocols and Applications - A Laboratory Manual. *Academic Press*, pp.315-322
- Winkler FK, D'Arcy A, Hunziker W. 1990.** Structure of human pancreatic lipase. *Nature* **343**: 771–774.
- Winkler UK, Stuckmann M. 1979.** Glycogen, hyaluronate, and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens*. *Journal of Bacteriology* **138**: 663–670.
- Wirotdama IPG, Ney KH. 1974.** Untersuchung von Provolone-Käse-Aroma. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung* **154**: 67–72.
- Wohlgemuth R. 2010.** Biocatalysis-key to sustainable industrial chemistry. *Current Opinion in Biotechnology* **21**: 713–724.
- Yadav RP, Saxena RK, Gupta R, Davidson S. 1998.** Lipase production by *Aspergillus* and *Penicillium* species. *Folia microbiologica* **43**: 373–378.
- Yamane T. 1987.** Enzyme technology for the lipids industry: an engineering overview. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **64**: 1657–1662.

- Zabel RA, Morrell JJ. 1992.** Wood microbiology: decay and its prevention. *Elsevier Science*, Oxford.
- Zhang J, Wang G, Li H, Zhuang C, Mizuno T, Ito H, Suzuki C, Okamoto H, Li J. 1994.** Antitumor polysaccharides from a Chinese mushroom, “yuhuangmo” the fruiting body of *Pleurotus citrinopileatus*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **58**: 1195–1201.
- Zhang Z, Yang MJ, Pawliszyn J. 1994.** Solid-phase microextraction. A solvent-free alternative for sample preparation. *Analytical Chemistry* **66**: 844A-853A.
- Zorn H, Bouws H, Takenberg M, Nimtze M, Getzlaff R, Breithaupt DE, Berger R. 2005a.** An extracellular carboxylesterase from the basidiomycete *Pleurotus sapidus* hydrolyses xanthophyll esters. *Biological Chemistry* **386**: 435–440.
- Zorn H, Breithaupt DE, Takenberg M, Schwack W, Berger RG. 2003.** Enzymatic hydrolysis of carotenoid esters of marigold flowers (*Tagetes erecta* L.) and red paprika (*Capsicum annuum* L.) by commercial lipases and *Pleurotus sapidus* extracellular lipase. *Enzyme and Microbial Technology* **32**: 623–628.
- Zorn H, Peters T, Nimtze M, Berger RG. 2005b.** The secretome of *Pleurotus sapidus*. *Proteomics* **5**: 4832–4838.

7 Anhang

Tabelle 7.1 Verlaufsprotokoll zum Herstellen von Käse

Zeit	Schritt	Wanne 1	Wanne 2	Wanne 3
	Milch einstellen auf 33°C			
	Zugabe der Kultur Lyofast M 036 L (Tabelle 2.52)	9:20	9:25	9:30
	Zugabe der Lipase Zugabe Calcium (opti-calc, Tabelle 2.52)	+ 20 mL + 0,3 mL	+ 5 mL + 0,3 mL	+ 10 mL + 0,3 mL
	Vorreifen	45 min	45 min	45 min
0 min	Zugabe Mikrolab (opti-lase, Tabelle 2.52)	10:05 0,51 mL	10:10 0,51 mL	10:15 0,51 mL
16 min	Gerinnungszeit			
45 min	Dickungszeit			
45 min	Schneiden	11:33	11:47	11:57
50 min/ 60 min 70 min/ 80 min	Verziehen	im 10 min Takt	im 10 min Takt	im 10 min Takt
90 min	Wasserszugabe 1L mit 48°C Schöpfen	12:10 12:20	12:30 12:40	12:40 12:50
10 min 60 min 120 min 240 min	Wenden	12:30 13:30 14:30 16:30	12:50 13:50 14:50 16:50	13:00 14:00 15:00 17:00
24 h	Abtropfen	über Nacht	über Nacht	über Nacht
Tag 2/ 03.03.17 50 min	Salzbad	7:40 50 min/ 20°Baumé/ 15°C	7:40 50 min/ 20°Baumé/ 15°C	7:40 50 min/ 20°Baumé/ 15°C
Tag 2/ 03.03.17	Natamycin-Tauchbad (opti-cid, Tabelle 2.52) & anschl. Abtropfen	9:00 1 min	9:00 1 min	9:00 1 min
Tag 2/ 03.03.17	in Folie einschweißen	10:15	10:15	10:15
30 Tage bei 10-15°C	Reifen	bis 04.04.17	bis 04.04.17	bis 04.04.17

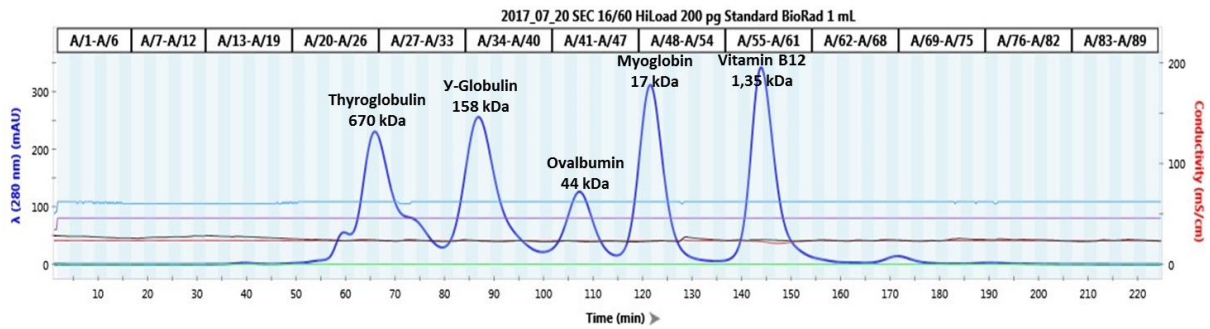


Abbildung 7.1: FPLC-SEC-Chromatogramm der Proteinstandards

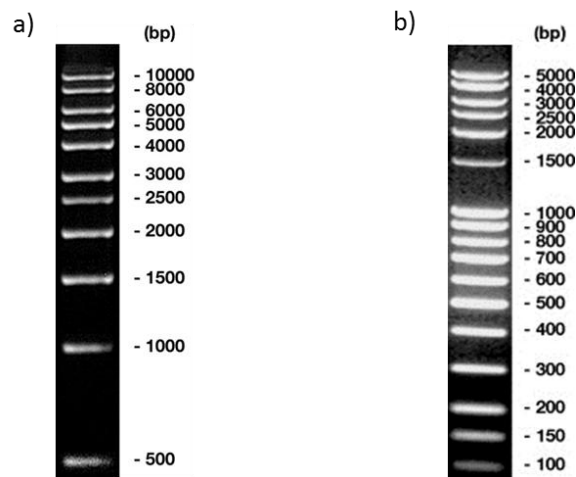


Abbildung 7.2 DNA-Größenstandards für Agarose-Gelelektrophorese. a) 1 kbp DNA-Leiter, b) 100 bp DNA-Leiter (extended). Bildquelle: *Gebrauchsanweisung*, Carl Roth

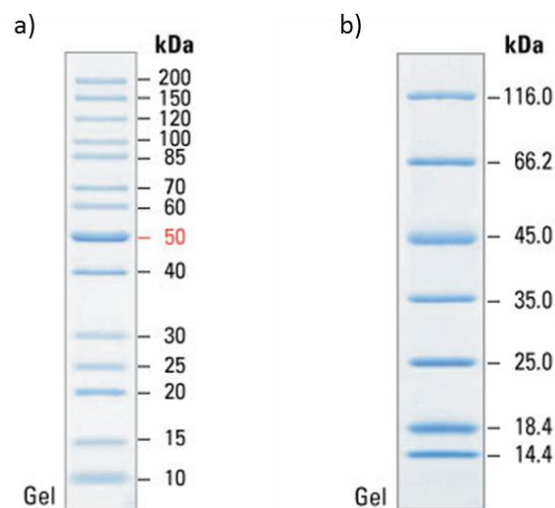


Abbildung 7.3 Proteingrößenstandards für denaturierende SDS-PAGE. a) PageRuler Unstained Protein Ladder, b) Unstained Protein Molecular Weight Marker. Bildquelle: *Product Information* Thermo Fisher

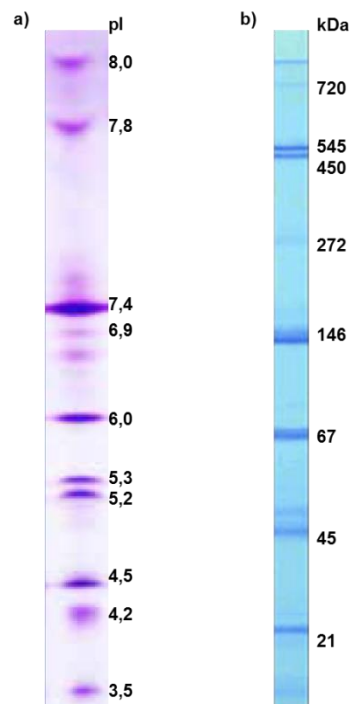


Abbildung 7.4 Standards für isoelektrische Fokussierung (IEF). a) SERVA IEF-Marker 3-10 liquid mix. Bildquelle: Manual, Invitrogen b) SERVA Native Marker Liquid Mix for Blue Native and Clear Native Electrophorese

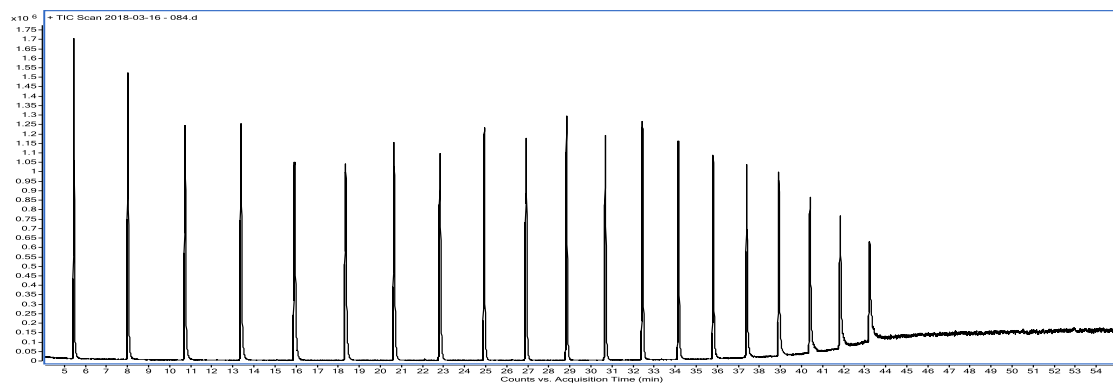


Abbildung 7.5 Alkanreihe mit allen homologen n-Alkanen von C8 bis C26 (40 mg*L⁻¹ in Hexan), gemessen mittels HS-SPME-GC-MS

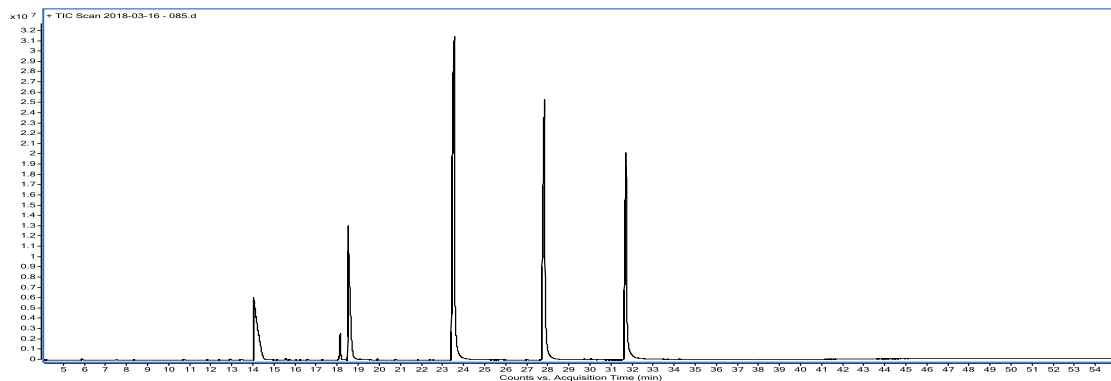


Abbildung 7.6 Fettsäurestandard

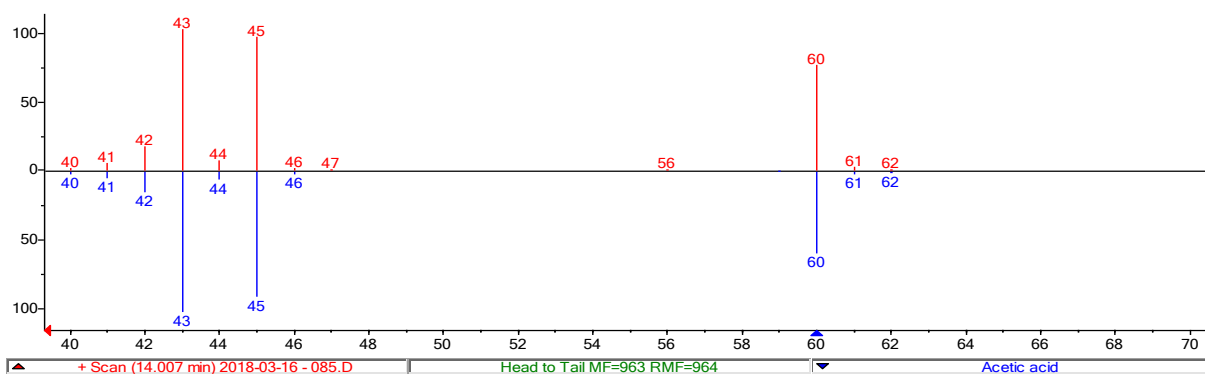


Abbildung 7.7 Massenspektrum von Essigsäure, rot analysierte Substanz, blau NIST-Datenbankident Essigsäure

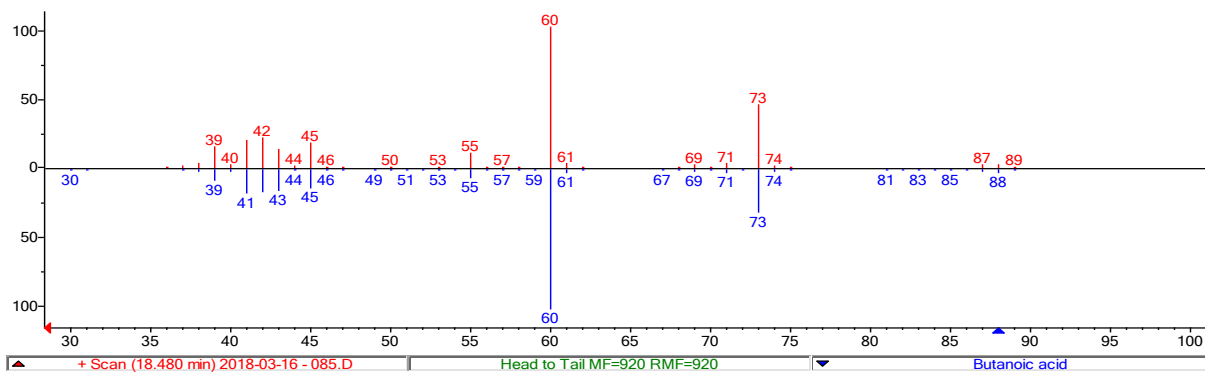


Abbildung 7.8 Massenspektrum von Buttersäure, rot analysierte Substanz, blau NIST-Datenbankident Buttersäure

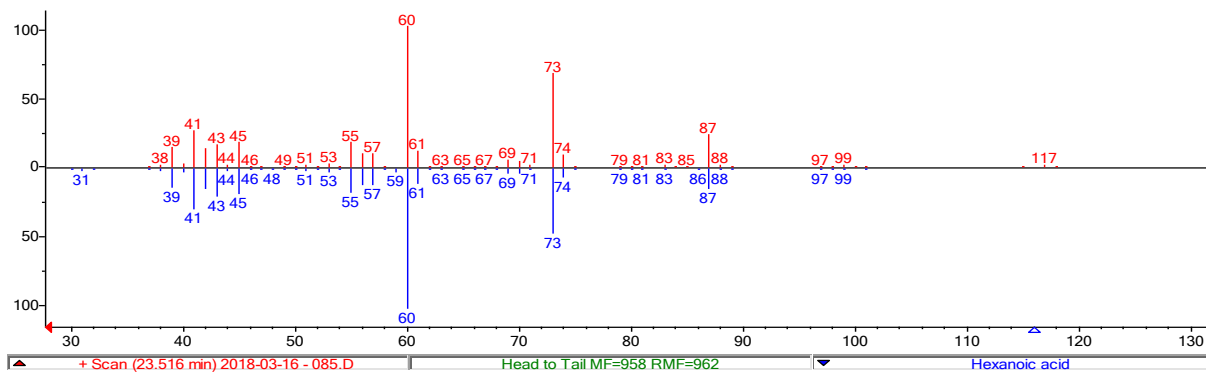


Abbildung 7.9 Massenspektrum von Capronsäure, rot analysierte Substanz, blau NIST-Datenbankident Capronsäure

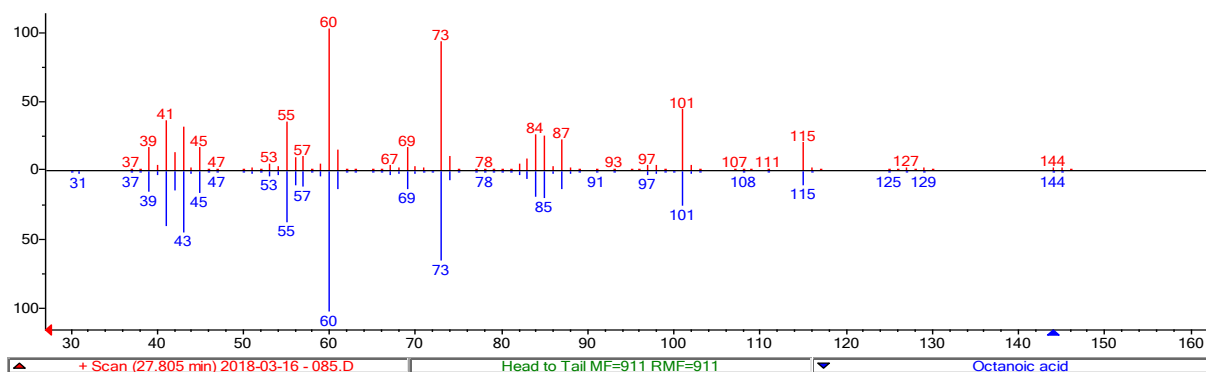


Abbildung 7.10 Massenspektrum von Caprylsäure, rot analysierte Substanz, blau NIST-Datenbankident Caprylsäure

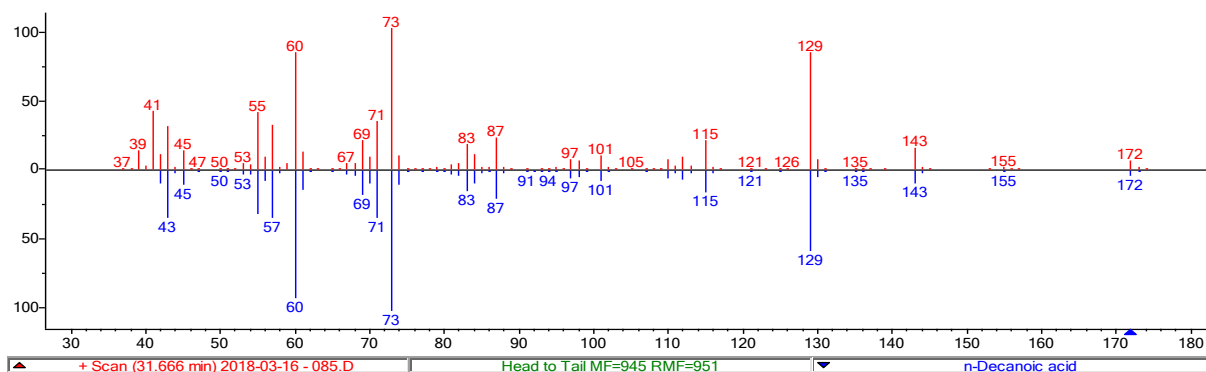


Abbildung 7.11 Massenspektrum von Caprinsäure, rot analysierte Substanz, blau NIST-Datenbankident Caprinsäure