

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Fachgebiet Biotechnologie der Naturstoffe

Aminosäure- und Peptidstoffwechsel von *Lactobacillus sakei*:
Analytische und biochemische Untersuchungen zur Bildung
von aromarelevanten Verbindungen

Quirin Sinz

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. Peter Schieberle

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. Wilfried Schwab
2. Univ.-Prof. Dr. Rudi F. Vogel

Die Dissertation wurde am 12.07.2011 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 26.09.2011 angenommen.

**Ever tried. Ever failed. No matter.
Try again. Fail again. Fail better.**

Samuel Beckett, 1983

meinen Eltern

Danksagung

Meinem Doktorvater Prof. Dr. Wilfried Schwab gilt mein besonderer Dank für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit die Arbeit an seinem Fachgebiet durchzuführen. Danke auch für die wissenschaftliche Betreuung, die zahlreichen Anregungen, das mir entgegengebrachte Vertrauen, die stete Bereitschaft zur fachlichen Diskussion und besonders für den immerwährenden Optimismus.

Des Weiteren möchte ich mich vor allem bei Prof. Dr. Rudi F. Vogel vom Lehrstuhl für Technische Mikrobiologie der Technischen Universität München bedanken, ohne dessen Hilfe und Unterstützung große Teile dieser Arbeit nicht möglich gewesen wären. Danke auch für die zahlreichen Ratschläge, neuen Denkanstöße, hilfreichen Diskussionen und die Bereitstellung der verwendeten Bakterienstämme.

Allen aktuellen und ehemaligen Kollegen am Fachgebiet Biotechnologie der Naturstoffe (früher: Biomolekulare Lebensmitteltechnologie) gilt mein herzlicher Dank für die außerordentlich gute Zusammenarbeit, die hilfreichen Ratschläge und die hervorragende Arbeitsatmosphäre. Ein ganz spezieller Dank gilt Ludwig Ring und Christopher Fuchs für die entspannte Büroatmosphäre, sowie Kilian Skowranek für seine aufbauenden Anregungen.

Insbesondere möchte ich mich bei Simone Freiding für ihre große Hilfe bei molekular- und mikrobiologischen Fragen und Tätigkeiten bedanken, sowie Amelie Gutsche und den zahlreichen weiteren Mitarbeitern des Lehrstuhls für Technische Mikrobiologie, die mir mit Rat und Tat zur Seite standen.

Dr. Thomas Hoffmann, Ludwig Ring und Simone Freiding danke ich sehr für die gewissenhafte Durchsicht meines Manuskripts.

Da sie diese Arbeit erst möglich machten, gebührt der größte Dank meiner Familie, die immer für mich da war und mich während meiner Ausbildungszeit liebevoll und bedingungslos unterstützt hat.

Hannah, vielen lieben Dank für deine unendliche Geduld, dein Verständnis und deine emotionale Unterstützung.

Die Arbeiten zur vorliegenden Dissertation "Aminosäure- und Peptidstoffwechsel von *Lactobacillus sakei*: Analytische und biochemische Untersuchungen zur Bildung von aromarelevanten Verbindungen" wurden von März 2008 bis Juni 2010 am Fachgebiet Biotechnologie der Naturstoffe (bis März 2010: Biomolekulare Lebensmitteltechnologie) und von Juli 2010 bis Dezember 2010 am Lehrstuhl für Technische Mikrobiologie der Technischen Universität München durchgeführt.

Diese Arbeit entstand im Rahmen eines durch das Bundesministerium für Wirtschaft und Technologie und den Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI), vertreten durch die Arbeitsgemeinschaft industrieller Forschungsvereinigungen (AiF), finanzierten Projekts (AiF-FV 15458 N/2).

Vorabveröffentlichungen

Auszüge dieser Dissertation wurden bereits veröffentlicht:

Originalartikel

Sinz, Q., Schwab, W. (2011) Metabolism of amino acids, dipeptides and tetrapeptides by *Lactobacillus sakei*, *Food Microbiology*, doi:10.1016/j.fm.2011.07.007.

Vortrag

Sinz, Q., Schwab, W. Metabolism of amino acids, dipeptides and tetrapeptides by *Lactobacillus sakei*. 1st International Symposium on Fermented Meats, Freising, 14. April 2011.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	VIII
Zusammenfassung.....	XI
Summary	XIV
1. Einleitung	1
1.1 Rohwurst.....	1
1.1.1 Rezeptur.....	2
1.1.2 Herstellung	3
1.1.3 Reifung.....	4
1.1.4 Starterkulturen.....	5
1.2 Transport und Metabolismus von Aminosäuren in Milchsäurebakterien.....	7
1.3 Aromastoffbildung in Rohwurst	10
1.4 <i>Lactobacillus sakei</i>.....	11
1.5 Enzyme.....	14
1.5.1 Transaminasen.....	14
1.5.2 Lysozym	17
1.5.3 Acylphosphatase	18
1.5.4 Ribosomale Proteine	22
1.5.5 Thioredoxin.....	22
1.5.6 Phosphotransportprotein HPr	23
1.5.7 DNA-bindende HU Proteine.....	23
1.5.8 Kälteschock-Proteine.....	24
1.6 Aufgabenstellung	26
2. Material und Methoden	28
2.1 Material.....	28
2.1.1 Chemikalien.....	28

2.1.2	Peptide	30
2.1.3	Bakterienstämme	30
2.1.4	Vektor	30
2.1.5	Enzyme	31
2.1.6	Primer	31
2.1.7	Kommerzielle Kits	32
2.1.8	Sonstige Materialien	32
2.1.9	Medien, Puffer und sonstige Lösungen	33
2.1.9.1	Medien	33
2.1.9.2	Puffer	34
2.1.9.3	Sonstige Lösungen	35
2.2	Geräte	37
2.2.1	<i>Fast Protein Liquid Chromatographie</i> (FPLC)	37
2.2.2	Flüssigkeitschromatographie-Elektrosprayionisations- Massenspektrometrie (LC-UV/ESI-MS ⁿ)	39
2.2.3	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)	40
2.2.4	Kapillargaschromatographie-Massenspektrometrie (GC/MS)	41
2.2.4.1	GC/MS für die Analyse derivatisierter Aminosäuren	41
2.2.4.2	<i>Solid Phase Microextraction</i> (SPME)-GC/MS für die Analyse flüchtiger Metabolite	42
2.2.5	Sonstige Geräte	43
2.2.6	Software und Internetressourcen	44
2.3	Methoden	45
2.3.1	Grundlegende mikrobiologische Arbeitsmethoden	45
2.3.1.1	Anlegen von Glycerolkulturen	45
2.3.1.2	Messung der optischen Dichte bei 600 nm (OD ₆₀₀)	45
2.3.1.3	Kulturbedingungen	45
2.3.1.4	Bestimmung von Wachstumskurven der Bakterienstämme	46
2.3.2	Grundlegende analytische Arbeitsmethoden	46
2.3.2.1	Messung von flüchtigen Metaboliten	46
2.3.2.2	Quantifizierung von flüchtigen Metaboliten	47
2.3.2.3	Messung der Konzentration an freien Aminosäuren	50

2.3.2.4	Messung der Konzentration an Dipeptiden	52
2.3.2.5	Messung der Konzentration an D-Glucose	53
2.3.2.6	Messung der Konzentration an α -Ketoisocaprinsäure.....	54
2.3.2.7	Messung der Konzentration an L-Glutaminsäure	54
2.3.2.8	Messung der Konzentration an Acetylphosphat	55
2.3.3	Allgemeine molekularbiologische Techniken.....	56
2.3.3.1	Polymerasekettenreaktion (PCR).....	56
2.3.3.2	Agarosegelelektrophorese und Dokumentation	57
2.3.3.3	DNA-Aufreinigung.....	58
2.3.3.4	Restriktionsverdau	58
2.3.3.5	Ligation.....	59
2.3.3.6	Herstellung kompetenter <i>Escherichia coli</i> TOP10 Zellen	59
2.3.3.7	Transformation von <i>Escherichia coli</i> TOP10 Zellen.....	60
2.3.3.8	Kolonie-PCR.....	60
2.3.3.9	Sequenzierung von DNA	60
2.3.4	Durchführung der Aminosäure- und Peptidversuche mit <i>Lactobacillus sakei</i>	60
2.3.4.1	Metabolisierung von Aminosäuren in mMRS-Medium.....	60
2.3.4.2	Metabolisierung von Dipeptiden in mMRS-Medium.....	61
2.3.4.3	<i>Resting Cells</i> (R/C)	63
2.3.4.4	Metabolisierung von Aminosäuren und Dipeptiden durch <i>Resting Cells</i>	64
2.3.4.5	Metabolisierung von Aminosäuren und Tetrapeptiden durch <i>Resting Cells</i>	66
2.3.4.6	Metabolitbildung anderer Starterkulturen aus der Rohwurstreifung.....	67
2.3.4.7	Zusatz von α -Ketosäuren als Substrate	67
2.3.5	Aktivitätsgeleitete Aufreinigung eines Enzyms mit Transaminierungsaktivität aus <i>Lactobacillus sakei</i> TMW 1.1322.....	68
2.3.5.1	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford	68
2.3.5.2	Zellaufschluss von <i>Lactobacillus sakei</i> TMW 1.1322	68
2.3.5.3	Enzymassay zur Überprüfung der Transaminierungsaktivität	69
2.3.5.4	FPLC-Aufreinigung	69
2.3.5.5	Entsalzung und Gefriertrocknung aktiver Fraktionen.....	70
2.3.5.6	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) und Färbung.....	71
2.3.5.7	Sequenzierung von Proteinbanden.....	72

2.3.6	Klonierung, heterologe Expression, Aufreinigung und biochemische Überprüfung einer putativen Acylphosphatase aus <i>Lactobacillus sakei</i> TMW 1.1322 in <i>Escherichia coli</i> TOP10.....	72
2.3.6.1	Klonierung	72
2.3.6.2	Heterologe Expression	73
2.3.6.3	Aufreinigung	73
2.3.6.3.1	Zellaufschluss von <i>Escherichia coli</i> TOP10	73
2.3.6.3.2	His-Tag-Affinitätschromatographie.....	73
2.3.6.3.3	Pufferwechsel, Konzentrierung und SDS-PAGE	74
2.3.6.4	Biochemische Überprüfung.....	74
2.3.6.4.1	Enzymassay zur Überprüfung der Acetylphosphataseaktivität.....	74
2.3.6.4.2	Enzymassay zur Überprüfung der Transaminierungsaktivität	75
3.	Ergebnisse und Diskussion.....	77
3.1	Metabolisierung von Aminosäuren und Peptiden durch <i>Lactobacillus sakei</i>.....	77
3.1.1	Metabolisierung von Aminosäuren in mMRS-Medium.....	77
3.1.1.1	Aminosäurekonzentrationen	77
3.1.1.2	Konzentration an flüchtigen Metaboliten	78
3.1.1.3	Zellzahl	81
3.1.2	Metabolisierung von Dipeptiden in mMRS-Medium.....	81
3.1.2.1	Aminosäure- bzw. Dipeptidkonzentrationen.....	82
3.1.2.2	Konzentration an flüchtigen Metaboliten	82
3.1.2.3	Zellzahl	84
3.1.3	Metabolisierung von Aminosäuren und Peptiden durch <i>Resting Cells</i>	85
3.1.3.1	Vorversuche mit <i>Resting Cells</i>	85
3.1.3.2	Wachstumskurven der Bakterienstämme.....	88
3.1.3.3	Metabolisierung von Aminosäuren und Dipeptiden durch <i>Resting Cells</i>	89
3.1.3.3.1	Aminosäure- bzw. Dipeptidkonzentrationen.....	89
3.1.3.3.2	Glucosekonzentrationen	91
3.1.3.3.3	Konzentration an flüchtigen Metaboliten	93

3.1.3.4	Metabolisierung von Aminosäuren und Tetrapeptiden durch <i>Resting Cells</i>	98
3.1.3.4.1	Aminosäure- bzw. Tetrapeptidkonzentrationen	98
3.1.3.4.2	Glucosekonzentrationen	100
3.1.3.4.3	Konzentration an flüchtigen Metaboliten	101
3.1.3.5	Metabolisierung von Aminosäuren und α -Ketosäuren durch <i>Resting Cells</i> ..	105
3.1.4	Zusammenfassung und Diskussion	107
3.1.5	Schlussfolgerung	116
3.2	Aktivitätsgeleitete Aufreinigung eines Enzyms mit Transaminierungsaktivität aus <i>Lactobacillus sakei</i> TMW 1.1322.....	117
3.2.1	Ionenaustauschchromatographie.....	117
3.2.2	Gelfiltration	119
3.2.3	Entsalzung, Gefriertrocknung und SDS-PAGE	122
3.2.4	Sequenzierung der Proteinbande	125
3.2.5	Lysozym	127
3.2.6	Diskussion	130
3.3	Klonierung, heterologe Expression und biochemische Überprüfung einer putativen Acylphosphatase aus <i>Lactobacillus sakei</i> TMW 1.1322 in <i>Escherichia coli</i> TOP10.....	133
3.3.1	Klonierung	133
3.3.2	Heterologe Expression und Aufreinigung.....	134
3.3.3	Biochemische Überprüfung.....	136
3.3.4	Diskussion	140
4.	Literatur	144
5.	Anhang	155

Abkürzungsverzeichnis

A	Fläche
Abs	Absorption
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
AraT	<i>aromatic amino acid transferase</i> aromatische Aminotransferase
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BcaT	<i>branched-chain amino acid transferase</i> verzweigt-kettige Aminotransferase
bidest. Wasser	bidestilliertes Wasser
bp	Basenpaar(e)
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i> Rinderserumalbumin
BW	Blindwert
c	Konzentration
c (rel)	Relative Konzentration
CAR	<i>Carboxen</i>
d	<i>days</i> Tage
DAD	<i>Diode Array Detector</i> Diodenarray Detektor
dNTP	Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat
ERG	Eppendorf® Reaktionsgefäß (Eppendorf AG, Hamburg)
FD	Filmdicke
FPLC	<i>Fast Protein Liquid Chromatography</i>
GC	(Kapillar-) Gaschromatographie
GC-MS	(Kapillar-) Gaschromatographie-Massenspektrometrie
GdL	Glucono- δ -lacton
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
ID	Innendurchmesser
IEC	<i>Ion Exchange Chromatography</i> Ionenaustauschchromatographie
IMAC	<i>immobilized metal ion affinity chromatography</i> Immobilisierte Metallionen Affinitätschromatographie

INT	Iodnitrotetrazoliumchlorid
IS	Interner Standard
kb	Kilobasenpaar(e)
KIC	α -Ketoisocaprinsäure
KIV	α -Ketoisovaleriansäure
KMBA	α -Keto- γ -(methylthio)buttersäure
KMV	α -Keto- β -methylvaleriansäure
K_M	Michaeliskonstante
LAB	<i>lactic acid bacteria</i> Milchsäurebakterien
LC-UV/ESI-MS ⁿ	Flüssigkeitschromatographie-Elektrosprayionisations- Massenspektrometrie
LB	Luria-Bertani
mMRS	modifiziertes MRS-Medium
MRS	De Man Rogosa Sharpe
MSD	<i>Mass Selective Detector</i>
NAD(P)	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid(-Phosphat)
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei 600 nm
PLP	Pyridoxal-5'-phosphat
PPA	Phenylpyruvat
PTS	Phosphotransportsystem
rpm	<i>rounds per minute</i> Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDMS	<i>Polydimethylsiloxane</i>
RE	Rohproteinextrakt
R/C	<i>Resting Cells</i>
RRF	Relativer Responsefaktor
RSD	Relative Standardabweichung
S	Svedberg-Einheit
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	<i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i> Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SPME	<i>Solid Phase Microextraction</i> Festphasenmikroextraktion

SPME-GC/MS	(Kapillar-) Gaschromatographie-Massenspektrometrie Probenahme: <i>Solid Phase Microextraction</i>
Std	Kalibrierstandard
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

Tabelle 1: Ein- und Dreibuchstabencodes der Aminosäuren

Aminosäure	Dreibuchstabencode	Einbuchstabencode
Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Asparaginsäure	Asp	D
Cystein	Cys	C
Glutamin	Gln	Q
Glutaminsäure	Glu	E
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V

Zusammenfassung

Mikroorganismen spielen bei der Rohwurstreifung eine wichtige Rolle. Sie beeinflussen durch ihren Stoffwechsel die Qualität (Bildung von Aromastoffen und Farbstabilisierung) und die Sicherheit (Säuerung und Konservierung) des Produktes. *Lactobacillus sakei* ist eine der am häufigsten vorkommende Laktobazillenspezies in spontan fermentierten Rohwurstprodukten. Aufgrund seiner evolutionären Anpassung an den Lebensraum Fleisch und durch die Absenkung des pH-Wertes wird die Dominanz der Starterkultur während der gesamten Reifung gewährleistet.

Der Geschmack von Rohwürsten rührt von den eingesetzten Zutaten (Fleisch, Gewürze und Rauch) und den chemischen Veränderungen während der Fermentation her. Während der Reifung kommt es zur fermentativen Aromabildung durch Bakterien und fleischeigene Enzyme, die für eine Metabolisierung von Fett, Kohlenhydraten und Proteinen verantwortlich sind und so ein breites Spektrum an flüchtigen und nicht flüchtigen Verbindungen bilden. Hinsichtlich der Bildung aromarelevanter Stoffe ist der Metabolismus von Peptiden und Aminosäuren durch die Starterkulturen von besonderer Bedeutung. Der größte Teil der Aminosäuren in Fleisch liegt in Proteinen gebunden vor. Bei der Verarbeitung werden diese durch die Peptidasen der Rohstoffe und extrazelluläre Hydrolasen der Mikroorganismen in Peptide und Aminosäuren gespalten und nachfolgend in die Zellen transportiert. In die Milchsäurebakterienzelle transportierte oder intrazellulär durch Peptidasen gewonnene freie Aminosäuren können, neben anderen Stoffwechselwegen, durch Transaminierung und Decarboxylierung in verschiedene flüchtige Verbindungen umgewandelt werden. Es kommt zur Bildung von Aldehyden, Alkoholen und Carbonsäuren die am spezifischen Aroma dieser Produkte teilhaben.

Es ist bekannt, dass es bei Stämmen von *L. sakei* große Unterschiede in der Genomgröße gibt, die nahe legen, dass das metabolische Potenzial dieser Stämme ebenso unterschiedlich sein kann. Auch wurde in mehreren Studien die phänotypische Heterogenität von *L. sakei*-Stämmen nachgewiesen. Aus diesem Grund wurde das metabolische Potential verschiedener *L. sakei*-Stämme im Hinblick auf den Aminosäurestoffwechsel verglichen. Mehrere Studien mit Milchsäurebakterien zeigten eine bevorzugte Aufnahme von Peptiden, ein damit verbundenes besseres Wachstum der Mikroorganismen und eine wirksamere Metabolitbildung im Vergleich zu freien Aminosäuren. Zur Charakterisierung des Aminosäurestoffwechsels und daraus entstehender qualitätsbestimmender Leitsubstanzen wurden daher Studien mit

Peptidzusätzen durchgeführt. Ziel dieser Versuche war es, die physiologische Fähigkeit der *L. sakei*-Stämme, Peptide aufzunehmen und zu metabolisieren zu überprüfen und Unterschiede im Ausmaß der Metabolisierung im Vergleich zu freien Aminosäuren und aufgrund der Stellung der Aminosäuren innerhalb der Peptide zu messen. Hierfür wurden Modellfermentationen mit *Resting Cells* unterschiedlicher *L. sakei*-Stämme durchgeführt, in denen ein definierter Substratüberschuss, bestehend aus äquimolaren Mengen freier Aminosäuren oder Peptide, herrschte. Durch Messung der Abnahme der Substratkonzentrationen durch LC-UV/ESI-MSⁿ und GC/MS bzw. der Zunahme an deren komplementären flüchtigen Metaboliten durch SPME-GC/MS, sollten die Metabolisierung der Substrate beobachtet und Unterschiede zwischen den *L. sakei*-Stämmen sichtbar gemacht, sowie eine Bevorzugung der zellulären Transportsysteme hinsichtlich der Stellung der Aminosäuren innerhalb der Peptide erkannt werden.

Durch den Vergleich von drei Stämmen *L. sakei* konnten substratspezifische Differenzen bezüglich des Ausmaßes der Metabolitbildung aus Aminosäuresubstraten festgestellt werden. Die Gegenüberstellung der gemessenen Konzentrationen an flüchtigen Substanzen mit den im gleichen System ermittelten Werten für einen weiteren Mikroorganismus aus der Rohwurstherstellung (*Staphylococcus carnosus*) zeigten aber auch, dass das metabolische Potential von *L. sakei* in Bezug auf die Bildung der aromarelevanten Metabolite als gering einzustufen ist. Da Milchsäurebakterien jedoch hohe Zellzahlen am Ende der Reifung von Rohwürsten erreichen, sollte ihr Einfluss auf das Aroma dieser Produkte nicht unterschätzt werden. Die Ergebnisse zeigten, dass Peptide und Aminosäuren in der *L. sakei*-Zelle unterschiedlich metabolisiert werden. Während Dipeptide besser von den Bakterien aufgenommen wurden, konnten größere Mengen an flüchtigen, aromarelevanten Metaboliten aus den Aminosäuren gemessen werden. Es wird angenommen, dass ein Teil der Peptide für die Bildung von Proteinen verwendet wird. Außerdem wurden strukturisomere Peptide unterschiedlich metabolisiert, was die Spezifität und Komplexität der Transport- und peptidolytischen Systeme dieser Mikroorganismen zeigt.

Der erste Schritt des intrazellulären Aminosäureabbaus hin zu den flüchtigen, aromarelevanten Metaboliten in Milchsäurebakterien ist eine enzymatische Transaminierung, wobei α -Ketosäuren gebildet werden. Bei der Untersuchung des genetischen Potentials von über 50 Stämmen *L. sakei* konnte in keinem Stamm eine Gensequenz für in Milchsäurebakterien bekannte Transaminasen mit einer Spezifität für verzweigt-kettige bzw. aromatische Aminosäuren (*araT* und *bcaT*) gefunden werden. Die Transaminierungsaktivität eines Stammes (*L. sakei* 23K) konnte jedoch durch Einsatz

radioaktiv markierter Substrate nachgewiesen werden. Auch durch die in dieser Arbeit beschriebenen Versuche zur Metabolisierung von Aminosäuren und Peptiden durch *L. sakei* konnte eine Metabolisierung der Aminosäuresubstrate gezeigt werden. Das für den ersten Metabolisierungsschritt und somit für die Bildung der flüchtigen Metabolite aus Aminosäuren verantwortliche Enzym ist jedoch unbekannt. Aus diesem Grund wurde die aktivitätsgeleitete Aufreinigung eines Enzyms mit Transaminierungsaktivität aus *L. sakei* 23K durchgeführt. Durch Ionenaustauschchromatographie und Gelfiltration konnte ein Protein identifiziert werden, das für die Transaminierungsaktivität dieses Stammes verantwortlich gemacht wurde. Die anschließend durchgeführte Sequenzierung ergab die Aminosäuresequenz einer putativen Acylphosphatase.

Um die Transaminierungsaktivität des aufgereinigten Proteins zu bestätigen, wurde die Klonierung des Proteins im Wirt *Escherichia coli* TOP10 durchgeführt. Das rekombinante Protein konnte affinitätschromatographisch aufgereinigt werden. Mit dem annähernd rein vorliegenden Enzym wurden anschließend biochemische Untersuchungen durchgeführt. Ein Assay zur Überprüfung der Acylphosphataseaktivität zeigte, dass das rekombinante Enzym in aktiver Form vorlag und die postulierte Aktivität besaß. Außerdem konnte die vermutete Transaminierungsaktivität nachgewiesen werden. Somit wurde ein Enzym identifiziert, das an der Transaminierung von Aminosäuren im Metabolismus von *L. sakei* beteiligt sein kann. Das Ergebnis liefert einen bedeutenden Beitrag zum Verständnis der intrazellulären Stoffwechselwege von Aminosäuren in *L. sakei*.

Summary

Microorganisms play an important role in the ripening process of dry fermented sausages. They contribute to the quality (formation of aroma compounds and color stability) and the safety (acidification and conservation) of the product by their catabolism. *Lactobacillus sakei* is one of the dominating lactic acid bacteria (LAB) on dry spontaneously fermented sausages. Due to its evolutionary adaptation to the meat environment and by lowering the pH value it ensures the dominance of the starter during the whole ripening process.

The flavor of fermented sausages derives from the ingredients (meat, spices and smoke) and the chemical changes occurring during the fermentation and drying process. During the ripening process, fermentative flavor formation occurs caused by bacterial ferments and by the meat enzymes which are responsible for the metabolism of fats, carbohydrates and proteins, forming a wide range of volatile and nonvolatile compounds. Regarding the formation of aroma-relevant substances, the catabolism of peptides and amino acids by the starter cultures is of particular importance. Most of the amino acids in meat are bound in proteins. While processing, they are cleaved into peptides and amino acids by the peptidases of raw materials and extracellular hydrolases of microorganisms and subsequently transported into the cells. Free amino acids transported into the LAB cell or released intracellularly by peptidase activity can be converted, among other metabolic pathways, to various volatile compounds by transamination and decarboxylation, resulting in the formation of aldehydes, alcohols and carboxylic acids, which participate in the specific aroma of these products.

It is well known, that the intraspecies diversity in genome size among *L. sakei* strains is quite high. Furthermore, in many studies wide phenotypic heterogeneity within strains of *L. sakei* has been reported. This suggests that the metabolic potential of these strains can be as diverse. For this reason, the metabolic capacity of different *L. sakei* strains regarding the catabolism of amino acids was compared. Several studies with LAB showed a preferential uptake of peptides, an associated better growth of the microorganisms and a more efficient conversion into metabolites compared to free amino acids. To characterize the amino acid metabolism and resulting compounds, studies with the addition of peptides were performed. The aim of these experiments was to investigate the physiological ability of the *L. sakei* strains to transport and metabolize peptides and to measure differences in the extent substrates were converted to volatile compounds and due to the position of the amino acids within the peptides. Therefore, model fermentations with whole resting cells of different *L. sakei* strains with defined substrate additions consisting of equimolar amounts

of free amino acids or peptides were performed. By measuring the decrease of substrate concentration by LC-UV/ESI-MSⁿ and GC/MS analysis and the increase of their corresponding volatile metabolites by SPME-GC/MS analysis, the degradation of substrates and differences among the *L. sakei* strains should be shown. Furthermore, preferences of the cellular transport systems concerning the position of the amino acids within the peptides should be identified.

By comparing three strains of *L. sakei*, some substrate-specific differences respecting the extent of metabolite formation from amino acids were observed. The comparison of the measured concentrations of volatile substances with the values determined for a strain of *Staphylococcus carnosus* in the same system also showed that the metabolic potential of *L. sakei* concerning the formation of aroma-relevant metabolites has to be classified as low. However, since LAB reach high bacteria counts at the end of the ripening period of dry fermented sausages, their effects on the overall flavor of dry fermented sausages should not be underestimated. The results showed that peptides and amino acids are catabolized differently within *L. sakei* cells. While dipeptides were more efficiently taken up by the bacteria than amino acids, higher levels of volatiles were produced from amino acids. It is assumed that a portion of the peptides is used for the formation of proteins. In case of *L. sakei* free amino acid substrates yielded the highest amounts of aroma active metabolites. Furthermore, structural isomers of peptides were metabolized differently, demonstrating the specificity and complexity of the transport and peptidolytic systems of these microorganisms.

An enzymatic transamination leading to the formation of the corresponding α -keto acids describes the first step of the intracellular amino acid catabolism to the volatile, aroma-relevant metabolites in LAB. Although the specific genes coding typical transaminases with a specificity for branched-chain and aromatic amino acids in LAB (*araT* und *bcaT*) could not be found in the genome sequences of more than 50 *L. sakei* strains, the transamination activity of one strain (*L. sakei* 23K) was verified by applying radioactively labeled substrates. The experiments investigating the metabolism of amino acids and peptides by *L. sakei* described in this work also showed the degradation of the amino acid substrates. However, the enzyme responsible for the first metabolization step and therefore for the formation of volatile metabolites from amino acids, remains unknown. For this reason an enzyme with transamination activity has been purified from *L. sakei* 23K. By ion-exchange chromatography and gel filtration a protein was identified, which was held responsible for the transamination activity of this strain. Sequencing revealed the amino acid sequence of a putative acylphosphatase.

To verify the transamination activity of the purified protein, the corresponding gene sequence was cloned into the host *Escherichia coli* TOP10. The recombinant protein could be purified by immobilized metal ion-affinity chromatography and investigated in biochemical studies. An assay to verify the acylphosphatase activity showed the postulated activity of the recombinant enzyme. Furthermore, the presumed transamination activity could be proofed. Hence, an enzyme that can be involved in the transamination of amino acids in the metabolism of *L. sakei* was identified. The result is important for understanding the intracellular pathways of amino acids in *L. sakei*.

1. Einleitung

Viele bekannte Lebensmittel und Getränke werden mit Hilfe von Mikroorganismen hergestellt oder in ihrer Qualität verändert. Während pflanzliche Produkte vorwiegend spontan durch die pflanzeigene Flora fermentiert werden, werden tierische Fermentationsprodukte fast ausschließlich mit Hilfe zugesetzter Starterkulturen hergestellt. Milchsäurebakterien sind z.B. maßgeblich an der Herstellung von Sauergemüse, Sauerteig, Fleisch- und Milcherzeugnissen beteiligt (Krämer, 2002).

Aminosäuren, Peptide und Proteine sind wichtige Bestandteile von Lebensmitteln. Sie liefern die für die Proteinbiosynthese notwendigen Bausteine. Andererseits tragen Aminosäuren und Peptide direkt zum Geschmack von Lebensmitteln bei und sind auch Vorläufer für Aromastoffe und Farbstoffe, die über thermische und/oder enzymatische Reaktionen bei der Gewinnung, Verarbeitung und Lagerung von Lebensmitteln gebildet werden (Belitz et al., 2001). Vor allem in fermentierten Lebensmitteln wie z.B. Rohwurst, Käse, Sauerteig und traditionellen japanischen Produkten wie Sake und Sojasauce kommt es häufig zu einem enzymatischen Abbau der Aminosäuresubstrate, was zur Bildung geschmacksaktiver Metabolite führen kann (Ordóñez et al., 1999; Savijoki et al., 2006; Vermeulen et al., 2005). Von sichtbarem Fett und Knochen befreites mageres Fleisch besitzt einen Proteinanteil von etwa 20 % (Krämer, 2002). Somit sind auch Fleischprodukte mit einem hohen Muskelanteil zu den proteinreichen Lebensmitteln zu zählen.

1.1 Rohwurst

Rohwürste sind in der Regel umgerötete, ungekühlt (über +10 °C) lagerfähige, in der Regel roh zum Verzehr gelangende Wurstwaren, die streichfähig oder nach einer mit Austrocknung verbundenen Reifung schnittfest geworden sind. (Leitsätze für Fleisch und Fleischerzeugnisse, 2010). In Abhängigkeit von der Konsistenz unterscheidet man schnittfeste Rohwürste (u.a. Salami, Plockwurst, Landjäger), bei denen das im Laufe der Reifung ausgetretene Muskeleiweiß die Fleisch- und Fettgewebspartikel im Gelzustand miteinander verbindet und streichfähige Rohwürste (u.a. Teewurst, Mettwurst), bei denen das aus zerkleinertem Fettgewebe freigesetzte Fett die Fleischteilchen umhüllt und aneinander gleiten lässt (Krämer, 2002; Leistner, 1986).

1.1.1 Rezeptur

Rohwürste bestehen aus zerkleinertem rohem Muskelfleisch, Fettgewebe, Gewürzen, Starterkulturen, Zucker und Kochsalz bzw. Nitritpökelsalz. Die daraus hergestellte Mischung wird in Wursthüllen abgefüllt und erlangt durch Trocknen und Räuchern ihre Genussreife. Schnittfeste Rohwürste werden erst nach mehrwöchiger Reifung und Lagerung handelsfähig (Leistner, 1986).

Die typische Zusammensetzung der Zutaten einer in Deutschland hergestellten Rohwurst ist in Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 2: Zusammensetzung der Zutaten einer in Deutschland hergestellten Rohwurst (Kurt Hermann, FG Technologie funktioneller Lebensmittel, Universität Hohenheim).

Zutat	Anteil
Schweinefleisch (mager, ohne Sehnen)	44 %
Rindfleisch (mager, ohne Sehnen)	29 %
Schweinerückenspeck	24 %
Nitritpökelsalz	2,8 %
D-Glucose (Dextrose)	0,3 %
Pfeffer und andere Gewürze	0,1 %
Natriumascorbat	0,05 %
Starterkulturen	10 ⁹ Zellen/kg

Nitritpökelsalz stellt einen wichtigen Zusatz dar, da es für die Stabilisierung der Fleischfarbe während der Umrötung verantwortlich ist. Es besteht aus Kochsalz und 0,5 bis 0,6 % Natriumnitrit. Kalium- oder Natriumnitrat können auch eingesetzt werden. Bei ihrer Verwendung muss das Nitrat jedoch erst durch bakterielle Reduktion in Nitrit umgewandelt werden. Des Weiteren ist Nitrit zu Beginn der Reifung für die mikrobiologische Stabilität wichtig. Es hemmt das Wachstum von gramnegativen Bakterien, z.B. Salmonellen. Auch das im Pökelsalz enthaltene Kochsalz hat einen Einfluss auf die Rohwurstqualität und verbessert in erster Linie den Geschmack (Leistner, 1986; Niinivaara und Pohja, 1957).

Zucker werden als zusätzliche Energiequelle der Mikroorganismen, neben fleischeigenem Glykogen, zugesetzt. In der Praxis werden vor allem Glucose, Saccharose, Laktose, Maltose und Trockenstärkesirup in einer Menge von nicht mehr als 2 % eingesetzt (Coretti, 1974, Leitsätze für Fleisch und Fleischerzeugnisse, 2010).

Gewürze wie Pfeffer, Kardamom oder Knoblauch sind eine in regional unterschiedlichen Mischungen verwendete Zutat von Rohwürsten. Ihre flüchtigen Verbindungen tragen zur Geschmacksverfeinerung bei (Mateo und Zumalacárregui, 1996). Besonders in hohen Mengen eingesetzt hemmt Knoblauch zudem unerwünschte Bakterien (Söllner, 2007).

1.1.2 Herstellung

Abbildung 1 zeigt den schematischen Ablauf der Rohwurstherstellung.

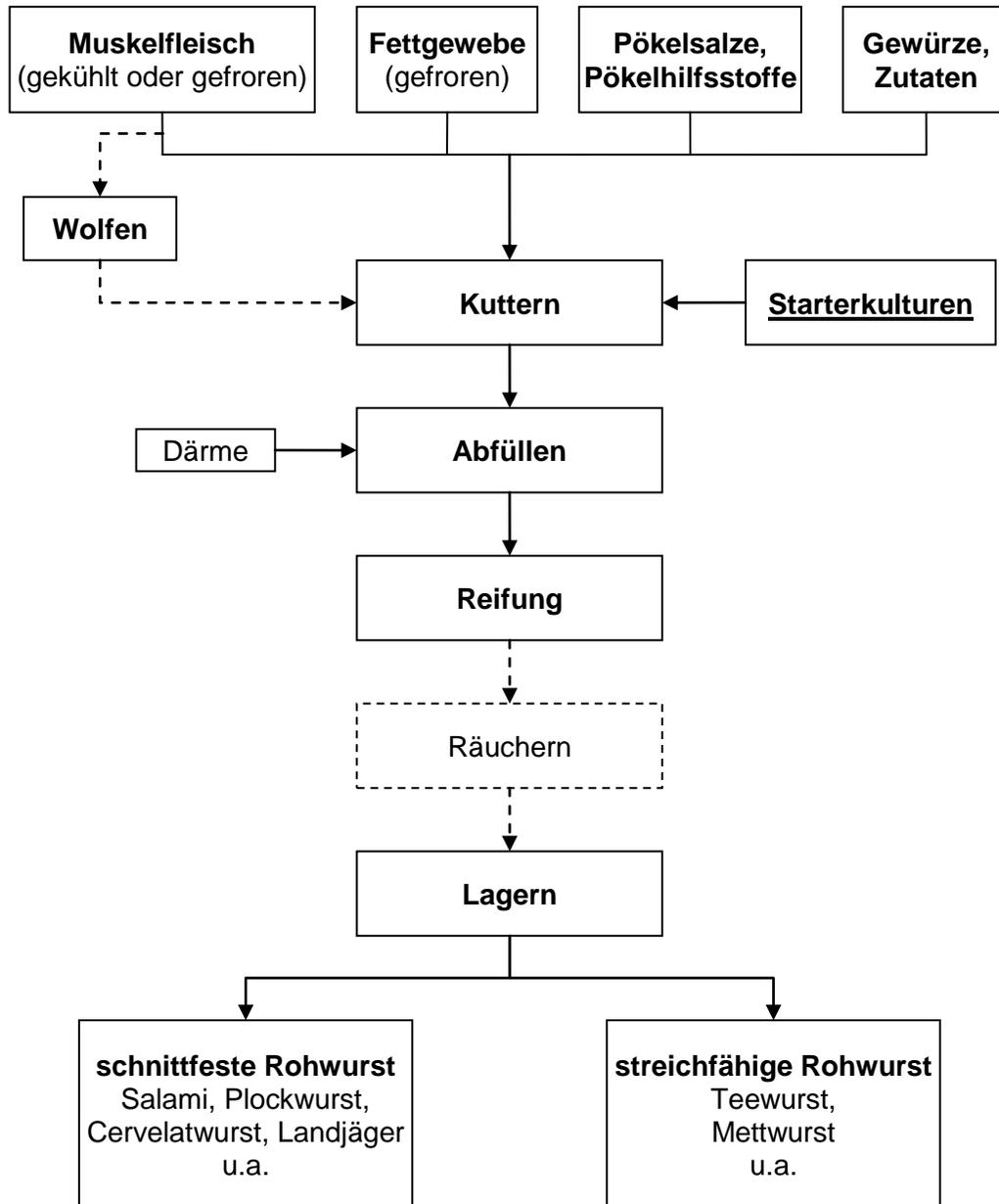


Abbildung 1: Allgemeines Herstellungsschema für Rohwurst (Belitz et al., 2001; Krämer, 2002).

Die Zerkleinerung des Rohmaterials kann im Kutter oder Wolf vorgenommen werden. Der in der Regel verwendete Kutter ermöglicht eine sehr feine Zerkleinerung von gefrorenem bzw. gekühltem Fleisch und Fettgewebe ohne Schmierbildung und zudem ein gründliches Vermischen mit den stufenweise zugegebenen Zutaten und Zusatzstoffen. Das nach dem Zerkleinern und Mischen erhaltene, homogene Rohwurstbrät wird je nach Wursttyp in wasserdampfdurchlässige Kunstdärme (z.B. Faserdärme) oder Naturdärme (z.B. Pferdedärme für die original Mailänder Salami) abgefüllt (Söllner, 2007).

1.1.3 Reifung

Während der Reifung kommt es zu wichtigen chemischen, physikalischen und mikrobiologischen Veränderungen des Rohwurstbräts. Das Zusammenwirken von Kochsalz, Nitrit, Pökelformen, fleischeigenen Enzymen und der Pökelflora führt zur Konservierung, Stabilisierung der Fleischfarbe (Umrötung), Säuerung, Entwicklung typischer Aromen und Beeinflussung der Fleischbrätbeschaffenheit (Krämer, 2002).

Bei der Umrötung des Fleisches oxidiert das zugesetzte Nitrit zunächst den Fleischfarbstoff Myoglobin zu Metmyoglobin. Myoglobin besitzt eine purpurrote Farbe, Metmyoglobin ist braun. Das entstehende Stickstoffmonoxid liefert sowohl mit Myoglobin, wie auch mit Metmyoglobin Komplexe von leuchtend roter Farbe. Reduktionsmittel wie Natriumascorbat beschleunigen diesen Vorgang durch Reduktion von Nitrit zu Stickstoffmonoxid und Metmyoglobin zu Myoglobin (Belitz et al., 2001).

Die Säuerung wird vor allem durch die Milchsäurebakterien-vermittelte Milchsäurebildung aus Kohlenhydraten erreicht. Der Zusatz von Zucker oder Glucono- δ -lacton (GdL) zum Brät beschleunigt die Säuerung. GdL hydrolysiert im Brät zur Gluconsäure und senkt damit den pH-Wert auf etwa 5,6 ab. Bei einem Absinken des pH-Wertes auf 5,3 (isoelektrischer Punkt des Fleisches) bildet das Muskeleiweiß ein Gel, das wie ein Netzwerk die Speck- und Fleischteile verbindet. Mit fortschreitender Reifung verliert die Wurst immer mehr an Wasser und wird schnittfest. Die Absenkung des pH-Wertes darf nicht zu schnell erfolgen, da unter pH 5,4 zahlreiche säureempfindliche Mikroorganismen in ihrer Aktivität gehemmt werden, die maßgeblich an der Ausbildung der Farbe, des Aromas und des Geschmacks der Rohwurst beteiligt sind (Krämer, 2002; Pyrcz und Pezacki, 1981).

Zugesetztes Kochsalz entzieht dem Fleisch Wasser und begünstigt hierdurch die Vernetzung der gelösten Fleischproteine und somit letztlich die Schnittfestigkeit der Rohwurst. Dabei werden die an der Grenzfläche zwischen Speck- und Fleischteilchen

liegenden Muskelproteine Myosin und Actin durch das zugegebene Salz herausgelöst und durch Absinken des pH-Wertes der Gelzustand erreicht. Dadurch werden die einzelnen Wurstteilchen verbunden, und die Wurst wird schnittfest. Außerdem kommt es in Verbindung mit der Abtrocknung der Würste zur Absenkung die Wasseraktivität und verbessert somit die mikrobielle Stabilität der Rohwurst (Coretti, 1974; Pfeil und Liepe, 1974).

Die kurze Räucherung in der Anfangsphase der Wurstreifung soll vor allem die Farbe und das Aroma günstig beeinflussen und das Wachstum der Schimmelpilze auf der Oberfläche hemmen. Schimmelpilzgereifte Rohwürste werden nicht (Mailänder Salami) oder nur leicht geräuchert (Ungarische Salami) (Krämer, 2002).

1.1.4 Starterkulturen

Die Fermentation ist eine traditionelle Methode für die Haltbarmachung von Fleischwaren, ihre Anwendung kann bis in die Zeiten Babyloniens zurückgeführt werden. Fermentierte Würste wurden schon von den antiken Römern und Griechen hergestellt, bevor sich im Mittelalter ihre Produktion und ihr Konsum über ganz Europa ausbreiteten. Die Herstellungsbedingungen wurden an die Umwelteinflüsse angepasst, so dass die Reifung in mediterranen Gegenden angewandt wurde, während in Nordeuropa hauptsächlich die Räucherung zum Einsatz kam. Heutzutage stellen fermentierte Fleischerzeugnisse den Hauptteil der in der westlichen Welt konsumierten fermentierten Lebensmittel dar (Flores und Toldrá, 2011; Hammes et al., 1990).

Traditionell werden Rohwürste ohne den Zusatz von Starterkulturen hergestellt. Dementsprechend beruhen die Fermentationsprozesse in traditionellen Rohwürsten auf der endogenen Bakterienflora der verwendeten Zutaten. Hier zeigen sich vor allem zwei Gruppen von Mikroorganismen: Milchsäurebakterien und grampositive, Katalase-positive Kokken. Weitere Mikroorganismen, Hefen und Schimmelpilze sind an der spontanen Fleischfermentation auch beteiligt, spielen jedoch eine untergeordnete Rolle. *Lactobacillus sakei* gehört zu den am häufigsten in spontan fermentierten Rohwürsten beschriebenen Milchsäurebakterien (Aymerich et al., 2003). Dominierende Stämme wurden deshalb isoliert und teilweise in Starterkulturen für die Herstellung von Rohwürsten verwendet, um eine optimale Fermentation und die Reproduzierbarkeit des Produkts zu gewährleisten (Hammes und Hertel, 1998; Leroy et al., 2006). Starterkulturen für Rohwürste sind somit Präparate, die aktive oder ruhende Mikroorganismen enthalten, welche im Produkt die gewünschte metabolische Aktivität entfalten (Hammes et al., 1990).

Tabelle 3 zeigt die bei der Herstellung von Rohwurst in Starterkulturen am häufigsten verwendeten Mikroorganismen.

Tabelle 3: Wichtige Mikroorganismen in Starterkulturen für die Rohwurstherstellung (Hammes und Hertel, 1998).

Mikroorganismus	Genus	Spezies
Bakterien	<i>Lactobacillus</i>	<i>L. acidophilus</i> , <i>L. alimentarius</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. curvatus</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. pentosus</i> , <i>L. sakei</i>
	<i>Lactococcus</i>	<i>L. lactis</i>
	<i>Pediococcus</i>	<i>P. acidilactici</i> , <i>P. pentosaceus</i>
	<i>Kocuria</i>	<i>K. varians</i>
	<i>Streptomyces</i>	<i>S. griseus</i>
	<i>Staphylococcus</i>	<i>S. xylosus</i> , <i>S. carnosus</i> subsp. <i>carnosus</i> , <i>S. carnosus</i> subsp. <i>utilis</i> , <i>S. pentosaceus</i>
	<i>Micrococcus</i>	<i>M. varians</i>
	Schimmelpilze	<i>Penicillium</i>
Hefen	<i>Debaryomyces</i>	<i>D. hansenii</i>
	<i>Candida</i>	<i>C. famata</i>

Die säuernden homofermentativen und fakultativ heterofermentativen Milchsäurebakterien (*Lactobacillus*-Arten oder milder säuernde *Pediococcus*-Arten) haben sich als Starterkulturen bewährt, vor allem die Spezies *L. sakei* und *L. curvatus*. Sie sind primär für eine Absenkung des pH-Wertes durch Bildung von Milchsäure verantwortlich und bewirken hierdurch eine Konservierung, indem sie das Wachstum von Konkurrenzflora sehr effektiv hemmen. Aber auch eine Festigung des Wurstbräts, die Beschleunigung der Umrötung und die Aromabildung werden hierdurch begünstigt (Hammes et al., 1990; Krämer, 2002; Roig-Sagués und Eerola, 1997).

Die verwendeten Micrococcaceae (*Staphylococcus*-Arten und *Micrococcus varians*) und Kokurien besitzen eine hohe Katalaseaktivität (enzymatische Spaltung von Wasserstoffperoxid) und verhindern hierdurch Geschmacksveränderungen durch mikrobiell gebildetes Wasserstoffperoxid. Des Weiteren reduzieren sie Nitrat, bewirken eine Absenkung des Redoxpotentials im Inneren der Rohwurst und sind am Fettabbau beteiligt. Sie liefern somit das für die Umrötung wichtige Nitrit und wirken bei der Farbstabilisierung mit (Krämer, 2002). Ihr Zusatz dient auch der Sicherstellung der

sensorischen Qualität durch Beeinflussung der Zusammensetzung der flüchtigen Substanzen (Beck et al., 2004; Hugas und Monfort, 1997; Masson et al., 1999; Montel et al., 1998; Talon et al., 2000). Sie sind in frischem Rohwurstbrät kompetitiv, bei Absenkung des pH-Wertes aber nicht mehr vermehrungsfähig und werden deshalb in höheren Konzentrationen zugesetzt (Lücke, 1986).

Streptomyces griseus besitzt eine hohe Proteaseaktivität und wirkt sich somit durch Spaltung von Proteinen und Peptiden auf die Aromastoffbildung aus (Bruna et al., 2002).

Hefen werden ebenfalls für die Stabilisierung der roten Pökelfarbe und die Entwicklung des typischen Aromas verantwortlich gemacht (Krämer, 2002). Sowohl *D. hansenii*, wie auch *C. famata* zeichnen sich durch eine hohe Salztoleranz aus und wachsen aufgrund ihres aeroben bzw. schwach fermentativen Stoffwechsels hauptsächlich an der Oberfläche und in den äußeren Zonen der Wurst (Weber, 2003).

Zur Herstellung von bestimmten Rohwurstsorten (Salami ungarischer oder italienischer Art) wird die Wurst direkt nach dem Füllen in ein Tauchbad mit Sporen eines nicht toxinogenen *Penicillium*-Stammes getaucht. Bei der Reifung entwickelt sich an der Wurstoberfläche ein weißes Schimmelpilzmycel. Hierdurch verdrängen sie unerwünschte Mikroorganismen und Erhöhen dadurch die Sicherheit für den Verbraucher, da bei einer spontanen Verschimmelung die Beteiligung von Mykotoxinbildnern nicht auszuschließen ist (Krämer, 2002). Des Weiteren schützt das Schimmelpilzmycel vor Austrocknung, Sauerstoff und Licht und trägt zu einer gleichmäßigen Trocknung bei (Sunesen und Stahnke, 2004). Durch ihre proteolytische und lipolytische Aktivität beeinflussen Schimmelpilze die Bildung flüchtiger Verbindungen, welche für das Aroma der Produkte verantwortlich sind (Garcia et al., 2001).

1.2 Transport und Metabolismus von Aminosäuren in Milchsäurebakterien

Der größte Teil an Aminosäuren in einem Lebensmittelrohstoff liegt in Proteinen gebunden vor, die bei der Verarbeitung durch die Peptidasen der Rohstoffe und extrazelluläre Peptidasen der Mikroorganismen in Peptide und Aminosäuren gespalten und nachfolgend in die Zellen transportiert werden. Das proteolytische System von Milchsäurebakterien und der Abbau von freien Aminosäuren durch Milchsäurebakterien tragen zur Aromabildung in fermentierten Lebensmitteln wie Rohwurst, Käse, Sauerteig und traditionellen japanischen Produkten wie Sake und Sojasauce bei (Ordóñez et al., 1999; Savijoki et al., 2006; Vermeulen et al., 2005). Da die innere Bakterienflora von fermentierten Fleischprodukten

von Milchsäurebakterien dominiert wird (oft *L. sakei*, *L. curvatus* and *L. plantarum*) und sie Zellzahlen von 10^8 koloniebildende Einheiten pro Gramm am Ende der Reifung erreichen, ist es wahrscheinlich, dass sie an der Entwicklung charakteristischer Aromen beteiligt sind (Montel et al., 1998).

Abbildung 2 zeigt die intrazellulären Stoffwechselwege von Aminosäuren in Milchsäurebakterien.

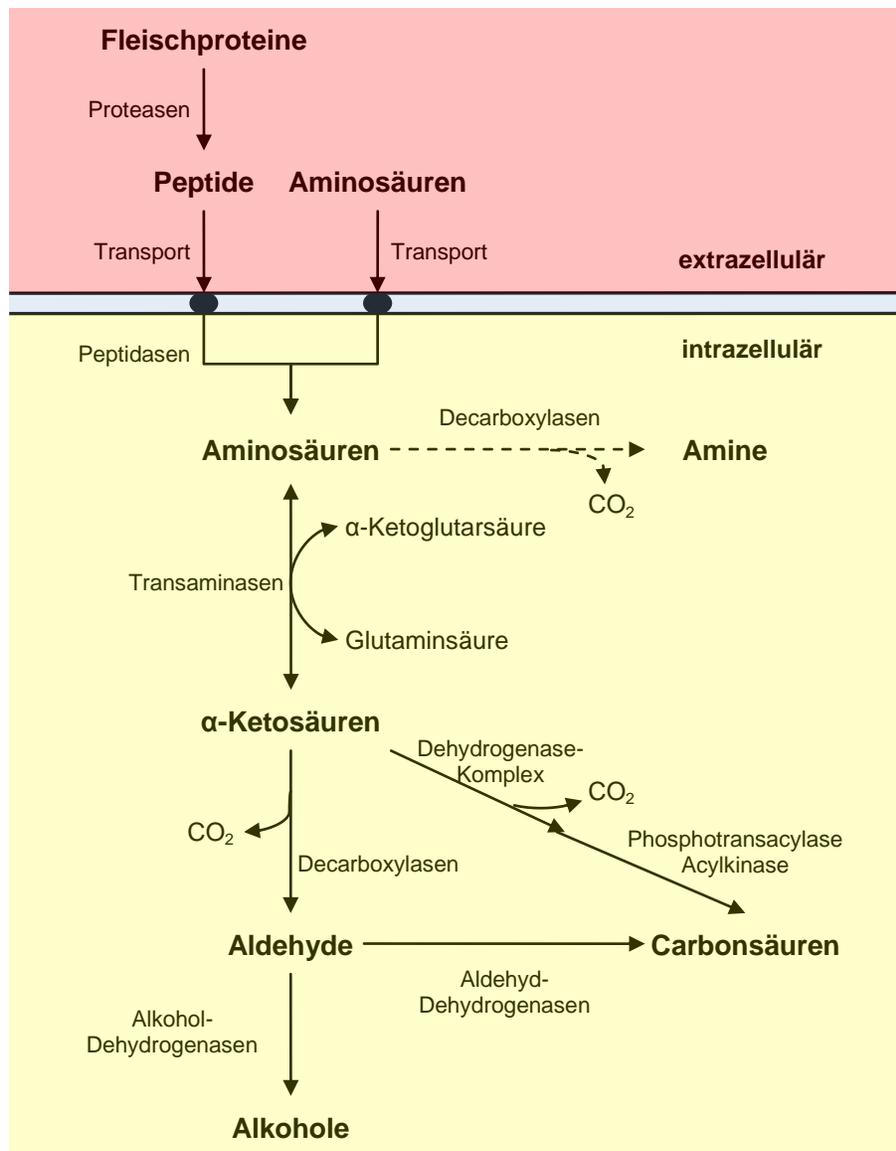


Abbildung 2: Intrazelluläre Stoffwechselwege von Milchsäurebakterien (van Kranenburg et al., 2002; abgeändert).

Wie in Abbildung 2 dargestellt, werden Proteine extrazellulär durch Proteasen zu Peptiden und freien Aminosäuren gespalten. Diese werden anschließend in das Zellinnere

transportiert, bevor sie weiter abgebaut werden. Toldrá et al. (1992) berichten, dass die Aromaentwicklung in getrockneten Schinken mit einem Anstieg der freien Aminosäurekonzentrationen in Verbindung gebracht werden konnte. Die Proteinaseaktivität einiger *L. sakei*-Stämme wurde durch Beobachtung der Hydrolyse von Myofibrillen aus Schweinefleisch verfolgt. Es konnte die Hydrolyse der Proteine durch die Enzyme aus *L. sakei* und muskeleigene Enzyme beobachtet werden. Es kam hierdurch zur Bildung von Peptiden, die für den Geschmack von gepökeltem Fleisch verantwortlich gemacht werden (Sanz et al., 1999). Fadda et al. (1999) beobachteten die Hydrolyse sarkoplasmatischer Proteine aus Schweinemuskel durch *L. sakei*. Hierbei zeigte sich ein Abbau der Proteine zu Peptiden bis hin zu freien Aminosäuren, welche auch in größeren Mengen verstoffwechselt wurden. Verschiedene Peptidasen dieser Spezies wurden aufgereinigt und studiert. Es konnten Aminopeptidasen, Dipeptidasen und Tripeptidasen mit unterschiedlichen Spezifitäten identifiziert werden (Montel et al., 1995; Flores und Toldrá, 2011; Sanz und Toldrá, 1997; Sanz et al., 1998; Sanz und Toldrá, 2001; Sanz und Toldrá, 2002).

In Milchsäurebakterien sind drei Transportsysteme für die Aufnahme von Peptiden in die Zelle bekannt. Ein Opp-System, das Oligopeptide bestehend aus bis zu 35 Aminosäuren transportiert (Doeven et al., 2005), ein Dpp-System (früher DtpP genannt), welches Di-, Tri- und Tetrapeptide mit relativ hydrophoben verzweigt-kettigen Aminosäuren transportieren kann und die höchste Affinität gegenüber Tripeptiden zeigt (Foucaud et al., 1995; Sanz et al., 2003) und ein DtpT-System mit einer Vorliebe für hydrophilere und geladene Di- und Tripeptide (Hagting et al., 1994). Des Weiteren verfügen Milchsäurebakterien über eine wechselnde Anzahl von Aminosäuretransportern (Savijoki et al., 2006).

Mehrere Studien mit Milchsäurebakterien, vor allem aus der Käseherstellung, aber auch aus der Sauerteigfermentation und Orangensaftherstellung zeigten eine bevorzugte Aufnahme von Peptiden, ein damit verbundenes besseres Wachstum der Mikroorganismen und eine wirksamere Metabolitbildung im Vergleich zu freien Aminosäuren (Foucaud et al., 2001; Kunji et al., 1996; Saguir et al., 2008; Smit und Konings, 1990; Vermeulen et al., 2006). Dennoch wurden bei den meisten veröffentlichten Studien zum Aminosäuremetabolismus von Lactobazillen freie Aminosäuren und nicht Peptide als Substrate herangezogen. Die Möglichkeit, den Aminosäureumsatz durch ein optimiertes Angebot an Substraten zu erhöhen, muss noch aufgeklärt werden. Vermeulen et al. (2006) konnten die Metabolisierung von Phenylalanin in *L. plantarum* und *L. sanfranciscensis* durch das Angebot von Peptiden im Vergleich zu freien Aminosäuren

erhöhen. Zur Charakterisierung des Aminosäurestoffwechsels und daraus entstehender qualitätsbestimmender Verbindungen sind daher insbesondere Studien mit Peptidzusätzen sinnvoll.

In die Milchsäurebakterienzelle transportierte oder intrazellulär durch Peptidasen gewonnene freie Aminosäuren können, wie in Abbildung 2 dargestellt, neben anderen Stoffwechselwegen durch Transaminierung und Decarboxylierung in verschiedene flüchtige Verbindungen umgewandelt werden. Es kommt zur Bildung von Aldehyden, Alkoholen und Carbonsäuren (Christensen et al., 1999; van Kranenburg et al., 2002; Ordóñez et al., 1999; Smit et al., 2009). Obwohl die Gensequenzen für die Kodierung typischer Transaminasen in Milchsäurebakterien, die für den ersten Schritt dieses Stoffwechselweges verantwortlich sind (*araT* und *bcaT*), nicht in *L. sakei* 23K und anderen *L. sakei*-Stämmen auffindbar sind (Freiding et al., 2011; Liu et al., 2008), kann die Bildung flüchtiger Metabolite durch diesen Stamm und durch diese Reaktionen nachgewiesen werden (Larrouture et al., 2000).

1.3 Aromastoffbildung in Rohwurst

Der Geschmack von Rohwürsten rührt von den eingesetzten Zutaten (Fleisch, Gewürze und Rauch) und den chemischen Veränderungen während der Fermentation und der Trocknungsphase her. Während der Reifung kommt es zur fermentativen Aromabildung durch Bakterien und fleischeigene Enzyme, die für eine Metabolisierung von Fett, Kohlenhydraten und Proteinen verantwortlich sind und so ein breites Spektrum an flüchtigen und nicht flüchtigen Verbindung bilden (Dainty und Blom, 1995; Ordóñez et al., 1999).

Viele sensorische Eigenschaften von fermentierten Fleischprodukten hängen von der Lipidzusammensetzung des Muskel- und Fettgewebes des verwendeten Fleisches und dessen Abbau durch ein komplexes System an lipolytischen und oxidativen Reaktionen, dem Lipidstoffwechsel, während der Verarbeitung ab. Hierbei kommt es zur Hydrolyse der Triglyceride und zum Abbau bzw. der Oxidation von Fettsäuren durch Hydrolasen, Lipasen, Phospholipasen und Oxidasen, die während des ganzen Herstellungsprozesses aktiv sind. Es kommt zur Bildung einer Vielzahl flüchtiger Verbindungen (Gandemer, 2002).

Essigsäure, die das Aroma von Rohwurst maßgeblich prägt, wird während der Reifung als Nebenprodukt des Kohlenhydratstoffwechsels gebildet. Zwischenstufe ist dabei das durch die Glykolyse aus Glucose oder durch Oxidation aus Lactat entstehende Pyruvat, das über

verschiedene Folgereaktionen abgebaut werden kann (Burns et al., 2010; Söllner und Schieberle, 2009).

Wie in 1.2 beschrieben, führt der Abbau von Aminosäuren in Milchsäurebakterien zur Bildung von flüchtigen Aldehyden, Alkoholen und Carbonsäuren. So führt die Umwandlung der verzweigt-kettigen Aminosäuren Valin, Leucin und Isoleucin, der aromatischen Aminosäuren Tyrosin, Tryptophan und Phenylalanin und der schwefelhaltigen Aminosäuren Methionin und Cystein zu flüchtigen Verbindungen, die zum typischen Aroma von fermentierten Lebensmitteln beitragen (Ardö, 2006; Smit et al., 2005; Smit et al., 2009; Yvon & Rijnen, 2001). Einige dieser flüchtigen Verbindungen konnten in ungarischer Salami als sehr geruchsaktiv identifiziert werden (Söllner und Schieberle, 2009). Unter 45 identifizierten Geruchsstoffen mit einem Aromawert kleiner oder gleich 16 konnten 3-Methylbutanal, 3-Methylbuttersäure, 3-(Methylthio)-propanal (Methional) und Phenylacetaldehyd identifiziert werden, welche aus dem Abbau der Aminosäuren Leucin, Methionin bzw. Phenylalanin resultieren können. Auch die Metabolite 2-Methylpropanal, 2-Methyl-1-propanol und 2-Methylpropansäure aus dem Valin-Abbau, wie auch 3-Methyl-1-butanol aus dem Leucin-Metabolismus konnten in hohen Konzentrationen in Rohwürsten identifiziert werden (Flores et al., 2004; Marco et al., 2008; Partidário et al., 2006). Meynier et al. (1999) zufolge stammen 11,8 % der flüchtigen Verbindungen in Mailänder Salami aus dem Aminosäurestoffwechsel.

1.4 *Lactobacillus sakei*

Lactobacillus sakei wurde 1934 das erste Mal als Verderbsorganismus in dem aus Japan stammenden, fermentierten Getränk Sake beschrieben (Champomier-Vergès et al., 2001) und den Empfehlungen von Trüpler und De' Clari (1997) folgend in *Lactobacillus sakei* umbenannt. Es wurde vielfach aus fermentierten Produkten tierischen und pflanzlichen Ursprungs isoliert. So konnte es in Silage, Sauerkraut, Sauerteig und geräuchertem Fisch gefunden werden. Es kommt jedoch hauptsächlich in Fleischprodukten vor, wo es zusammen mit *L. curvatus* die vorherrschende Spezies darstellt. Aus diesem Grund wird es häufig in Starterkulturen für die Produktion von Rohwürsten verwendet, da es die Dominanz der Starterkultur während der gesamten Reifung gewährleistet (Hammes et al., 1990; Hugas et al., 1993). Die Produktion von Lactat durch dieses fakultativ heterofermentative Milchsäurebakterium führt zur Absenkung des pH-Wertes und trägt hierdurch direkt zur Verbesserung der Lebensmittelsicherheit und der Stabilität des fermentierten Lebensmittels bei, indem es das Wachstum von Konkurrenzflora sehr effektiv hemmt (Hammes et al., 1990; Ross et al., 2002). Es produziert außerdem

verschiedene spezifisch-hemmende Substanzen, einschließlich organischen Säuren, Wasserstoffperoxid, Antibiotika und Bakteriozine (D'Angelis et al., 2009; de Carvalho et al., 2010; Champomier-Vergès et al., 2001; Vaughan et al., 2003).

L. sakei ist ein grampositiver Bazillus, das sich in Paaren oder kurzen Ketten gruppiert (Abbildung 3).

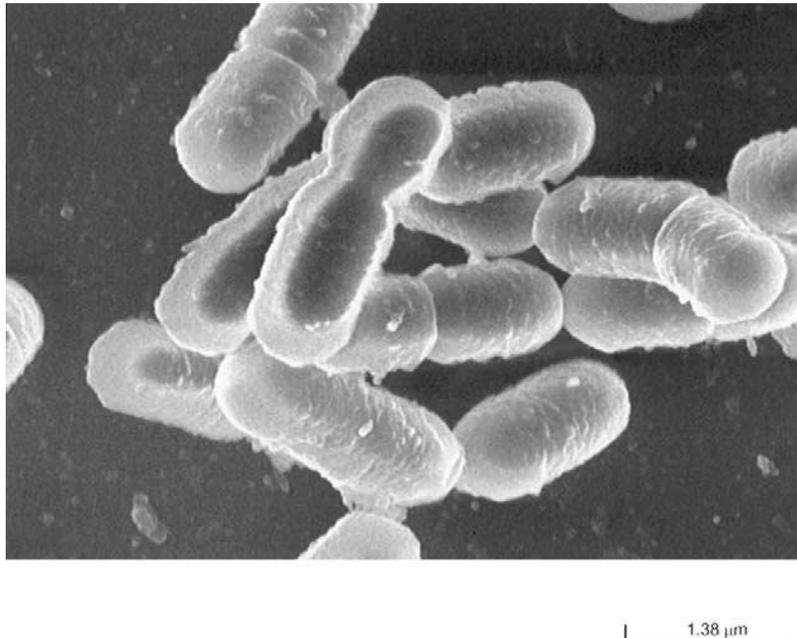


Abbildung 3: Rasterelektronenmikroskopie von *L. sakei* 23K (Champomier-Vergès et al., 2001).

Die phänotypische Unterscheidung zwischen *L. sakei*-Stämmen aufgrund der Konfiguration der produzierten Milchsäure, des Zuckerstoffwechsels und der Ammoniak-Produktion aus Arginin zeigt eine große Heterogenität innerhalb der aus Fleisch isolierten Stämme. In vielen Studien, die auf biochemischen und physiologischen Merkmalen beruhten, konnte dies vor allem anhand des Zuckerstoffwechsels gezeigt werden. Aufgrund der löslichen Proteinfractionen wurde die Spezies in zwei Gruppen aufgeteilt, welche jedoch nicht durch phänotypische Merkmale unterscheidbar sind: *L. sakei* subsp. *sakei* und *L. sakei* subsp. *carnosus*. Da jedoch keine Studie diese Untergruppen mit Eigenschaften, die für die Industrie von Bedeutung wären in Verbindung bringen konnte, wird dieser Unterscheidung im Allgemeinen wenig Beachtung geschenkt (Champomier-Vergès et al., 2001; Klein et al., 1996; Zúñiga et al., 1998).

Wie andere Milchsäurebakterien, benötigt auch *L. sakei* mehrere Nährstoffe. Es ist grundsätzlich auxotroph für die meisten Aminosäuren. Dementsprechend sind

peptidolytische Aktivitäten besonders wichtig für ihr Wachstum. Über die Basen- und Vitaminanforderung ist wenig bekannt, es wird jedoch grundsätzlich angenommen, dass die *L. sakei*-Stämme den meisten dieser Substanzen gegenüber auxotroph sind (Champomier-Vergès et al., 2001).

Hexosen werden in *L. sakei* homofermentativ durch die anaerobe Glykolyse metabolisiert. Die daraus resultierende Milchsäurebildung und damit die Absenkung des pH-Wertes sind von großer Bedeutung für die hygienische Sicherheit und Qualität der fermentierten Produkte (1.1.4). Auch Laktose und Galaktose werden durch *L. sakei* metabolisiert. Ribose, Arabinose und Gluconsäure werden über den Phosphoketolase-Weg abgebaut. Beim Abbau dieser Zucker ist jedoch Thiamin essentiell, da es als Vorstufe für Thiaminpyrophosphat, einem Cofaktor in Phosphoketolase, dient. Genetische Untersuchungen zum Potential des Bakteriums bezüglich des Kohlenhydratmetabolismus wiesen auf eine starke Korrelation des Glucose- und Ribosstoffwechsels in *L. sakei* hin (Champomier-Vergès et al., 2001).

Durch die Sequenzierung des vollständigen Genoms von *L. sakei* 23K (Chaillou et al., 2005), war es möglich das proteolytische System und die Transportsysteme von Milchsäurebakterien zu vergleichen (Freiding et al., 2011; Liu et al., 2008; Liu et al., 2010). Diese Studien zeigten, dass *L. sakei* 23K sowohl ein putatives Transportsystem für Oligopeptide (Puopt), wie auch ein Di-/Tripeptid-ABC-Transportsystem bestehend aus fünf Untereinheiten (DppA/P, DppB, DppC, DppD und DppF) und ein Di-/Tripeptid-*ion-linked*-Transportsystem (DtpT) besitzt. Des Weiteren konnten 18 Peptidasen mit unterschiedlichen Spezifitäten (Aminopeptidasen, Endopeptidasen, Di- und Tripeptidasen und Prolinpeptidasen) erkannt werden. In verschiedenen Arbeiten wurden Peptidasen aus *L. sakei* aufgereinigt und charakterisiert. Es wurden eine Aminopeptidase mit geringer Spezifität (Sanz und Toldrá, 1997), eine Dipeptidase mit breiter Spezifität gegenüber allen Dipeptiden außer welchen mit Pro und Gly am N-Terminus (Montel et al., 1995), eine Tripeptidase die ausschließlich die Hydrolyse von Tripeptiden katalysiert (Sanz et al., 1998), eine X-Proyl-Dipeptidyl-Peptidase die fast ausschließlich X-Pro von N-terminalen Peptidenden abspaltet (Sanz und Toldrá, 2001) und eine Arginin-Aminopeptidase die ausschließlich basische Aminosäuren vom N-terminalen Peptidende hydrolysiert (Sanz und Toldrá, 2002) identifiziert.

Eine Studie, in der die Vielfältigkeit von 73 *L. sakei*-Isolaten durch Pulsed-Field-Gelelektrophorese untersucht wurde, zeigte eine 25 %ige Variation in der Genomgröße, mit Werten zwischen 1.815 kb und 2.310 kb (Chaillou et al., 2009). Sehr geringe

Verwandtschaftsgrade zwischen *L. sakei* -Stämmen konnte auch durch DNA-DNA Rekombination gezeigt werden (Champomier et al., 1987). Dies zeigt, dass die genetische Vielfalt innerhalb der *L. sakei* -Stämme relativ hoch ist und legt nahe, dass das metabolische Potential dieser Stämme ebenso unterschiedlich ist. Metabolische Untersuchungen zur Bildung von 3-Methylbutanal aus Leucin mit zahlreichen *Lactococcus lactis*-Stämmen und auch anderen Mikroorganismen zeigten, dass die Unterschiede innerhalb von Arten deutlich größer sind als bisher vermutet und sogar größer sein können als die Unterschiede zwischen den Arten (Brandsma et al., 2008; Smit et al., 2004).

1.5 Enzyme

Enzyme sind globuläre Proteine mit katalytischer Aktivität. Die Struktur der Proteine wird durch die Aminosäuresequenz und die daraus resultierende Konformation bestimmt. Sie werden von biologischen Zellen synthetisiert und bewirken die Gesamtheit der chemischen Reaktionen eines Organismus, die als Stoffwechsel in Erscheinung tritt. Zu den hervorstechenden Eigenschaften eines Enzyms gehört außer der Fähigkeit die Geschwindigkeit einer Reaktion enorm zu steigern, noch die Spezifität im Hinblick auf die Verbindung, die umgesetzt wird (Substratspezifität) und auf die Reaktion, die katalysiert wird (Reaktionsspezifität). Eine Reihe von Enzymen sind Komplexe, die aus dem Protein und einer damit fest verknüpften nichtproteinartigen Komponente bestehen, die als prosthetische Gruppe an der Katalyse beteiligt ist. Andere Enzyme bedürfen eines Cobsubstrates, das reversibel gebunden wird (Belitz et al., 2001).

Wie schon in den Kapiteln 1.1 bis 1.4 dargestellt, spielen Enzyme eine wichtige Rolle während der Rohwurstreifung und sind aktiv an der Bildung aromarelevanter Verbindungen aus Aminosäuresubstraten in *L. sakei* beteiligt. Im Folgenden werden einige Proteine, auf deren Bedeutung für diese Arbeit später eingegangen wird, näher vorgestellt.

1.5.1 Transaminasen

Den ersten Schritt des intrazellulären Aminosäureabbaus in Milchsäurebakterien stellt eine Transaminierung dar, wobei die Aminosäure unter Abspaltung der α -Aminogruppe zu einer α -Ketosäure umgewandelt wird (Abbildung 2; 1.2). Diese Reaktion kann durch Enzyme der Klasse der Transfersen - den Transaminasen (= Aminotransferasen) - katalysiert werden. Sie besitzen in ihrem aktiven Zentrum als prosthetische Gruppe Pyridoxalphosphat (PLP) und geben die bei der Transaminierung aufgenommene α -Aminogruppe anschließend an ein Cosubstrat, häufig α -Ketoglutarinsäure oder Pyruvat ab, wobei L-Glutaminsäure bzw. L-Alanin entsteht (Berg et al., 2003). Der Reaktionsmechanismus der Transaminierung

einer Aminosäure zur α -Ketosäure unter Beteiligung von Pyridoxalphosphat ist in Abbildung 4 dargestellt.

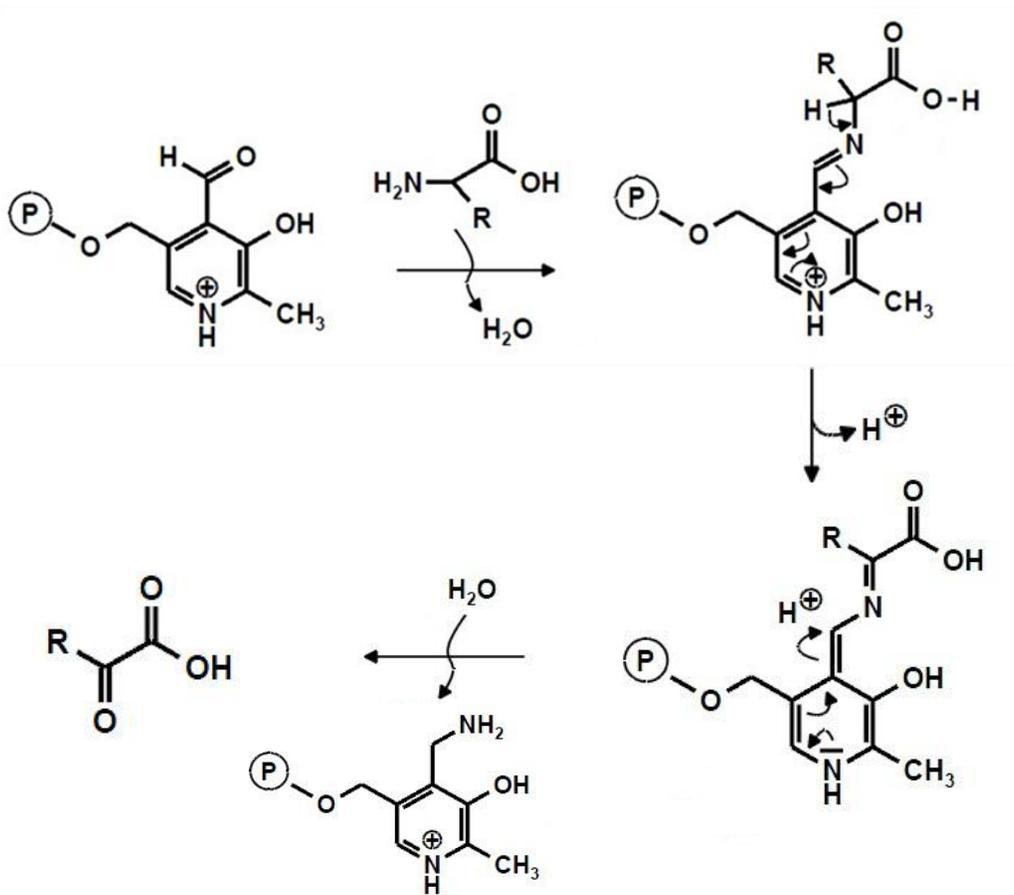


Abbildung 4: Reaktionsmechanismus der Transaminierung einer Aminosäure zur α -Ketosäure unter Beteiligung von Pyridoxalphosphat (Berg et al., 2003).

Die Aldehydgruppe des Pyridoxalphosphats bildet zunächst mit der Amino-Gruppe der Aminosäure eine Schiffsche Base. Durch die elektronenziehende Wirkung des protonierten Pyridinstickstoffs wird ein Elektronenfluss im Sinne der Pfeile eingeleitet, der schließlich zur Eliminierung des α -Protons führt. Die anschließende Hydrolyse liefert Pyridoxamin und die entsprechende α -Ketosäure (Berg et al., 2003).

Die spezifischen Transaminasen BcaT und AraT sind für die Umwandlung von verzweigt-kettigen bzw. aromatischen Aminosäuren in ihre komplementären α -Ketosäuren verantwortlich. Zur Charakterisierung der Gensequenzen, die Enzyme für den Abbau dieser Aminosäuren kodieren (*araT* und *bcaT*), wurden mehrere Studien mithilfe von Genklonierung und Mutantenkonstruktion mit *Lactococcus lactis* durchgeführt (Atilas et al., 2000; Rijnen et al., 1999; Yvon et al., 1997, Yvon et al., 2000). Die Untersuchungen

deuten darauf hin, dass die Transaminierung das einzige enzymatische System für den ersten Schritt des Leucin-Abbaus in Lactobazillen ist. Der Abbau von Leucin durch *L. sakei* ist jedoch sehr gering im Vergleich zu anderen Organismen aus der Rohwurstfermentation (Larrouture et al., 2000). Im Genom vieler Milchsäurebakterien konnten *araT*- und *bcaT*-Gene gefunden werden, jedoch nicht bei *L. sakei* 23K (Liu et al., 2008) und auch 51 weiteren *L. sakei*-Stämmen (Freiding et al., 2011). Die Charakterisierung einer BcaT aus Lactobazillen wurde lediglich für *L. paracasei* durchgeführt (Thage et al., 2004).

Wie in Abbildung 2 (1.2) dargestellt, reagieren die intermediär gebildeten α -Ketosäuren durch enzymatische Decarboxylierung weiter zu Aldehyden. Bei hohen Temperaturen können diese beiden Reaktionsschritte auch chemisch eintreten und wurden erstmals von Strecker (1862) beschrieben, der einen oxidativen Abbau von Aminosäuren in Anwesenheit von Alloxan beobachtete. Später wurde bekannt, dass auch andere α -Dicarbonylverbindungen, vinyloge Dicarbonyle, sowie Glucose in der Lage sind, aus Aminosäuren die um ein C-Atom verkürzten Aldehyde zu generieren (Schönberg und Moubacher, 1952). Der Reaktionsmechanismus des sogenannten Strecker-Abbaus einer α -Dicarbonylverbindung mit einer Aminosäure zum Aldehyd ist in Abbildung 5 dargestellt.

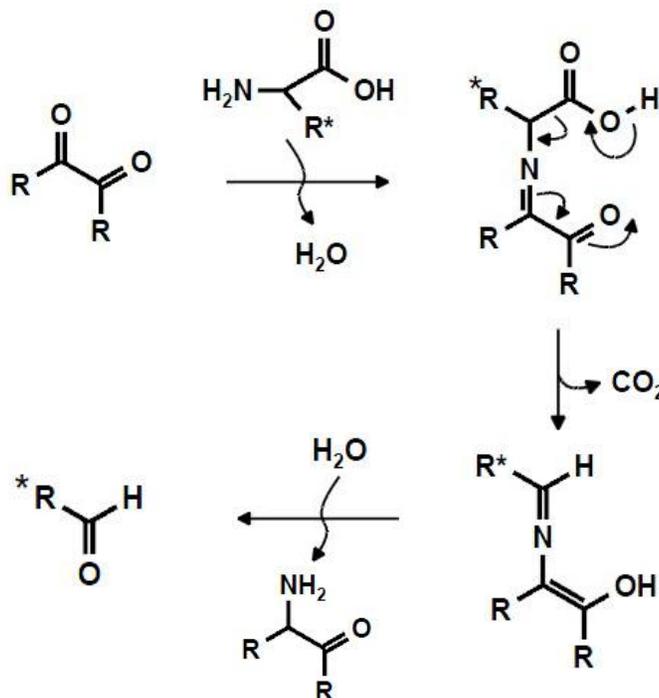


Abbildung 5: Durch α -Dicarbonylverbindungen induzierter Strecker-Abbau von Aminosäuren (Belitz et al., 2001).

Wie beim enzymatischen Abbau wird die Reaktionssequenz durch Bildung einer Schiffsen Base eingeleitet, wobei die Aminosäure nun mit einer 1,2-Dicarbonylverbindung reagiert. Dies führt unter oxidativer Decarboxylierung der α -Aminosäure zur Bildung von Aldehyden, CO_2 und α -Aminoketonen. Die Reaktion läuft in Lebensmitteln bei höheren Konzentrationen an freien Aminosäuren und unter drastischeren Bedingungen, z.B. bei höheren Temperaturen oder unter Druck ab (Belitz et al., 2001).

1.5.2 Lysozym

Lysozym wurde 1922 von A. Fleming in Schleimabsonderungen von Schnupfenpatienten entdeckt (Fleming, 1922). Es ist das erste Enzym, dessen Kristallstruktur vollständig aufgeklärt wurde (Blake et al., 1965).

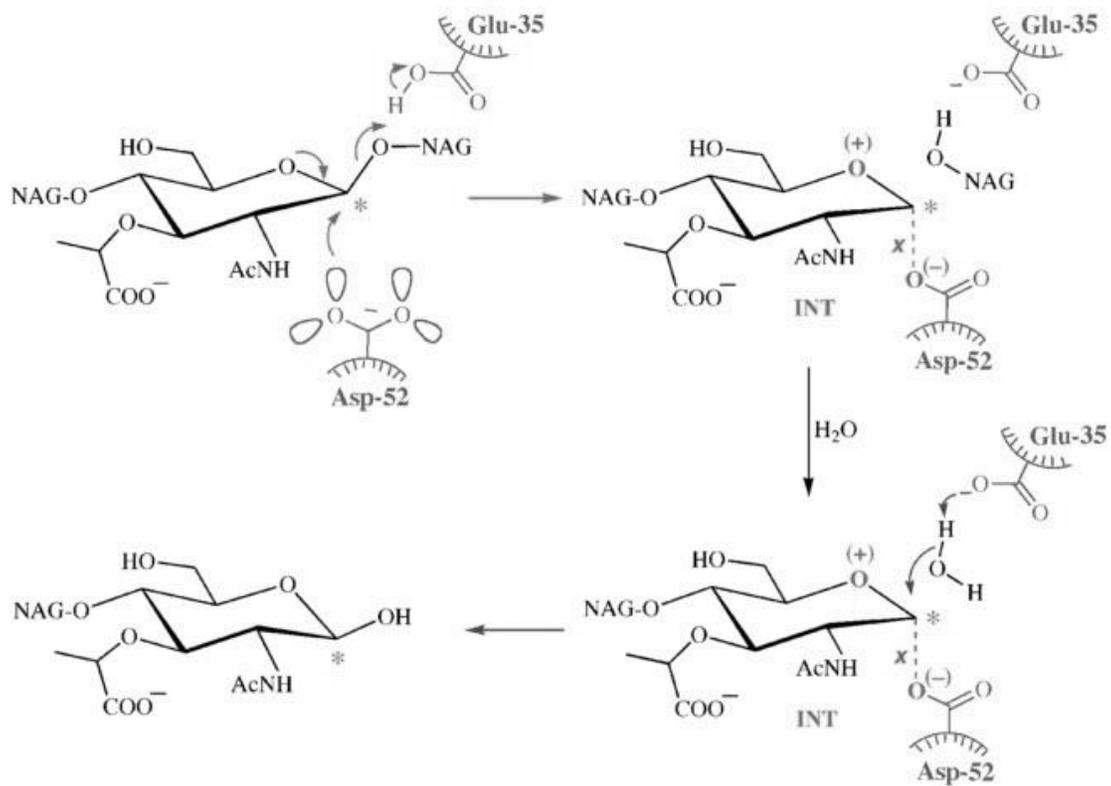


Abbildung 6: Reaktionsmechanismus von Lysozym. Das Substrat wird so gebunden, dass die 4-OH-Gruppe eines *N*-Acetylglucosaminrests (NAG) durch die Carboxylgruppe des Glu-35 im aktiven Zentrum von Lysozym protoniert wird. Im Intermediat (INT) wird die gestrichelt gekennzeichnete intermolekulare Bindung (x) mit dem Asp-52 im aktiven Zentrum von Lysozym eingegangen. (Kirby, 2001; Vocadlo et al., 2001)

Es ist ein bakterizides Protein, das vor allem in der Tränenflüssigkeit, im Nasenschleim und im Eiklar enthalten ist, aber auch in vielen tierischen Geweben und Sekreten, im Latex verschiedener Pflanzen und in einigen Schimmelpilzen vorkommt. Lysozym spaltet die glykosidische Bindung des Mureins der Zellwand von Bakterien zwischen dem C-Atom 1 der *N*-Acetylmuraminsäure und dem C-Atom 4 des *N*-Acetylglucosamins und baut die Muropolysaccharidkette zu dem Disaccharid GlcNAc-MurNAc ab, es ist somit eine (*N*-Acetyl-)Muramidase (Abbildung 6). Bei vielen gramnegativen Bakterien wird die Mureinschicht erst dann für Lysozym zugänglich, wenn eine Behandlung mit Ethylendiamintetraacetat (EDTA) durchgeführt wurde (Belitz et al., 2001; Schlegel, 1992).

Lysozym aus Hühnereiweiß ist heutzutage der bekannteste Vertreter der Glycosidasen, welche zur Enzymklasse der Hydrolasen gehören. Es wird technologisch aus Hühnereiweiß gewonnen und ist auch unter dem Namen *HEWL* (*hen egg-white lysozyme*) bekannt. In der Mikrobiologie wird es häufig zur Vorbehandlung von grampositiven Bakterien vor dem Zellaufschluss mittels Ultraschall verwendet (Kirby, 2001).

1.5.3 Acylphosphatase

Acylphosphatasen (AcP) zählen, wie auch Lysozym, zur Enzymklasse der Hydrolasen und sind mitunter die kleinsten bekannten Enzyme (Stefani et al., 1997). Sie katalysieren die Hydrolyse von Acylphosphaten - Verbindungen die eine Carboxyl-Phosphat-Gruppe enthalten - wie z.B. 1,3-Bisphosphoglycerat, Carbamoylphosphat, Succinyl-Phosphat, Acetylphosphat und Aspartylphosphat (Harary, 1957; Hokin et al., 1967; Ramponi, 1975). Diese Moleküle spielen eine wichtige metabolische und physiologische Rolle als Intermediate in der Glykolyse, dem Zitronensäurezyklus und der Pyrimidin- und Harnstoffsynthese.

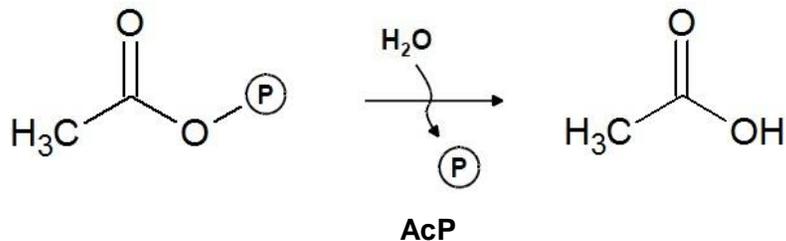


Abbildung 7: Durch Acylphosphatasen (AcP) katalysierte Reaktion am Beispiel von Acetylphosphat.

Im Gegensatz zur alkalischen und sauren Phosphatase können diese Enzyme keine Phosphat-Ester-Bindungen oder organische Anhydride hydrolysieren, sie unterscheiden

sich auch strukturell von diesen beiden Enzymen (Sperow und Butler, 1971; Taga und van Etten, 1982). Die durch Acylphosphatasen katalysierte Hydrolyse ist in Abbildung 7 am Beispiel von Acetylphosphat dargestellt.

Im Gewebe von Säugetieren werden zwei AcP-Isoenzyme exprimiert: Muskel-AcP (MT, *muscle type*) ist vor allem in der Skelettmuskulatur und im Herzen aufzufinden, wohingegen die Organ-AcP (CT, *organ common type*) in den Erythrozyten, dem Gehirn und dem Hoden exprimiert wird.

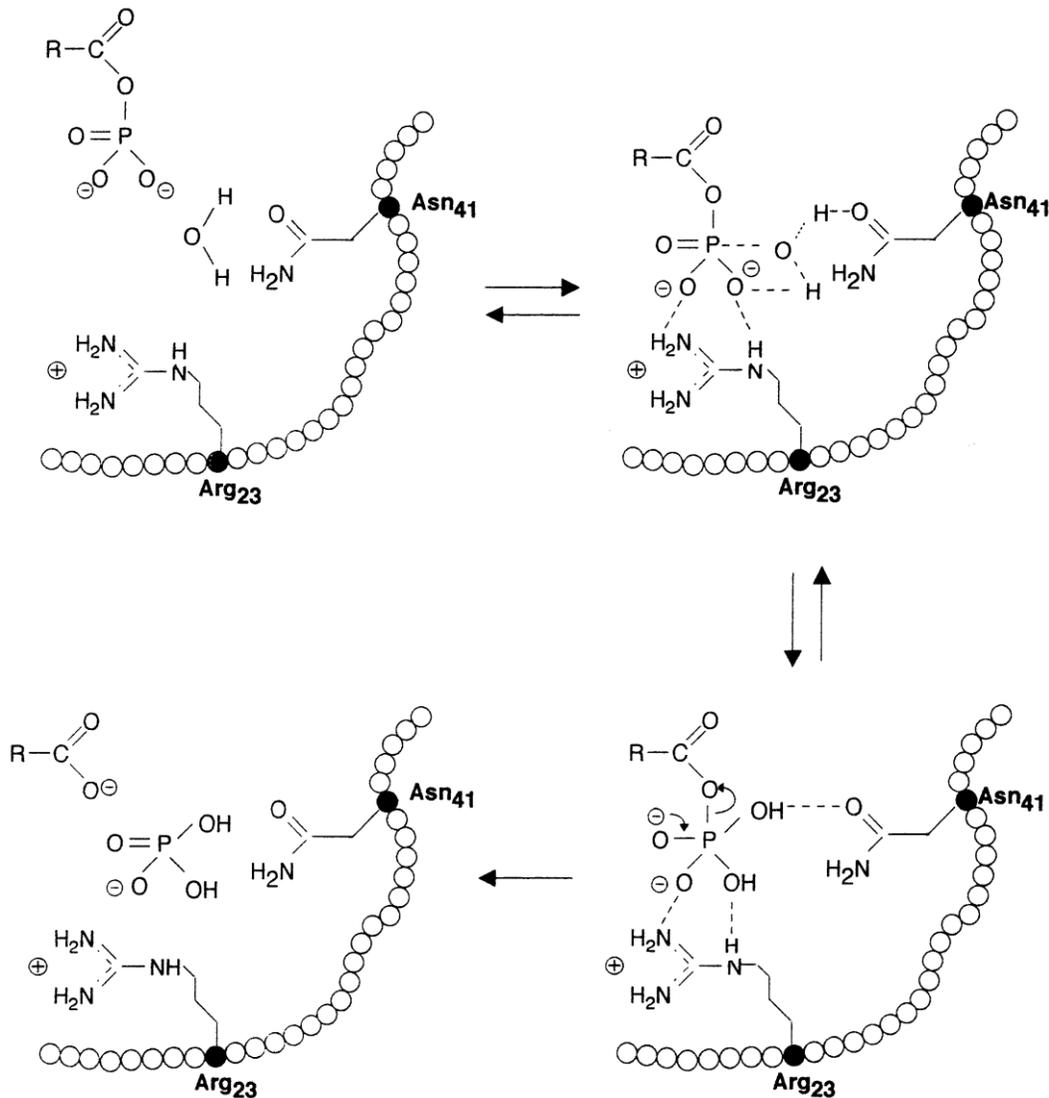


Abbildung 8: Vorgeschlagener Mechanismus für die durch Acylphosphatase katalysierte Hydrolyse (Stefani et al., 1997).

Die biologische Rolle beider Enzyme konnte, obwohl sie in unterschiedlichen Versuchen untersucht wurde, nicht vollständig aufgeklärt werden (Rosano et al., 2002). AcP aus

Pferdemuskel wurde 1980 zum ersten Mal sequenziert. In den darauffolgenden Jahren wurde die Struktur vieler weiterer Säugetier- und Vogel-AcPs identifiziert. Grundsätzlich ist das Protein aus 98 Aminosäuren aufgebaut und am N-Terminus acetyliert. Das aktive Zentrum des Proteins wird durch zwei katalytische Bindungsstellen geprägt: Arg-23, das die Bindungsstelle für den Phosphatrest des Substrats darstellt und Asn-41, das an der Bindung und Orientierung des Wassermoleküls beteiligt ist (Stefani et al., 1997). Der in Abbildung 8 dargestellte Reaktionsmechanismus wurde für die durch Acylphosphatase aus Säugetieren katalysierte Hydrolyse von Stefani et al. (1997) vorgeschlagen.

Des Weiteren ist die Acylphosphatase des hyperthermophilen Archaeons *Sulfolobus solfataricus* (Sso-AcP) gut untersucht, da an ihr die Entstehung der *native-like* Aggregation von normalerweise löslichen und funktionellen Proteinen studiert wird. Diese Proteinaggregate werden für eine Reihe neurodegenerative Erkrankungen wie Morbus Alzheimer oder Morbus Parkinson verantwortlich gemacht. Die Sso-AcP ist aus 103 Aminosäuren aufgebaut. Corazza et al. (2006) konnten durch Vergleich der Aminosäuresequenzen von Acylphosphatasen eine universell konservierte AcP-Signatur identifizieren (Val-Gln-Gly-Val-X-X-Arg), die eine Wiegen-artige Konformation in der Polypeptidstruktur definiert. Der Argininrest am Ende der Signatur (Arg-30) stellt in Sso-AcP die Substratbindungsstelle im aktiven Zentrum dar. Des Weiteren konnten sie Asn-48 als Bindungsstelle im aktiven Zentrum identifizieren. Somit sind die Bindungsstellen der aktiven Zentren von Acylphosphatase aus Säugetieren und *Sulfolobus solfataricus* durch die gleichen Aminosäuren im gleichen Abstand zueinander definiert.

Über Acylphosphatasen aus Lactobazillen ist wenig bekannt. Einige wurden sequenziert, über die Substratbindung und den Reaktionsmechanismus im aktiven Zentrum sind jedoch keine Veröffentlichungen auffindbar. Burns et al., 2010 geben jedoch an, dass AcP im Stoffwechsel von *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* beim Pyruvat-Abbau eine wichtige Rolle spielt. Das bei der zur Energiegewinnung durchgeführten Glykolyse aus Glucose entstehende Pyruvat kann zum einen die in homofermentativen Milchsäurebakterien primär durchgeführte Milchsäuregärung eingehen und durch die Lactat-Dehydrogenase (LDH) zu Milchsäure umgewandelt werden. In Konkurrenz hierzu steht die durch die Pyruvat-Oxidase (POX) katalysierte Decarboxylierung des Pyruvats zu Acetylphosphat. Das entstehende Acetylphosphat kann zum einen durch die Phosphat-Acetyltransferase (PTA) zu Acetyl-CoA und weiter durch die Acetaldehyd-Dehydrogenase (ADH) zu Acetaldehyd reagieren. Zum anderen kann es unter gleichzeitiger Phosphorylierung von ADP zu ATP durch die Acetatkinase (AcK) oder die Acylphosphatase (AcP) zu Essigsäure reagieren (Abbildung 9). Beim Vergleich des Genoms von *L. sakei* 23K konnten Homologe

aller genannten Enzyme gefunden werden (Chaillou et al., 2005; KEGG Pathway Database).

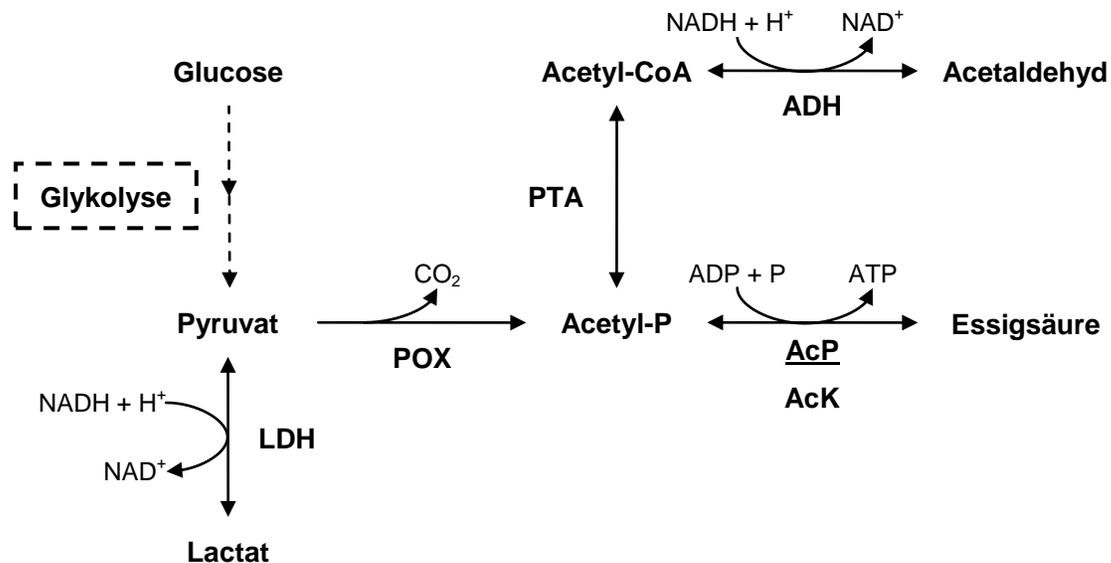


Abbildung 9: Schematische Darstellung des homofermentativen Stoffwechsels und Pyruvat-Abbaus in Milchsäurebakterien. LDH = Lactat-Dehydrogenase; POX = Pyruvat-Oxidase; PTA = Phosphat-Acetyltransferase; ADH = bifunktionale Acetaldehyd-CoA-/Alkohol-Dehydrogenase; AcK = Acetatkinase; AcP = Acylphosphatase (Burns et al., 2010).

Homofermentative Milchsäurebakterien bauen Glucose über den Fructosebiphosphat-Weg ab und bilden zu 90 % Lactat. Es ist jedoch bekannt, dass selbst ein so ausgeprägt homofermentatives Bakterium wie *Lactobacillus casei* zwar Glucose homofermentativ vergärt, aber Ribose heterofermentativ zu Essigsäure und Lactat umsetzt (Schlegel, 1992). Glucose und Ribose sind die in Fleisch am häufigsten vorkommenden Zucker. Díaz-Muñiz et al. (2006) konnten beobachten, dass *L. casei* bei einem Mangel an Kohlenhydraten als Energiequelle hauptsächlich Essigsäure produzierte und auch bei einer hohen Kohlenhydratverfügbarkeit noch beachtliche Mengen dieses Stoffwechselproduktes bildete. Wie Champomier-Vergès et al. (2001) feststellten, ist *L. sakei* zu den fakultativ heterofermentativen Milchsäurebakterien zu zählen, welche Hexosen homofermentativ vergären, während Pentosen über den Phosphoketolase-Weg abgebaut werden.

Söllner und Schieberle (2009) identifizierten Essigsäure und Acetaldehyd als die flüchtigen Verbindungen mit den höchsten Aromawerten in ungarischer Salami. Die heterofermentative Milchsäuregärung stellt somit auch einen Bildungsweg wichtiger aromarelevanter Metabolite dar.

1.5.4 Ribosomale Proteine

Ribosomen sind makromolekulare Komplexe bestehend aus Proteinen und Ribonukleinsäuren, die im Cytoplasma vorkommen. In ihnen findet die Proteinbiosynthese statt. Sie bestehen aus zwei Untereinheiten (30S und 50S). Im Falle von *L. sakei* 23K enthält die 30S-Untereinheit 21 Proteine (S1 bis S21) und ein RNA-Molekül von 16S, in der 50S-Untereinheit befinden sich 36 Proteine (L1 bis L36) und zwei RNA-Moleküle, eines von 23S und eines von 5S. Die ribosomalen Proteine unterstützen die Faltung der rRNA und sind für die Aufrechterhaltung einer optimalen Konfiguration zuständig. Hierdurch beschleunigen sie die Proteinbiosynthese und erhöhen die Genauigkeit der Translation. Es werden ihnen aber auch extraribosomale Funktionen wie Replikation, Transkription, DNA-Reparatur und DNA-Bindung zugeschrieben. Das 50S ribosomale Protein L33 aus *L. sakei* besteht aus 49 Aminosäuren (Berg et al., 2005; Chaillou et al., 2005; Munk, 2008; Wool, 1996). De Carvalho et al. (2010) berichten, dass sie bei der Identifizierung eines Bakteriozins aus *Lactobacillus sakei* subsp. *sakei* 2a - einem Stamm mit hohem bakteriozinem Potential, der aus einem brasilianischem Schweinefleischprodukt isoliert wurde - ein Protein aufreinigten und das entsprechende Gen klonierten. Das Protein ist identisch zu dem 30S ribosomalen Protein S21 aus *L. sakei* 23K, *L. monocytogenes* 1/2a F6854 und *E. faecalis* v583 und weist hohe bakteriozine Aktivität auf. Sie schlagen vor, dass das Protein bakteriozid gegen *L. monocytogenes* und *E. faecalis* wirken könnte, indem es durch Ribosomgleichheit und -funktion die Proteinsynthese behindert und somit zum Zellsterben führt.

1.5.5 Thioredoxin

Thioredoxin ist ein 12-kDa-Protein mit einander benachbarten Cysteinresten, das 1964 erstmals aus *Escherichia coli* extrahiert wurde. Das aktive Zentrum von Thioredoxin ist nach außen gerichtet und besitzt die Aminosäuresequenz -Cys-Gly-Pro-Cys-. Das Protein existiert in der reduzierten Form als Dithiol, oder in der oxidierten Form mit einer intramolekularen Disulfidbrücke. Die reduzierte Form des Thioredoxins aktiviert viele Biosyntheseenzyme, indem sie Disulfidbrücken reduziert, die deren Aktivität kontrollieren; ebenso werden verschiedene Abbauenzyme auf gleiche Weise gehemmt. Thioredoxin nimmt auch an Redoxreaktionen durch die reversible Oxidation seiner Thiolreste im aktiven Zentrum zu einem Disulfid teil und katalysiert Dithiol-Disulfid-Austauschreaktionen. In der oxidierten Form wird es normalerweise von NADPH/H⁺ und Thioredoxin-Reduktase reduziert, die reduzierte Form ist eine starke Protein-Disulfid-Reduktase die an vielen Thiol-abhängigen, reduzierenden Prozessen in der Zelle beteiligt

ist. Es hat in praktisch allen Organismen eine große Bedeutung (Berg et al., 2005; Holmgren, 1985).

1.5.6 Phosphotransportprotein HPr

Ein zentrales Protein im bakteriellen Kohlenhydrathaushalt ist das Histidin-enthaltende Phosphotransportprotein HPr (*histidine-containing phosphocarrier protein*). Es spielt eine wesentliche Rolle bei der Aufnahme von Kohlenhydraten in die Zelle durch das Phosphoenolpyruvat-abhängige Phosphotransportsystem (PTS) und bei der Regulation des Kohlenhydrathaushaltes, indem es die Expression entsprechender Gene hemmt (Viana et al., 2000). Beide Funktionen von HPr werden durch Phosphorylierungs- und Dephosphorylierungsreaktionen gesteuert. Im Kohlenhydrattransportsystem fungiert HPr, indem es eine Phosphatgruppe vom Phosphoenolpyruvat über mehrere Proteine auf den jeweiligen Zucker überträgt, der daraufhin in die bakterielle Zelle transportiert wird. Hierbei wird HPr am His-15 phosphoryliert und überträgt dann diese Phosphatgruppe. In den meisten grampositiven und einigen gramnegativen Bakterien hat HPr eine zweite regulatorische Phosphorylierungsstelle am Ser-46. Der Phosphorylierungszustand von Ser-46 wird ATP-abhängig von der bifunktionalen HPr-Kinase/Phosphatase (HPrK/P) moduliert (Deutscher und Saier Jr., 1983; Kravanja et al., 1999; Russell et al., 2002). Ist HPr an Ser-46 phosphoryliert, wird seine Funktion als Phosphat-übertragendes Protein im PTS blockiert, indem die Interaktion mit weiteren Enzymen gestört wird (Reizer et al., 1998). Weiterhin fungiert das an Ser-46 phosphorylierte HPr als Repressor für gluconeogene Systeme (Jones et al., 1997; Stülke und Hillen, 1999). Da die HPr-Kinase durch Fructose-1,6-bisphosphat aktiviert wird, wird so über HPr bei ausreichender Zuckerversorgung der Zelle sowohl die Zuckeraufnahme, als auch die Zuckersynthese gehemmt. Sinkt der Energiegehalt der Zelle, wobei freies Phosphat als Signal dient, wird die Phosphatasefunktion der HPrK/P aktiviert. So wird durch Dephosphorylierung von HPr das PTS wieder in Gang gesetzt. Das am Ser-46 phosphorylierte HPr scheint auch noch in weiteren regulatorischen Systemen eine Rolle zu spielen (Viana et al., 2000; Dossonnet et al., 2000).

1.5.7 DNA-bindende HU Proteine

Histon-ähnliche, DNA-bindende HU Proteine gehören zu den in bakteriellen Nucleoiden am häufigsten vorkommenden Proteinen (Rouvière-Yaniv und Gros, 1975). Sie wurden zunächst aufgrund ihrer Fähigkeit, in Gegenwart von Topoisomerase I negatives Supercoiling in entspannte, ringförmige DNA-Moleküle einzuführen und hierdurch DNA zu kompaktieren, als Histon-ähnliche Proteine charakterisiert (Rouvière-Yaniv et al., 1979).

Bakterielle HU Proteine sind entscheidend für die Aufrechterhaltung der Nucleoid-Struktur. Darüber hinaus beteiligen sie sich in allen DNA-abhängigen Funktionen, einschließlich Replikation, Reparatur, Rekombination und Genregulation. Hier ist ihre Funktion in der Regel architektonischer Natur, indem sie eine spezifische räumliche Struktur der DNA erzeugen. Obwohl HU-Proteine ausgeprägt konserviert sind, konnte gezeigt werden, dass individuelle Homologe eine breite Palette an unterschiedlichen DNA-Bindungsspezifitäten und -affinitäten aufweisen. Die Existenz solch ausgeprägter Spezifitäten legt eine funktionale Entwicklung und eine besondere Rolle *in vivo* nahe. Aktuelle Ergebnisse deuten darauf hin, dass HU-Proteine zwischen DNA-Bindungsstellen aufgrund spezifischer Knicke unterscheiden und dass zwei Besonderheiten der Substrat-Protein-Bindung zur Auswahl der Bindungsstellen beitragen: das Ausmaß, in dem Protein-vermittelte DNA-Knicke stabilisiert werden und ein Netzwerk aus Salzbrücken an der Oberfläche, die Wechselwirkungen zwischen der DNA, welche die Knicke umgibt und dem Proteinmolekül eingehen. Diese Merkmale ermöglichen die hohe Bindungsspezifität der HU-Homologe, sie legen die Fähigkeit der HU nahe, je nach Substrat unterschiedliche DNA-Strukturverformungen herbeizuführen und sie erklären das ausgeprägte Bindungsvermögen, das für HU Homologe charakteristisch ist (Balandina et al., 2001; Grove, 2010). Wie schon für das 30S ribosomalen Protein S21 berichten de Carvalho et al. (2010) auch für das DNA-bindende HU Protein aus *L. sakei* 23K, dass sie bei der Identifizierung mehrerer Bakteriozine aus *L. sakei* subsp. *sakei* 2a ein identisches Protein mit bakterioziner Aktivität aufreinigten und klonierten. Sie vermuten, dass die Wirkung als Bakteriozin durch Behinderung des Aufbaus und der Replikation von DNA im Zielorganismus erklärbar ist.

1.5.8 Kälteschock-Proteine

Wenn wachsende Bakterien einem Temperaturabfall ausgesetzt werden, kommt es zu einem vorübergehenden Stillstand oder zu einer Abnahme des Zellwachstums, während die allgemeine Proteinsynthese stark gehemmt wird (van de Guchte et al., 2002). Allerdings wird unter diesen Bedingungen die Synthese einer Reihe von Proteinen induziert, die Kälteschock-induzierte Proteine (CIP, *cold shock induced* proteins) genannt werden. Die Kälteschock-Proteine (CSPs, *cold shock proteins*) stellen die am häufigsten auftretende Gruppe innerhalb der CIPs dar (Beaufils et al., 2000). Zu den am stärksten induzierten CSPs gehört eine Familie eng verwandter Polypeptide mit niedrigem Molekulargewicht, die aus etwa 70 Aminosäuren aufgebaut sind (Graumann et al., 1996; Yamanaka et al., 1998; Wouters et al., 2001). Diese Proteine besitzen eine hohe Sequenzidentität und Orthologe wurden in vielen grampositiven und gramnegativen

Bakterien mit multiplen Kopien gefunden (von zwei bis neun). Multiple Knock-Out-Mutanten zeigten, dass mindestens ein funktionelles CSP für die Lebensfähigkeit der Zellen benötigt wird. Dies weist darauf hin, dass CSPs nicht nur eine wichtige Rolle bei der Kälteschock Anpassung spielen, sondern auch während des aktiven Wachstums (Graumann et al., 1997). Während des Kälteschocks werden sie für mehrere Aufgaben verantwortlich gemacht: die Stabilisierung des DNA-Supercoilings indem sie das negative Supercoiling reduzieren und die für die Anpassung der Zelle an die niedrigen Temperaturen benötigte Transkription und Translation (van de Guchte et al., 2002). In *Escherichia coli* beispielsweise existieren neun CSPs (CspA - CspI). Nur vier von ihnen (CspA, CspB, CspG und CspI) werden vorübergehend während des Kälteschocks induziert (Lee et al., 1994; Wang et al., 1999), wohingegen die anderen während des Wachstums bei optimaler Wachstumstemperatur hergestellt oder beim Übergang in die stationäre Phase induziert werden (Yamanaka et al., 1998). Es konnte hingegen die Bildung von 13 CSPs bei einem Temperaturabfall von 37 °C auf 10 °C in *Escherichia coli* beobachtet werden (Jones et al., 1987). Sie sind eine vielseitige Gruppe von Proteinen die an verschiedenen zellulären Prozessen beteiligt sind und alle gehören dem *E. coli* Kälteschock-Regulon an. Eines von ihnen ist das CspA Protein. Es wird nach dem Temperaturabfall 200-fach induziert und ist für die Regulierung anderer Kälteschock-Gene verantwortlich (Jones et al., 1992). Milchsäurebakterien können sich schnell an einen Kälteschock anpassen. In mehreren Studien konnte für *L. lactis* subsp. *lactis*, *L. lactis* subsp. *cremoris*, *S. thermophilus*, *L. acidophilus*, *L. bulgaricus*, *L. plantarum* und *E. faecalis* nachgewiesen werden, dass sie bei einem Temperaturabfall von 20 °C unter ihrer optimalen Wachstumstemperatur ihr Wachstum lediglich verlangsamen. Zumindest in *L. lactis*, *S. thermophilus* und *E. faecalis* konnte die Anpassung an den Kälteschock mit der Synthese von CIPs durch zweidimensionale Gelelektrophorese in Verbindung gebracht werden. Die Identifizierung von mehreren *L. lactis*-CIPs legt nahe, dass sie an einer großen Anzahl von zellulären Prozessen wie dem Aufbau von Chromosomen, Signalübertragungen und Stressadaptation beteiligt sein könnten. Als eine der Reaktionen auf die Kälteanpassung wurden CSPs oder entsprechende Gene in mehreren Milchsäurebakterien (*L. lactis* subsp. *cremoris*, *L. lactis* subsp. *lactis*, *S. thermophilus*, *Pediococcus pentosaceus*, *L. helveticus*, *E. faecalis*, *L. acidophilus*, *B. animalis*, *S. pyogenes*, *L. casei*, *S. dysgalactiae*, *L. plantarum* und *S. pyogenes*) nachgewiesen und/oder identifiziert. Die Anzahl an CSP-Genen kann zwischen den Subspezies und den Stämmen variieren (Champomier-Vergès et al., 2002; van de Guchte et al., 2002; Kim und Dunn, 1997). Zum Kälteschock in *L. sakei* ist keine Studie verfügbar (Champomier-Vergès et al., 2001).

1.6 Aufgabenstellung

Mikroorganismen spielen bei der Rohwurstreifung eine wichtige Rolle. Sie beeinflussen durch ihren Stoffwechsel die Qualität (Bildung von Aromastoffen und Farbstabilisierung) und die Sicherheit (Säuerung und Konservierung) des Produktes. Hinsichtlich der Aromabildung ist der Metabolismus von Peptiden und Aminosäuren durch die Starterkulturen von besonderer Bedeutung. *Lactobacillus sakei* wird häufig für die Produktion von Rohwürsten verwendet, da es die Dominanz der Starterkultur während der gesamten Reifung gewährleistet.

Es ist bekannt, dass es bei Stämmen von *L. sakei* große Unterschiede in der Genomgröße gibt, die nahe legen, dass das metabolische Potenzial dieser Stämme ebenso unterschiedlich sein kann. Auch wurde in mehreren Studien die phänotypische Heterogenität von *L. sakei*-Stämmen nachgewiesen. Aus diesem Grund wurde im ersten Teil dieser Arbeit das metabolische Potential verschiedener *L. sakei*-Stämme im Hinblick auf den Aminosäurestoffwechsel verglichen. Mehrere Studien mit Milchsäurebakterien zeigten eine bevorzugte Aufnahme von Peptiden, ein damit verbundenes besseres Wachstum der Mikroorganismen und eine wirksamere Metabolitbildung im Vergleich zu Aminosäuren. Zur Charakterisierung des Aminosäurestoffwechsels und daraus entstehender qualitätsbestimmender Leitsubstanzen wurden daher Studien mit Peptidzusätzen durchgeführt. Ziel dieser Versuche war es, die physiologische Fähigkeit der *L. sakei*-Stämme, Peptide aufzunehmen und zu metabolisieren zu überprüfen und Unterschiede im Ausmaß der Metabolisierung im Vergleich zu freien Aminosäuren und aufgrund der Stellung der Aminosäuren innerhalb der Peptide zu messen.

Aus Forschungsergebnissen ist bekannt, dass der erste Schritt des intrazellulären Aminosäureabbaus hin zu den flüchtigen und teilweise aromarelevanten Metaboliten in Milchsäurebakterien eine enzymatische Transaminierung ist, wobei α -Ketosäuren gebildet werden. Bei der Untersuchung des genetischen Potentials von über 50 Stämmen *L. sakei* konnte in keinem Stamm eine Gensequenz für in Milchsäurebakterien bekannte Transaminasen mit einer Spezifität für verzweigt-kettige bzw. aromatische Aminosäuren (BcaT bzw. AraT) gefunden werden. Die Transaminierungsaktivität eines Stammes (*L. sakei* 23K) konnte jedoch durch Einsatz radioaktiv markierter Substrate nachgewiesen werden, wenn auch in einem sehr geringen Ausmaß. Auch durch die in dieser Arbeit beschriebenen Versuche zur Metabolisierung von Aminosäuren und Peptiden durch *L. sakei* konnte eine Metabolisierung der Aminosäuresubstrate gezeigt werden. Das für den ersten Metabolisierungsschritt und somit für die Bildung der flüchtigen Metabolite aus

Aminosäuren verantwortliche Enzym ist jedoch unbekannt. Aus diesem Grund sollte im zweiten Teil der Arbeit die aktivitätsgeleitete Aufreinigung eines Enzyms mit Transaminierungsaktivität aus *L. sakei* 23K durchgeführt werden. Ziel war die Identifizierung eines Proteins mit Transaminierungsaktivität.

Bei der aktivitätsgeleiteten Aufreinigung eines Enzyms aus *L. sakei* 23K konnte ein Protein identifiziert werden, das für die Transaminierungsaktivität dieses Stammes verantwortlich gemacht wurde. Die anschließend durchgeführte Sequenzierung ergab die Aminosäuresequenz einer putativen Acylphosphatase. Um die Transaminierungsaktivität des aufgereinigten Proteins und die korrekte Sequenzierung zu bestätigen, wurde im dritten Teil der Arbeit das Protein heterolog im Wirt *Escherichia coli* TOP10 exprimiert und affinitätschromatographisch aufgereinigt. Mit dem annähernd rein vorliegenden Enzym wurde anschließend die vermutete Transaminierungsaktivität überprüft.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien entsprachen, soweit nicht anders in Tabelle 4 vermerkt, p. A. Qualität.

Tabelle 4: Chemikalien

Chemikalie	Hersteller	Ort
Acetonitril (für die HPLC)	J.T. Baker/Mallinckrodt Baker	Griesheim
Acetylphosphat Li-K-Salz ≥ 97 %	Fluka AG	Buchs
Ameisensäure ≥ 98 %	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe
Ammoniumchlorid reinst	Riedel-de Haën AG	Seelze
Ampicillin	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe
L(+)-Arabinose für die Mikrobiologie	Carl-Roth GmbH & Co KG	Karlsruhe
Benzaldehyd ≥ 99 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Steinheim
Bromphenolblau	Fluka AG	Buchs
Calciumchlorid ≥ 98 %	Carl-Roth GmbH & Co KG	Karlsruhe
Coomassie Brilliant Blue G250	Fluka AG	Buchs
Cyanocobalamin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Steinheim
L-Cysteinhydrochlorid ≥ 99 %	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe
Dikaliumhydrogenphosphat Trihydrat	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe
Dikaliumhydrogenphosphat wasserfrei	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe
1,2-Dimethoxyethan ≥ 99 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Steinheim
Dimethyldisulfid ≥ 99 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Steinheim
Dimidiumbromid ≥ 98 %	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe
Dinatriumhydrogenphosphat ≥ 98 %	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe
Dithiothreitol (DTT)	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe
Eisen(III)-chlorid Hexahydrat	Merck KGaA	Darmstadt
Essigsäure 100 %	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe
Ethanol	J.T. Baker/Mallinckrodt Baker	Griesheim
Fleischextrakt pulv., für Nährböden	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe
Folsäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Steinheim
Formaldehyd 36 %	Fluka AG	Buchs
D-Glucose wasserfrei	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe
Glycerol ≥ 99 %	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe
Glycin ≥ 99 %	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe
Hefeextrakt pulv., für die Bakteriologie	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe
Hydroxylamin Hydrochlorid ≥ 99 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Steinheim
Imidazol ≥ 99 %	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe
L-Isoleucin $\geq 98,5$ %	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphosphat $\geq 99,5$ %	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe
α -Ketoglutarsäure Na-Salz ≥ 98 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Steinheim
α -Ketoisovaleriansäure (KIV) Na-Salz ≥ 97 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Steinheim
α -Ketoisocapronsäure (KIC) ≥ 98 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Steinheim

Chemikalie	Hersteller	Ort
α -Keto- γ -(methylthio)buttersäure (KMBA) Na-Salz ≥ 97 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Steinheim
L-Leucin ≥ 99 %	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe
Lysozym aus Hühnereiweiß	Fluka AG	Buchs
Magnesiumsulfat Heptahydrat	Merck KGaA	Darmstadt
D(+)-Maltose Monohydrat ≥ 95 %	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe
Mangansulfat Monohydrat	Merck KGaA	Darmstadt
2-Mercaptoethanol	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe
Methanol (für die HPLC bzw. LC/MS)	J.T. Baker/Mallinckrodt Baker	Griesheim
L-Methionin ≥ 99 %	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe
2-Methylbutanal ≥ 99 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Steinheim
3-Methylbutanal ≥ 98 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Steinheim
3-Methyl-1-butanol ≥ 98 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Steinheim
2-Methylbuttersäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Steinheim
3-Methylbuttersäure ≥ 99 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Steinheim
2-Methylpropanal ≥ 99 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Steinheim
2-Methylpropansäure ≥ 99 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Steinheim
3-(Methylthio)-propanal (Methional) ≥ 98 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Steinheim
β -Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid (β -NAD) ≥ 99 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Steinheim
Natriumacetat	Merck KGaA	Darmstadt
Natriumcarbonat	Fluka AG	Buchs
Natriumchlorid ≥ 95 %	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe
Natriumdihydrogenphosphat ≥ 98 %	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe
Natriumhydroxid	Hanns Nierle	Freising
Natriumdodecylsulfat (SDS) ≥ 99 %	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe
Natriumthiosulfat	Fluka AG	Buchs
Nicotinsäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Steinheim
Pantothensäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Steinheim
Phenylacetaldehyd ≥ 99 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Steinheim
L-Phenylalanin ≥ 99 %	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe
Phenylpyruvat (PPA) Na-Salz ≥ 98 %	Fluka AG	Buchs
o-Phosphorsäure (85 %)	Fluka AG	Buchs
Pepton aus Casein	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe
Pyridoxal	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Steinheim
Pyridoxal-5'-phosphat (PLP) für Zellkulturen	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Steinheim
Salzsäure ≥ 32 %	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe
Silbernitrat	Fluka AG	Buchs
D-Sorbit ≥ 98 %	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe
Stickstoff, flüssig	Linde AG	München
Thiamin Hydrochlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Steinheim
Trichloressigsäure	Fluka AG	Buchs
Triethanolamin ≥ 99 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Steinheim
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris) $\geq 99,5$ %	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe
Tween [®] 80	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe
L-Valin $\geq 98,5$ %	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe
Wasser (für die LC/MS)	J.T. Baker/Mallinckrodt Baker	Griesheim

2.1.2 Peptide

Die in dieser Arbeit verwendeten Peptide Leu-Leu, Leu-Met, Met-Leu, Met-Phe-Leu-Val, Phe-Met-Val-Leu, Phe-Val und Val-Phe wurden durch die Firma GenScript USA Inc. (Piscataway, New Jersey, USA) synthetisiert.

2.1.3 Bakterienstämme

In dieser Studie wurden folgende Bakterienstämme verwendet:

- *Lactobacillus sakei* TMW 1.1322
- *Lactobacillus sakei* TMW 1.1383
- *Lactobacillus sakei* TMW 1.1393
- *Lactobacillus plantarum* TMW 1.708
- *Staphylococcus carnosus* TMW 2.801
- *Escherichia coli* TOP10

Sie wurden alle aus der Stammsammlung des Lehrstuhls für Technische Mikrobiologie, Technische Universität München bezogen. Bei *L. sakei* TMW 1.1322 handelt es sich um einen genomsequenzierten Stamm, welcher in der Literatur unter dem Namen *Lactobacillus sakei* 23K bekannt ist (Chaillou et al., 2005). *L. sakei* TMW 1.1383 und *L. sakei* TMW 1.1393 wurden aus Rohwürsten isoliert, die nach Angaben der fleischverarbeitenden Industrie ein gutes (TMW 1.1383) bzw. schlechtes (TMW 1.1393) Aroma aufwiesen. Die Milchsäurebakterien konnten jedoch nicht mit der Aromaqualität der Produkte in Verbindung gebracht werden.

2.1.4 Vektor

Die heterologe Expression von Proteinen in *E. coli* TOP10 erfolgte mit dem pBAD/Myc-His B Expressionsvektor (Invitrogen GmbH, Darmstadt; Abbildung 10). Die Selektion transformierter Organismen erfolgte durch die Antibiotika-Resistenz gegen Ampicillin. Der araBAD-Promotor (P_{BAD}) von *E. coli* erlaubte eine durch L(+)-Arabinose induzierbare Expression rekombinanter Proteine in *E. coli*. Die C-terminale Polyhistidinregion (6x His) bildete einen His-Tag am rekombinanten Enzym, welcher eine Affinitätsaufreinigung („*immobilized metal ion affinity chromatography*“, IMAC) an der Ni-Sepharose™ High Performance-Matrix einer HisTrap FF 5 mL-Affinitätssäule (GE Healthcare Biosciences AB, Uppsala, Schweden; 2.2.1) ermöglichte.

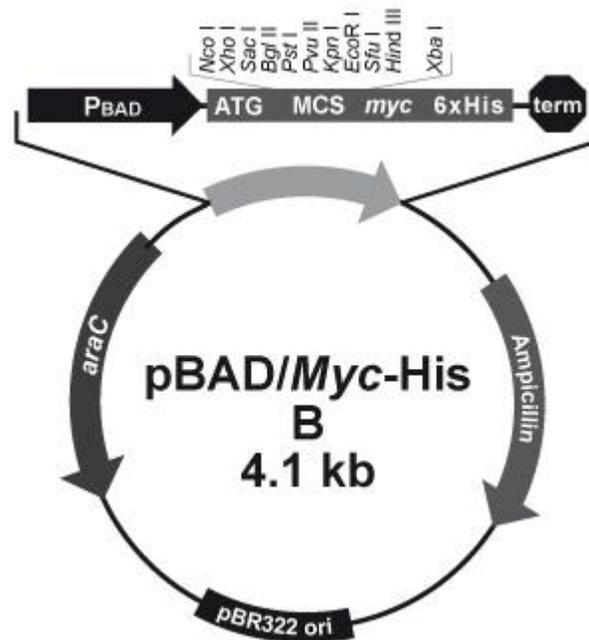


Abbildung 10: pBAD/Myc-His B Vektor.

2.1.5 Enzyme

DNA Polymerasen	KOD Hot Start DNA Polymerase (Merck KGaA, Darmstadt) Taq Polymerase (MP Biomedicals, Solon, Ohio, USA)
Restriktionsenzyme	<i>NcoI</i> , <i>XbaI</i> (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot)
Weitere Enzyme	T4-DNA-Ligase (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot) FastAP™ Thermosensitive Alkaline Phosphatase (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot)

2.1.6 Primer

Die aufgeführten Primer wurden in der Verdünnung 100 pMol/μL verwendet und von Eurofins MWG Operon (Ebersberg) bezogen. Eingeführte Restriktionsschnittstellen sind grau hervorgehoben.

Acylphosphatase-for	5'-TATACCATGGTTATGCAAAAAGCAGTCCAATTAG-3'
Acylphosphatase-rev	5'-TATATCTAGAAAACCGACAACCTGAAAATTTATGA-3'
pBAD-for	5'-ATGCCATAGCATT TTTATCC-3'
pBAD-rev	5'-TCTGATTTAATCTGTATCAGG-3'

2.1.7 Kommerzielle Kits

Die folgenden kommerziellen Kits wurden für die Erstellung dieser Arbeit gemäß den Angaben der jeweiligen Hersteller verwendet:

- Isolierung, Aufreinigung und Derivatisierung von Aminosäuren:
EZ:faast[®] Amino Acid Analysis Kit für GC-MS (Phenomenex LTD, Aschaffenburg)
- Enzymtest zur Bestimmung von D-Glucose:
D-Glucose UV-Test zur Bestimmung von D-Glucose in Lebensmitteln und anderen Probenmaterialien (R-Biopharm AG, Darmstadt)
- Enzymtest zur Bestimmung von L-Glutaminsäure:
L-Glutaminsäure Farb-Test zur Bestimmung von L-Glutaminsäure in Lebensmitteln und anderen Probenmaterialien (R-Biopharm AG, Darmstadt)
- Isolierung von DNA:
E.Z.N.A. Bacterial DNA Kit (Omega Bio-Tek Inc., Norcross, Georgia, USA)
- Amplifizierung des Gens:
KOD Hot Start DNA Polymerase (Merck KGaA, Darmstadt)
- Aufreinigung von PCR-Produkten und Restriktionsansätzen:
E.Z.N.A. Cycle Pure Kit (Omega Bio-Tek Inc., Norcross, Georgia, USA)
peqGOLD plasmid miniprep Kit (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen)
- Kolonie-PCR:
Taq Core Kit (MP Biomedicals, Solon, Ohio, USA)

2.1.8 Sonstige Materialien

- Konzentratoren zur Konzentrierung von Proteinlösungen:
VIVASPIN 3 bzw. 20 3000 MWCO PES Concentrator
(Sartorius Stedim Biotech S.A., Aubagne Cedex, Frankreich)
- Säulen zur Entsalzung von Proteinlösungen:
Zeba[™] Desalt Spin Columns 2 mL und 5 mL
(Thermo Fisher Scientific, Bonn)
- Protein-Fertiggele:
ProGel Tris-Glycin-Gel 12 % und 18 % SDS; 1 mm Schichtdicke
ProGel Tris-Glycin-Gradienten-Gel 4 - 20 % SDS; 1 mm Schichtdicke
(Anamed Elektrophorese GmbH, Groß-Bieberau)

2.1.9 Medien, Puffer und sonstige Lösungen

2.1.9.1 Medien

LB-Medium	Trypton (10 g/L) Hefeextrakt (5 g/L) Natriumchlorid (10 g/L) pH 7,0
LB-Agar (0,1 mg/mL Ampicilin)	LB-Medium 1,5 % Agar 0,1 mg/mL Ampicilin
Modifiziertes De Man Rogosa Sharpe Medium (mMRS-Medium) (De Man et al., 1960; Stolz et al., 1995)	(1) Pepton aus Casein (10 g/L) Hefeextrakt (5 g/L) Fleischextrakt (5 g/L) Dikaliumhydrogenphosphat Trihydrat (4 g/L) Kaliumdihydrogenphosphat (2,6 g/L) Ammoniumchlorid (3 g/L) Cystein-Hydrochlorid (0,5 g/L) Tween [®] 80 (1 g/L) (2) D(+)-Maltose Monohydrat (10 g/L) D-Glucose wasserfrei (5 g/L) (3) Vitamin-Mix: Cyanocobalamin, Folsäure, Nicotinsäure, Pantothenensäure, Pyridoxal, Thiamin (je 0,2 mg/L) (4) Metall-Mix: Magnesiumsulfat Heptahydrat (0,1 g/L), Mangansulfat Monohydrat (0,05 g/L) pH 6,2 → (1) und (2) wurden getrennt autoklaviert → (3) und (4) wurden separat steril filtriert (0,22 µm)
mMRS-Agar	mMRS-Medium 1,5 % Agar

mMRS-Aminosäure-
Stammlösungen mMRS-Medium (0,3 % Glucose, keine Maltose)
55,6 mM L-Aminosäure (Val, Leu, Ile, Phe, Met)
steril filtrieren (0,45 µm)

2.1.9.2 Puffer

Acetatpuffer 0,1 M Essigsäure
0,1 M Natriumacetat
Mischung 2:8

DNA-Auftragspuffer 0,25 % (w/v) Bromphenolblau
20 % (w/v) Saccharose

Natriumphosphat-
Puffer
(0,05 M; pH 6,5) 15,2 mM Dinatriumhydrogenphosphat
34,8 mM Natriumdihydrogenphosphat
pH 6,5 einstellen
steril filtrieren (0,22 µm)

Natriumphosphat-
Puffer
(0,02 M; pH 7,4)
für FPLC 15,5 mM Dinatriumhydrogenphosphat
4,5 mM Natriumdihydrogenphosphat
0,5 M Natriumchlorid
Imidazol (2.2.1)
pH 7,4 einstellen
steril filtrieren (0,22 µm)

Natriumphosphat-
Puffer für *Resting*
Cells Natriumphosphatpuffer (0,05 M; pH 6,5)
0,3 % D-Glucose

Kaliumphosphat-
Puffer
(0,05 M; pH 7,4) 40,1 mM Kaliumhydrogenphosphat (wasserfrei oder Trihydrat)
9,9 mM Kaliumdihydrogenphosphat
pH 7,4 einstellen
steril filtrieren (0,22 µm)

Kaliumphosphat-Puffer (0,1 M; pH 7,4)	80,2 mM Dikaliumhydrogenphosphat (wasserfrei oder Trihydrat) 19,8 mM Kaliumdihydrogenphosphat pH 7,4 einstellen steril filtrieren (0,22 µm)
5x Ladepuffer	0,25 M Tris-HCl (pH 8,5) 0,025 % (w/v) Bromphenolblau 25 % Glycerol 7,5 % (w/v) SDS 12,5 % Mercaptoethanol
Oberpuffer für Proteingele	25 mM Tris 192 mM Glycin 0,1 % SDS
10x TBE-Puffer (pH 8,9)	154,5 g Tris 26,2 g Borsäure 9,0 g EDTA ad 1 L bidest. H ₂ O pH 8,9 einstellen
Triethanolamin-Puffer (0,1 M; pH 7,4)	1,5 g Triethanolamin ad 100 mL bidest. H ₂ O pH 7,4 einstellen

2.1.9.3 Sonstige Lösungen

Aminosäure-Stammlösungen in dest. H ₂ O	Val: 9,4 mg/mL Leu: 10,5 mg/mL Phe: 13,2 mg/mL Met: 11,9 mg/mL steril filtrieren (0,22 µm) Zugabe 1 mL zu 19 mL mMRS-Medium = 4 mMol/L
---	---

Bradford-Lösung	50 mg Coomassie Brilliant Blue G250 in 25 mL Ethanol + 50 mL Phosphorsäure (85 %) ad 1 L H ₂ O (bidest.)
Calciumchlorid- Lösung (0,1 M)	0,1 M Calciumchlorid (15 % Glycerol)
Coomassie- Färbelösung für Proteingele	0,33 g Coomassie Brilliant Blue G250 in 120 mL Methanol + 24 mL Essigsäure +120 mL H ₂ O
DNA-Längenstandard	GeneRuler 100 bp bzw. 1 kb DNA Ladder Plus (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot)
Eisen(III)-chlorid- Lösung	5 % (w/v) Eisen(III)-chlorid Hexahydrat in 0,1 N Salzsäure
Entfärbelösung für Proteingele	20 % Ethanol 10 % Essigsäure
Entwicklerlösung für Silberfärbung	3 % Natriumcarbonat 0,05 % Formaldehyd (36 %) 0,0004 % Natriumthiosulfat
Färbelösung für Silberfärbung	0,2 % Silbernitrat
Fixierlösung für Silberfärbung	40 % Ethanol 10 % Essigsäure
Glycerol für Cryostocks (Mülhardt 2006)	65 % Glycerol 0,1 M Magnesiumsulfat 25 mM Tris-HCl pH 8,0 (eingestellt mit 0,1 N HCl)

Hydroxylamin-Lösung	4 M Hydroxylamin-Hydrochlorid 3,5 M Natriumhydroxid Mischung 1:1
Protein- Größenstandard	SDS 7 Marker MW 14000 - 66000 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)
Sensitivierlösung für Silberfärbung	0,02 % Natriumthiosulfat
Stopplösung für Silberfärbung	0,5 % Glycin
Waschlösung für Silberfärbung	30 % Ethanol

2.2 Geräte

2.2.1 *Fast Protein Liquid Chromatographie (FPLC)*

System	ÄKTApurifier (GE Healthcare Biosciences AB, Uppsala, Schweden)
Pumpe	ÄKTA P-900
Trennsäulen	(1) HiLoad 16/10 Q Sepharose High Performance (GE Healthcare Biosciences AB, Uppsala, Schweden) (2) Superdex 200 10/300 GL (GE Healthcare Biosciences AB, Uppsala, Schweden) (3) HisTrap FF 5 mL (GE Healthcare Biosciences AB, Uppsala, Schweden)
Injektionsmenge	(1) 80 - 430 mg Protein (2) 0,2 - 5,2 mg Protein (3) 55 - 65 mg Protein
Säulentemperatur	RT

Laufpuffer	(1) Startpuffer:	Kaliumphosphat-Puffer (2.1.9.2)
	Elutionspuffer:	Kaliumphosphat-Puffer + 0,5 M NaCl
	(2) Elutionspuffer:	Kaliumphosphat-Puffer + 0,15 M NaCl
	(3) Waschpuffer:	Natriumphosphat-Puffer für FPLC (2.1.9.2) + 35 mM Imidazol
	Elutionspuffer:	Natriumphosphat-Puffer für FPLC + 500 mM Imidazol
Flussrate	(1)	3 mL/min
	(2)	0,4 mL/min
	(3)	2 mL/min (Waschen) bzw. 1 mL/min (Elution)
Gradient	(1) 0 - 25 mL:	100 % Startpuffer
	25 - 325 mL:	0 - 100 % Elutionspuffer
	Laufzeit:	108,3 min
	(2) 0 - 45 mL:	isokratisch (100 % Elutionspuffer)
	Laufzeit:	112,5 min
	(3) 0 - 50 mL:	100 % Waschpuffer (= Waschen; keine Fraktionierung bzw. Probesammlung)
50 - 70 mL:	0 - 100 % Elutionspuffer (= Elution)	
70 - 100 mL:	100 % Elutionspuffer (= Elution)	
Laufzeit:	75 min	
UV-Detektor	ÄKTA UV-900 (Wellenlänge 280 nm)	
Leitfähigkeitsdetektor	ÄKTA UPC-900	
Fraktionierer	ÄKTA Frac-950	
Fraktionierung	(1)	16 x 2,5 mL; 57 x 5 mL → 73 Fraktionen
	(2)	2 x 6,5 mL; 54 x 0,5 mL; 1 x 5 mL → 57 Fraktionen
	(3)	30 x 1 mL; 2 x 10 mL → 32 Fraktionen
Datenaufnahme und	UNICORN 5.20	
Datenauswertung	(GE Healthcare Biosciences AB, Uppsala, Schweden)	

- (1) System Anionenaustausch
- (2) System Gelfiltration
- (3) System HisTrap

2.2.2 Flüssigkeitschromatographie-Elektrosprayionisations-Massenspektrometrie (LC-UV/ESI-MSⁿ)

System	Agilent 1100 Series (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, Kalifornien, USA)
Pumpe	Agilent 1100 Quarternäre Pumpe
Injektor	Agilent Sample Injector Model G1313A ALS
Injektionsvolumen	5 µL
Trennsäule	Luna 3u C18(2) 100A, 15 cm x 2 mm (ID) (Phenomenex LTD, Aschaffenburg)
Vorsäule	Security Guard Cartridges C18 4 x 2 mm (Phenomenex LTD, Aschaffenburg)
Säulentemperatur	25 °C
Fließmittel	A: Wasser mit 0,1 % Ameisensäure B: Methanol mit 0,1 % Ameisensäure
Flussrate	0,2 mL/min
Gradient	0 - 50 % B in 30 min 50 - 100 % B in 5 min 100 % B für 15 min 100 - 0 % B in 5 min Laufzeit: 55 min
UV-Detektor	Agilent 1100 Variable Wavelength Detector (Wellenlänge 280 nm)
MS	Bruker Daltonics esquire 3000 ^{plus} Ionenfalle (Bruker Daltonics, Bremen)
Spraygas	Stickstoff (30,0 psi)
Trockengas	Stickstoff (330 °C, 9 l/min)
Scanbereich	<i>m/z</i> 50 - 800
Polarität	positiv/negativ
ICC Target	20000 oder 200 ms
Zielmasse (SPS)	<i>m/z</i> 400
Ionisierungsspannung	- 4000 V
Endplattenspannung	- 500 V
MS/MS	Auto-tandem MS ²
Kollisionsgas	Helium 5.0 (3,56 x 10 ⁶ mbar)
Kollisionsenergie	1,0 V

Einstellungen Ionenfalle :

Skimmer	± 40,0 V
Cap Exit	± 121 V
Oct 1 DC	-12,0 V
Oct 2 DC	± 1,7 V
Trap Drive	49,4
Oct RF	112,2 V
Lens 1	± 5,0 V
Lens 2	± 60,0 V

Datenaufnahme und	Bruker Daltonics Esquire 5.1 Software
Datenauswertung	Bruker DataAnalysis 3.1 (Bruker Daltonics, Bremen)

2.2.3 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

System	Jasco HPLC (JASCO GmbH, Groß-Umstadt)
Pumpe	Jasco PU-1580 Quarternäre Pumpe
Autosampler/Injektor	Jasco AS-1555
Injektionsvolumen	20 µL
Trennsäule	Luna 3u C18(2) 100A, 15 cm x 2 mm (ID) (Phenomenex LTD, Aschaffenburg)
Vorsäule	Security Guard Cartridges C18 4 x 2 mm (Phenomenex LTD, Aschaffenburg)
Säulentemperatur	RT
Fließmittel	A: Wasser (bidest.) mit 0,1 % Ameisensäure B: Acetonitril mit 0,1 % Ameisensäure
Flussrate	0,2 mL/min
Gradient	10 - 30 % B in 15 min 30 - 100 % B in 5 min 100 % B für 10 min 100 - 10 % B in 5 min 10 % B für 10 min Laufzeit: 45 min
UV-Detektor	Jasco UV-1575 (Wellenlänge 210 nm)

Dioden Array	Hewlett Packard Series II 1090 Liquid Chromatograph
Detektor (DAD)	(Hewlett-Packard GmbH, Böblingen)
Datenaufnahme und	Jasco HSS-2000
Datenauswertung	JASCO-BORWIN Version 1.50 (JASCO GmbH, Groß-Umstadt)
Datenaufnahme und	Agilent ChemStation Rev. A.09.03
Datenauswertung	(Agilent Technologies Inc., Santa Clara, Kalifornien, USA)

2.2.4 Kapillargaschromatographie-Massenspektrometrie (GC/MS)

2.2.4.1 GC/MS für die Analyse derivatisierter Aminosäuren

GC	Agilent 6890N (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, Kalifornien, USA)
Autosampler	Agilent 7683
Injektor	Split/Splitless-Injektor Temperatur: 250 °C
Injektion	2 µL Split injection (15:1)
Temperaturen GC	Injektor: 250 °C Transferline: 310 °C
Kapillarsäule	Zebtron Amino Acid 10 m x 0,25 mm (ID) (Zebtron, Phenomenex LTD, Aschaffenburg)
Trärgas	Helium 5.0 konstanter Fluss von 1,1 mL/min
Temperaturprogramm	110 °C 30 °C/min bis 320 °C (5 min isotherm) Post run: 320 °C für 5 min isotherm Laufzeit: 12 min
MSD	Agilent 5975
Ionisation	Elektronenstoßionisation (EI positiv), 70 eV
Temperaturen MSD	MS Ionenquelle: 230 °C MS Quadrupol: 150 °C
Photomultiplier	1471 V
Scanbereich	m/z 45 - 450
Scanrate	3,54 scans/sec

Datenaufnahme und	MSD ChemStation E.02.00.493
Datenauswertung	(Agilent Technologies Inc., Santa Clara, Kalifornien, USA) EZ:faast™ Amino Acid Derivative Mass Spectral Library (Phenomenex LTD, Aschaffenburg)

2.2.4.2 Solid Phase Microextraction (SPME)-GC/MS für die Analyse flüchtiger Metabolite

GC	Agilent 7890A (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, Kalifornien, USA)
Autosampler	CTC CombiPAL ausgerüstet mit SPME-Vorrichtung und Agitator (CTC Analytics AG, Zwingen, Schweiz)
SPME-Phase	75 µm corboxen/polydimethylsiloxane (CAR/PDMS) (Supelco, Bellefonte, Pennsylvania, USA)
Autosampler-Zyklus	Inkubationstemperatur: 30 °C Vial-Eindringtiefe: 22 mm Extraktionszeit: 30 min Schüttelgeschwindigkeit: 250 rpm Desorption: GC-Injektor Injektor-Eindringtiefe: 54 mm Desorptionszeit: 10 min
Injektor	Split/Splitless-Injektor Temperatur: 250 °C
Injektion	Splitless injection für 6 min
Temperaturen GC	Injektor: 250 °C Transferline: 250 °C
Kapillarsäule	ZB-Wax 60 m x 0,25 mm (ID); 0,25 µm (FD) (Zebron, Phenomenex LTD, Aschaffenburg)
Trägergas	Helium 5.0 konstanter Fluss von 1,03 mL/min
Temperaturprogramm	30°C (15 min isotherm) 3 °C/min bis 50 °C 4 °C/min bis 110 °C 5 °C/min bis 150 °C 10 °C/min bis 250 °C (10 min isotherm) Laufzeit: 64,67 min

MSD	Agilent 5975C
Ionisation	Elektronenstoßionisation (EI positiv), 70 eV
Temperaturen MSD	MS Ionenquelle: 230 °C MS Quadrupol: 150 °C
Photomultiplier	1212 V
Scanbereich	m/z 29 - 150
Scanrate	9,93 scans/sec
Datenaufnahme und Datenauswertung	MSD ChemStation E.02.00.493 (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, Kalifornien, USA) NIST MS Search 2.0 (FairCom Corporation, Columbia, Missouri, USA)

2.2.5 Sonstige Geräte

Autoklaven	Zirbus LVSA 50/70 (Zirbus Technology, Bad Grund) Systec V 95 (Systec GmbH, Wettenberg)
Gel-Dokumentations- system	INTAS-Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen
Gelelektrophorese	Spannungsquelle: Consort E835 (Consort nv, Turnhout, Belgien) Kammer: Roth (Carl Roth GmbH & Co. KG)
Inkubator	Forma (Thermo, Cambridge, England)
Lyophilisator	Savant ModulyoD Freeze Dryer (Thermo, Cambridge, England)
Nanodrop	Nanodrop 1000 Spectrophotometer (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen)
pH-Meter	CG 820 (Schott Geräte GmbH, Mainz)
Reagenzglasschüttler	Vortex-Genie [®] 2 (Scientific Industries Inc., Bohemia, New York, USA)
Schüttelinkubator	GFL3033 (Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel)
Spektralphotometer	Nicolet evolution 100 (Thermo, Cambridge, England)
Sterile Werkbank	Hera safe (Heraeus Holding GmbH, Hanau)
Thermocycler	Mastercycler gradient (Eppendorf AG, Hamburg) Primus 96 plus (MWG Biotech AG / Eurofins MWG Operon, Ebersberg)
Thermomixer	Thermomixer comfort 1,5 & 2 mL (Eppendorf AG, Hamburg)

Ultraschallbad	RK103H (Bandelin Electronic GmbH & Co. KG, Berlin)
Ultraschall-Homogenisator	Ultraschall-Homogenisator: Sonoplus UW 2070 Sonotrode: MS 73 (Bandelin Electronic GmbH & Co. KG, Berlin)
UV-Transilluminator	Min UVIS (Desaga GmbH, Heidelberg)
Waagen	TP 214 (Denver Instrument, Bohemia, New York, USA) Scout Pro SP U 4001 (Ohaus, Pine Brook, New Jersey, USA)
Wasserbad	HC 5/6 (Julabo Labortechnik, Seelbach)
Zentrifugen	Sigma 4K15 (Sigma, Osterode) Eppendorf Centrifuge 5415 R (Eppendorf AG, Hamburg) Eppendorf miniSpin (Eppendorf AG, Hamburg)

2.2.6 Software und Internetressourcen

- Datenbank für den Abgleich von LC/MS-Metabolitspektren:
METLIN Metabolite and Tandem MS Database
(Scripps Center for Metabolomics, La Jolla, Kalifornien, USA)
(http://metlin.scripps.edu/metabo_search_alt2.php)
- Datenbank für die Sequenzierung von Peptidfragmenten nach Verdau und LC-MS/MS-Analyse
Mascot Search (Matrix Science Ltd., London, England)
(http://www.matrixscience.com/help/scoring_help.html)
- Datenbank für Stoffwechselwege:
KEGG Pathway Database (Kanehisa Laboratories, Kyoto University / University of Tokyo, Japan)
(<http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>)
- Server für die dreidimensionale Darstellung von Proteinmodellen basierend auf bekannten Strukturen von homologen Proteinen:
3D-JIGSAW Version 2.0 (Cancer Research UK, London, England)
(<http://bmm.cancerresearchuk.org/~3djigsaw/>)
- Programm für die dreidimensionale Darstellung und Bearbeitung von Proteinmodellen:
RasMol Version 2.7.5 (Biomolecular Structures Group, Glaxo Wellcome Research & Development, Stevenage, England)
(<http://rasmol.org/>)

2.3 Methoden

2.3.1 Grundlegende mikrobiologische Arbeitsmethoden

2.3.1.1 Anlegen von Glycerolkulturen

Die Archivierung der Organismen erfolgte als Glycerolkulturen, die bei - 80 °C gelagert wurden. 700 µL durch Zentrifugieren ankonzentrierte frische Kultur wurden mit 700 µL Glycerol für Cryostocks (Mülhardt, 2006) gemischt und anschließend eingefroren.

2.3.1.2 Messung der optischen Dichte bei 600 nm (OD₆₀₀)

Die Zelldichte von Bakterien im Medium bzw. im Puffer wurde photometrisch durch Messung der optischen Dichte bei 600 nm und einer Schichtdicke von 1 cm bestimmt. Das Spektralphotometer wurde auf das jeweilige Medium kalibriert. Bei einer OD₆₀₀ > 1 wurde die Probe vor der Messung mit dem jeweiligen Medium verdünnt.

2.3.1.3 Kulturbedingungen

mMRS-Agar-Platten wurden mit Glycerolkulturen der jeweiligen Arten bzw. Stämme beimpft und bei 30 °C für 2 Tage kultiviert. Anschließend wurden diese mit Parafilm® verschlossen und bei 4 °C für maximal 7 Tage gelagert.

Um Stämme für Peptidversuche mit *Resting Cells* zu kultivieren, wurden 2 mL mMRS-Medium mit einer Kolonie beimpft und über Nacht bei 30 °C inkubiert. 20 mL mMRS-Medium, welches in Anlehnung an die Rohwurstmatrix lediglich 0,3 % Glucose und keine Maltose beinhaltete, wurden mit den Übernachtskulturen angeimpft und für 5 - 7 Stunden bei 30 °C inkubiert. Die Länge der Inkubation richtete sich nach dem Erreichen der stationären Wachstumsphase (2.3.1.4), welche photometrisch durch Messung der OD₆₀₀ bestimmt wurde (2.3.1.2). Die Zellen wurden durch Zentrifugieren geerntet (3000 x g, 5 min).

Um große Mengen Bakterien für die Proteinaufreinigung zu kultivieren, wurden 4x 2 mL mMRS-Medium mit einer Kolonie beimpft und 8 - 10 Stunden bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurden mit diesen Vorkulturen 4x 5 L mMRS-Medium angeimpft und über Nacht bei 30 °C inkubiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugieren geerntet (3000 x g, 5 - 15 min).

2.3.1.4 Bestimmung von Wachstumskurven der Bakterienstämme

Um den Zeitpunkt der stationären Wachstumsphase der Bakterienstämme anhand der OD_{600} bestimmen zu können, wurden Wachstumskurven für die verwendeten Milchsäurebakterien erstellt. Hierfür wurden wie in 2.3.1.3 beschrieben Kolonien der Stämme *L. sakei* TMW 1.1322, *L. sakei* TMW 1.1383 und *L. sakei* TMW 1.1393 kultiviert und 2 mL mMRS-Medium damit angeimpft. Nach 15 Stunden Wachstum bei 30 °C wurden 200 μ L der Vorkultur entnommen, 20 mL mMRS-Medium (0,3 % Glucose, keine Maltose) damit beimpft und unter den gleichen Bedingungen inkubiert. Stündlich wurden Proben entnommen und die OD_{600} photometrisch bestimmt. Dieser Ansatz wurde für jeden Bakterienstamm in Dreifachbestimmung durchgeführt.

2.3.2 **Grundlegende analytische Arbeitsmethoden**

2.3.2.1 Messung von flüchtigen Metaboliten

Die Bestimmung wichtiger flüchtiger Metabolite aus dem Aminosäurestoffwechsel fand durch Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC/MS) statt. Für die Probenahme wurde die „*Solid Phase Microextraction*“ (Festphasenmikroextraktion, SPME) verwendet. Hierfür wurde im Rahmen des dieser Arbeit zugrundeliegenden AiF-Projektes ein entsprechendes Gerät angeschafft und in Betrieb genommen. Durch Auswahl einer SPME-Phase und Anpassung der GC/MS-Bedingungen zur Trennung und Identifizierung der flüchtigen Substanzen wurde eine Methode entwickelt (2.2.4.2), mit der anschließend die qualitative Analyse und die Quantifizierung der flüchtigen Substanzen durchgeführt wurden. In Abbildung 53 (Anhang) ist das „*total ion chromatogram*“ (Totalionenchromatogramm, TIC) der flüchtigen Substanzen nach 7-tägiger Fermentation aus dem mMRS-Medium dargestellt. Als interner Standard wurde 1,2-Dimethoxyethan in einer Konzentration von 19,24 nMol/mL eingesetzt.

Die Auswertung der aus den zugesetzten Aminosäuren während der Fermentation gebildeten Verbindungen mittels GC/MS zeigte, dass in dem verwendeten mMRS-Medium zahlreiche flüchtige Verbindungen nachweisbar sind (Abbildung 53, Anhang). Für diese Studie wurden deshalb nur die aus den zugesetzten Aminosäuren resultierenden Verbindungen ausgewertet. In Tabelle 5 sind die flüchtigen Metabolite, sowie die zur Auswertung der Massenspektren ausgewählten Fragment-Ionen dargestellt.

Tabelle 5: Flüchtige Metabolite der zugesetzten Aminosäuren und deren zur Auswertung ausgewählte Fragment-Ionen.

Aminosäure	Flüchtiger Metabolit / IS	Massenspur (m/z)
Valin	2-Methylpropanal	72
	2-Methyl-1-propanol	74
	2-Methylpropansäure	88
Leucin	3-Methylbutanal	71
	3-Methyl-1-butanol	70
	3-Methylbuttersäure	87
Isoleucin	2-Methylbutanal	57
Phenylalanin	Phenylacetaldehyd	91
	Benzaldehyd	105
Methionin	3-(Methylthio)-propanal (Methional)	48
	Dimethyldisulfid	94
	1,2-Dimethoxyethan (IS)	90

2.3.2.2 Quantifizierung von flüchtigen Metaboliten

Die Quantifizierung der flüchtigen Metabolite wurde durch eine Kalibrierung mit käuflich erworbenen Standards und der dargestellten Methode zur Bestimmung der flüchtigen Metabolite (2.2.4.2) durchgeführt. Um die variierende Sensibilität der SPME-GC/MS zu berücksichtigen, wurde auch hier bei allen Messungen der interne Standard 1,2-Dimethoxyethan zugesetzt. Durch die Verwendung der SPME-Phase zur Probenahme war eine Kalibrierung über relative Responsefaktoren (RRF) nicht möglich, da der RRF nicht konstant war und für die Beobachtung der Bildung der flüchtigen Metabolite ein großer Konzentrationsbereich berücksichtigt werden musste (Abbildung 11).

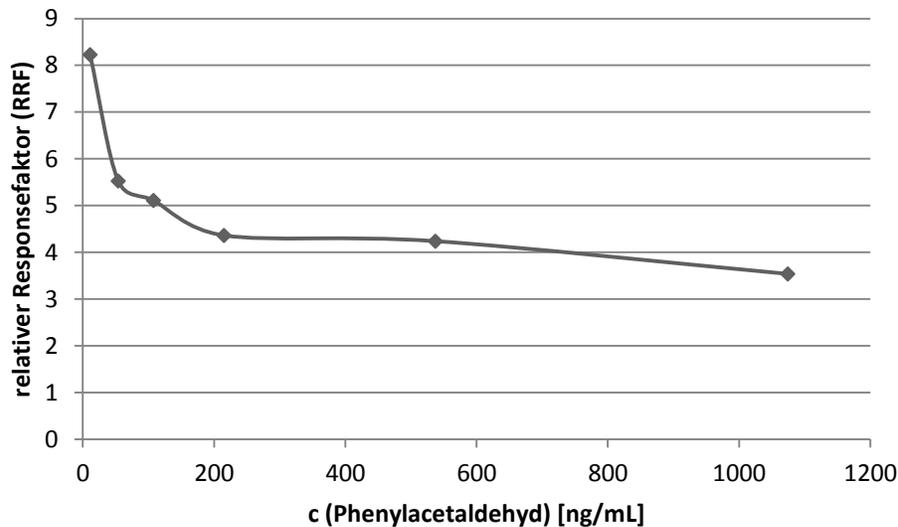


Abbildung 11: Verlauf des relativen Responsefaktors (RRF) in Abhängigkeit von der Konzentration des Metabolit Phenylacetaldehyd. Interner Standard 1,2-Dimethoxyethan.

Aus diesem Grund wurde die Kalibrierung über die Berechnung der relativen Konzentration durchgeführt und mit ihr Kalibrierkurven erstellt. Die relative Konzentration ergibt sich durch Gleichsetzung der Verhältnisse von Konzentration zu Fläche des Kalibrierstandards und des internen Standards.

$$\frac{c(\text{Std})}{A(\text{Std})} = \frac{c(\text{IS})}{A(\text{IS})}$$

c (Std)	Konzentration des Kalibrierstandards
A (Std)	Fläche des Peaks des Kalibrierstandards
c (IS)	Konzentration des internen Standards 1,2-Dimethoxyethan
A (IS)	Fläche des Peaks des internen Standards 1,2-Dimethoxyethan

Somit erhält man die relative Konzentration des Kalibrierstandards bezogen auf den internen Standard 1,2-Dimethoxyethan durch folgende Berechnung:

$$c_{\text{rel}}(\text{Std}) = \frac{c(\text{IS})}{A(\text{IS})} \cdot A(\text{Std})$$

$c_{\text{rel}}(\text{Std})$	relative Konzentration des Kalibrierstandards
A (Std)	Fläche des Peaks des Kalibrierstandards
c (IS)	Konzentration des internen Standards 1,2-Dimethoxyethan
A (IS)	Fläche des Peaks des internen Standards 1,2-Dimethoxyethan

Trägt man die bekannte absolute Konzentration der Kalibrierstandards gegen die relative Konzentration auf, erhält man Kalibrierkurven die durch polynomische Gleichungen darstellbar sind. Für jede Substanz wurde die Kalibrierung in Dreifachbestimmung durchgeführt und der Durchschnitt gebildet (Abbildung 55 bis Abbildung 63, Anhang).

Nach dem Auflösen der polynomischen Gleichungen ist die Berechnung der absoluten Konzentration in Abhängigkeit vom internen Standard 1,2-Dimethoxyethan möglich (Tabelle 6).

Tabelle 6: Gleichungen zur Berechnung der Konzentrationen der flüchtigen Metabolite aus den zugesetzten Aminosäuren.

Substanz	Relative Konzentration [nMol/mL]	Absolute Konzentration [ng/mL] bzw. [µg/mL]
2-Methylpropanal	$y = -0,0046x^2 + 0,7845x + 12,505$	$x = -\sqrt{\frac{y - 45,95284}{0,0046}} + 85,271739$
2-Methylpropansäure	$y = 0,00008x^2 + 0,0034x$	$x = \sqrt{\frac{y + 0,036125}{0,00008}} - 21,25$
3-Methylbutanal	$y = -0,00009x^2 + 0,2569x$	$x = -\sqrt{\frac{y - 183,32669}{0,00009}} + 1427,2$
3-Methyl-1-butanol	$y = -0,00002x^2 + 0,0659x$	$x = -\sqrt{\frac{y - 54,285125}{0,00002}} + 1647,5$
3-Methylbuttersäure	$y = 0,00008x^2 + 0,0101x$	$x = \sqrt{\frac{y + 0,3187812}{0,00008}} - 63,1255$
Phenylacetaldehyd	$y = 0,00001x^2 + 0,0304x$	$x = \sqrt{\frac{y + 23,104}{0,00001}} - 1520$
Benzaldehyd	$y = 0,0002x^2 + 0,4936x$	$x = \sqrt{\frac{y + 304,5512}{0,0002}} - 1234$
Methional	$y = 0,000002x^2 + 0,0033x$	$x = \sqrt{\frac{y + 1,36125}{0,000002}} - 825$
Dimethyldisulfid	$y = -0,0117x^2 + 10,108x$	$x = -\sqrt{\frac{y - 2183,1552}{0,0117}} + 431,96581$

x = absolute Konzentration [ng/mL], Ausnahme: 3-Methylbuttersäure & 2-Methylpropansäure: [µg/mL]; y = relative Konzentration [nMol/mL]

Die relative Konzentration der Substanz in der Probe, c_{rel} (Probe), berechnet sich analog zur Berechnung der relativen Konzentration in der Kalibrierlösung nach folgender Formel:

$$c_{\text{rel}} (\text{Probe}) = \frac{c (\text{IS})}{A (\text{IS})} \cdot A (\text{Probe})$$

c_{rel} (Probe)	relative Konzentration der Substanz in der Probe
A (Probe)	Fläche des Peaks des Substanz in der Probe
c (IS)	Konzentration des internen Standards 1,2-Dimethoxyethan
A (IS)	Fläche des Peaks des internen Standards 1,2-Dimethoxyethan

Somit ergeben sich nach Einsetzen der relativen Konzentrationen der Substanz in der Probe in die in Tabelle 6 dargestellten Gleichungen die absoluten Konzentrationen. Durch diese Methode konnte eine geräteunabhängige Bestimmung der Konzentrationen der flüchtigen Metabolite in den Fermentationssuspensionen stattfinden.

2.3.2.3 Messung der Konzentration an freien Aminosäuren

Die Bestimmung der freien Aminosäuren wurde mit dem käuflich erhältlichen EZ:faast™-Kit (Phenomenex LTD, Aschaffenburg) durchgeführt. Hierfür wurden 100 μL Überstand der Fermentationssuspension nach Abtrennung der Zellen durch Zentrifugieren und Verdünnung verwendet. Den Angaben des Herstellers folgend wurde die Probe mit dem internen Standard Norvalin versetzt und anschließend die Begleitstoffe durch eine Festphasenreinigung an einem Ionenaustauscherharz abgetrennt. Die gereinigten Aminosäuren wurden nach Vorsäulenderivatisierung durch GC/MS getrennt (2.2.4.1). In Abbildung 54 (Anhang) ist das TIC der freien Aminosäuren aus dem mMRS-Medium dargestellt. Da die Nachweisgrenze mit 1 nMol/mL sehr niedrig und die Wiederfindung der Aminosäuren sehr hoch ist, können mit dieser Methode auch kleinste Änderungen im Gehalt an freien Aminosäuren gemessen werden.

Die Quantifizierung der freien Aminosäuren wurde mithilfe der durch den Hersteller mitgelieferten Kalibrierstandards durchgeführt. Dabei wurden Aminosäurelösungen in drei unterschiedlichen Konzentrationen hergestellt (50 nM/mL, 100 nM/mL und 200 nM/mL) und auf die gleiche Weise derivatisiert wie für freie Aminosäuren in Fermentationssuspensionen beschrieben. Nach GC/MS-Trennung wurde der relative Responsefaktor (RRF) für jede Aminosäure nach folgender Formel bestimmt.

$$\text{RRF} = \frac{c_{\text{AS}} (\text{Std}) \cdot A (\text{IS})}{c (\text{IS}) \cdot A_{\text{AS}} (\text{Std})}$$

RRF	relativer Responsefaktor
$c_{\text{AS}} (\text{Std})$	Konzentration des Aminosäure-Kalibrierstandards
$A_{\text{AS}} (\text{Std})$	Fläche des Peaks des Aminosäure-Kalibrierstandards
$c (\text{IS})$	Konzentration des internen Standards Norvalin
$A (\text{IS})$	Fläche des Peaks des internen Standards Norvalin

Da sich die relativen Responsefaktoren über alle Konzentrationsbereiche hinweg konstant verhielten, konnten sie für alle Berechnungen der Konzentration an freien Aminosäuren herangezogen werden. Die Konzentration der Aminosäure in der Fermentations-suspension wurde somit nach folgender Formel berechnet:

$$c_{\text{AS}} (\text{Probe}) = \frac{\text{RRF} \cdot c (\text{IS}) \cdot A_{\text{AS}} (\text{Probe})}{A (\text{IS})}$$

$c_{\text{AS}} (\text{Probe})$	Konzentration der Aminosäure in der Probe
$A_{\text{AS}} (\text{Probe})$	Fläche des Peaks der Aminosäure in der Probe
$c (\text{IS})$	Konzentration des internen Standards Norvalin
$A (\text{IS})$	Fläche des Peaks des internen Standards Norvalin
RRF	relativer Responsefaktor

In Tabelle 7 sind für jede Aminosäure die zur Auswertung der Massenspektren ausgewählten Fragment-Ionen, sowie der relative Responsefaktor dargestellt.

Tabelle 7: Zur Auswertung ausgewählte Fragment-Ionen und relative Responsefaktoren (RRF) der derivatisierten Aminosäuren.

Aminosäure	Massenspur (<i>m/z</i>)	RRF
Alanin	130	0,17
Asparagin	202	6,86
Asparaginsäure	216	0,12
Cystin	174	0,44
Glutamin	84	0,39
Glutaminsäure	230	0,38
Glycin	162	2,81
Histidin	282	0,54
4-Hydroxyprolin	172	0,15
Isoleucin	172	0,14
Leucin	172	0,1
Lysin	170	0,1
Methionin	203	0,42
Norvalin (IS)	159	-
Ornithin	286	2,06
Phenylalanin	190	0,27
Prolin	156	0,11
Serin	146	0,56
Threonin	101	0,2
Tryptophan	130	0,03
Tyrosin	107	0,09
Valin	159	1,71

2.3.2.4 Messung der Konzentration an Dipeptiden

Der Gehalt an Dipeptiden in den Fermentationssuspensionen wurde durch LC-UV/ESI-MSⁿ bestimmt (2.2.2). Hierfür wurden 5 µL des Überstandes der Fermentationssuspensionen nach Abtrennung der Zellen durch Zentrifugieren direkt verwendet. In Abbildung 64 (Anhang) ist das Massenspektrum (positiver Modus) des Signals mit der Retentionszeit 17,4 min einer LC-UV/ESI-MSⁿ-Analyse des Dipeptides Phe-Val (*M* = 264,33 g/mol) mit einer Konzentration von 2 mMol/L in mMRS-Medium dargestellt. Es ist das Pseudomolekülion bei *m/z* 265 ([Phe-Val + H]⁺) zu erkennen, welches dem Dipeptid entspricht.

In Tabelle 8 sind für jedes Peptid das Molekulargewicht sowie deren Fragmentierungsmuster dargestellt. Für die Auswertung der Massenspektren wurde die Massenspur der $[M + H]^+$ -Ionen ausgewählt.

Tabelle 8: Fragmentierungsmuster der durch LC-UV/ESI-MSⁿ analysierten Di- und Tetrapeptide.

Peptid	Molekulargewicht [g/mol]	MS (<i>m/z</i>)	MS2 (<i>m/z</i>)
Leu-Leu	244,34	245 $[M + H]^+$	86, 199, 132
Leu-Met	262,37	263 $[M + H]^+$	149, 86, 169
Met-Leu	262,37	263 $[M + H]^+$	104, 215 131
Met-Phe-Leu-Val	508,67	509 $[M + H]^+$	379, 231, 279
Phe-Met-Val-Leu	508,67	509 $[M + H]^+$	392, 231, 279
Phe-Val	264,33	265 $[M + H]^+$	120, 219, 247
Val-Phe	264,33	265 $[M + H]^+$	166, 120, 219

Auf eine Quantifizierung der Di- und Tetrapeptidkonzentrationen konnte verzichtet werden, da die eingesetzten Substrate während des Fermentationszeitraums nahezu vollständig abgebaut wurden (3.1.2.1, 3.1.3.3.1, 3.1.3.4.1).

2.3.2.5 Messung der Konzentration an D-Glucose

Die Konzentration der freien D-Glucose in den Fermentationssuspensionen wurde enzymatisch mit einem käuflich erhältlichen UV-Test zur Bestimmung von D-Glucose in Lebensmitteln und anderen Probematerialien (R-Biopharm AG, Darmstadt) durchgeführt. Gemessen wurde die in Abhängigkeit von der vorhandenen Menge an D-Glucose enzymatisch produzierte Menge an reduziertem Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (NADPH/H⁺). Hierfür wurde der Überstand der Fermentationssuspension nach Abtrennung der Zellen durch Zentrifugieren und Verdünnung eingesetzt. Anschließend wurde nach Zusatz von Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (NADP⁺) und Adenosin-5'-triphosphat (ATP) das Enzym Hexokinase zugegeben. D-Glucose wird durch das Enzym Hexokinase und ATP zu D-Glucose-6-phosphat unter gleichzeitiger Bildung von Adenosin-5'-diphosphat (ADP) phosphoryliert. Nach Zugabe des Enzyms Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase wird das gebildete D-Glucose-6-phosphat von NADP⁺ zu D-Gluconat-6-phosphat oxidiert. Es entsteht NADPH/H⁺. Die während der Reaktion gebildete Menge an NADPH/H⁺ ist der D-Glucose-Menge äquivalent. Dies war die Messgröße und wurde aufgrund seiner Absorption bei 340 nm bestimmt. Zu jeder Probe wurde ein Leerwert ohne

Probelösung gemessen, welcher die Grundabsorption der verwendeten Lösungen widerspiegelte und von der gemessenen Absorption der Probe subtrahiert wurde.

Dem Lambert-Beerschen Gesetz folgend konnte über die Berechnungsformel für die Bestimmung der Konzentration der Gehalt an D-Glucose berechnet werden:

$$c \text{ [g/L]} = \frac{V \cdot MG}{\varepsilon \cdot d \cdot v \cdot 1000} \cdot \Delta E$$

V	Testvolumen [mL] (hier: 3,02 mL)
v	Probevolumen [mL] (0,1 mL)
MG	Molekulargewicht D-Glucose [g/mol] (hier: 180,16 g/mol)
d	Schichtdicke [cm] (hier: 1 cm)
ε	Extinktionskoeffizient von NADPH/H ⁺ bei 340 nm [L • mol ⁻¹ • cm ⁻¹] (hier: 6,3 L • mol ⁻¹ • cm ⁻¹)
ΔE	Extinktionsdifferenz Probe-Leerwert

2.3.2.6 Messung der Konzentration an α -Ketoisocapronsäure

Der Gehalt an α -Ketoisocapronsäure (KIC) in Enzymassays (2.3.5.3) wurde durch HPLC-UV bestimmt (2.2.3). Hierfür wurden 20 μ L des Überstandes des Assaypuffers nach Abtrennung der durch Erhitzung ausgefällten Proteine durch Zentrifugieren direkt verwendet. Aufgrund der konjugierten Doppelbindungen in KIC absorbierte diese bei 210 nm und die gebildete Menge konnte bei einer Retentionszeit von 8 - 9 min detektiert werden (Abbildung 65, Anhang).

Die Quantifizierung der KIC wurde anhand einer Kalibriergerade des käuflich erworbenen Standards durchgeführt. Es wurden neun unterschiedliche Konzentrationen des Standards in Kalium-Phosphat-Puffer (50 mM; pH 7,4) in Dreifachbestimmung injiziert und aus den ermittelten Peakflächen der Durchschnitt gebildet (Abbildung 66, Anhang). Über die hierdurch erhaltene Geradengleichung konnte die Konzentration an KIC in den Enzymassays berechnet werden.

2.3.2.7 Messung der Konzentration an L-Glutaminsäure

Die Konzentration der freien L-Glutaminsäure in den Ansätzen zur Bestimmung der Enzymaktivität wurde enzymatisch mit einem käuflich erhältlichen Farb-Test zur Bestimmung von L-Glutaminsäure in Lebensmitteln und anderen Probenmaterialien (R-Biopharm AG, Darmstadt) durchgeführt. Gemessen wurde die in Abhängigkeit von der vorhandenen Menge an L-Glutaminsäure enzymatisch produzierte Menge eines

Formazan. Hierfür wurde der Überstand der Fermentationssuspension nach Abtrennung der durch Erhitzung ausgefällten Proteine durch Zentrifugieren eingesetzt. Anschließend wurden Puffer (pH 8,6), Iodnitrotetrazoliumchlorid (INT), Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid (NAD⁺) und die Enzyme Diaphorase sowie Glutamat-Dehydrogenase zugegeben. L-Glutaminsäure wird durch NAD⁺ in Gegenwart des Enzyms Glutamat-Dehydrogenase oxidativ zu 2-Oxoglutaminsäure desaminiert. Das entstehende NADH/H⁺ setzt INT in Gegenwart des Enzyms Diaphorase zu einem Formazan um, welches im Maximum im sichtbaren Bereich bei 492 nm gemessen wird. Zu jeder Probe wurde ein Leerwert ohne Probenlösung gemessen, welcher die Grundabsorption der verwendeten Lösungen widerspiegelte und von der gemessenen Absorption der Probe subtrahiert wurde.

Dem Lambert-Beerschen Gesetz folgend konnte über die Berechnungsformel für die Bestimmung der Konzentration der Gehalt an L-Glutaminsäure berechnet werden:

$$c \text{ [g/L]} = \frac{V \cdot MG}{\varepsilon \cdot d \cdot v \cdot 1000} \cdot \Delta E$$

V	Testvolumen [mL] (hier: 3,03 mL)
v	Probevolumen [mL] (0,2 mL)
MG	Molekulargewicht L-Glutaminsäure [g/mol] (hier: 147,13 g/mol)
d	Schichtdicke [cm] (hier: 1 cm)
ε	Extinktionskoeffizient von Formazan bei 495 nm [L · mMol ⁻¹ · cm ⁻¹] (hier: 19,9 L · mMol ⁻¹ · cm ⁻¹)
Δ E	Extinktionsdifferenz Probe-Leerwert

2.3.2.8 Messung der Konzentration an Acetylphosphat

Die Konzentration an Acetylphosphat in den Ansätzen zur Bestimmung der Acylphosphataseaktivität wurde nach einer Methode von Lipmann und Tuttle (1945) durchgeführt. Der Nachweis beruht auf der Reaktion von Acetylphosphat mit Hydroxylamin zu N-Hydroxyacetamid (Acetohydroxamsäure), welches im sauren Milieu mit Eisen(III) einen roten Chelatkomplex bildet, der durch seine Absorption bei 510 nm bestimmt wurde. Hierfür konnte direkt der Ansatz des Enzymassays für die Bestimmung der Acylphosphataseaktivität verwendet werden (2.3.6.4.1). Dieser (200 µL) wurde zu einer Mischung aus 1 mL Hydroxylamin-Lösung (2.1.9.3) und 1 mL Acetatpuffer (2.1.9.2) pipettiert und durch Zugabe von 0,8 mL dest. H₂O das Volumen auf 3 mL aufgefüllt. Während der 10-minütigen Reaktionszeit bei Raumtemperatur bildete sich die Acetohydroxamsäure. Anschließend wurden je 1 mL Salzsäure (8 M) zur Ansäuerung, Trichloressigsäure (12 %; w/w) zur Ausfällung der Proteine und Eisen(III)-chlorid-Lösung

(5 % in 0,1 N HCl; w/v) für die Komplexbildung (2.1.9.3) zugegeben. Durch Zentrifugieren (3000 x g, 20 min) wurden die ausgefällten Proteine abgetrennt und die Absorption bei 510 nm im Überstand photometrisch gemessen.

Die Quantifizierung erfolgte anhand einer Kalibriergerade mit drei unterschiedlichen Konzentrationen an Acetylphosphat. Der Standard wurde in Triethanolamin-Puffer gelöst und die oben beschriebene Reaktion durchgeführt. Aus den ermittelten Absorptionen wurde eine Kalibriergerade gebildet (Abbildung 67, Anhang). Über die hierdurch ermittelte Geradengleichung konnte die Konzentration an Acetylphosphat in den Enzymassays für die Bestimmung Acylphosphataseaktivität berechnet werden.

2.3.3 Allgemeine molekularbiologische Techniken

2.3.3.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Zur Amplifizierung von DNA wurde die Polymerasekettenreaktion (PCR) eingesetzt. Für Klonierungszwecke wurde eine Polymerase mit 3'-5'-Exonucleaseaktivität (KOD Hot Start DNA Polymerase, Merck KGaA, Darmstadt), für die Kolonie-PCR die Taq-Polymerase (Taq Core Kit, MP Biomedicals, Solon, Ohio, USA) verwendet. Die Pipettierschemata für einen 50 µL-Ansatz mit der KOD- bzw. einen 25 µL-Ansatz mit der Taq-Polymerase sind in Tabelle 9 angegeben. Genomische DNA wurde mit dem E.Z.N.A. Bacterial DNA Kit (Omega Bio-Tek Inc., Norcross, Georgia, USA) aus *L. sakei* TMW 1.1322 gewonnen.

Tabelle 9: Pipettierschemata der Polymerasekettenreaktionen.

KOD Hot Start DNA Polymerase (Amplifizierung)	Taq Core Kit (Kolonie-PCR)
5 µL Puffer	2,5 µL Puffer
3 µL Magnesiumsulfat	-
5 µL dNTPs	0,5 µL dNTPs
0,15 µL <i>for</i> Primer (100 µM)	0,15 µL <i>for</i> Primer (100 µM)
0,15 µL <i>rev</i> Primer (100 µM)	0,15 µL <i>rev</i> Primer (100 µM)
1 µL Template (genomische DNA)	Template (Koloniematerial)
34,7 µL bidest. H ₂ O	21,55 µL bidest. H ₂ O
1 µL KOD Polymerase	0,15 µL Taq Polymerase

Die PCR wurde anschließend mit den im Folgenden genannten Temperaturprogrammen durchgeführt.

Amplifizierung mit KOD DNA-Polymerase:

32 x	[2 min	95 °C	Initiale Denaturierung
		20 sec	95 °C	Denaturierung
		10 sec	53 °C	Annealing
		7 sec	70 °C	Elongation
		5 min	70 °C	Finale Elongation

Kolonie-PCR mit Taq-Polymerase:

32 x	[2 min	95 °C	Initiale Denaturierung
		20 sec	95 °C	Denaturierung
		40 sec	53 °C	Annealing
		40 sec	72 °C	Elongation
		5 min	72 °C	Finale Elongation

Für die Kolonie-PCR wurden zwei unterschiedliche Primer-Paare verwendet. Zum einen die für die Amplifizierung des putativen Acylphosphatasegens verwendeten Primer (Acylphosphatase-for und Acylphosphatase-rev, 2.1.6), zum anderen zwei auf dem Vektor pBAD/Myc-His B bindende Primer (pBAD-for und pBAD-rev, 2.1.6).

2.3.3.2 Agarosegelelektrophorese und Dokumentation

Die analytische Auftrennung der DNA erfolgte in 1 %igen Agarosegelen mit 0,5x TBE-Puffer (2.1.9.2) bei einer Feldstärke von 140 mV als horizontale Gelelektrophorese. Vor dem Einbringen in die Geltaschen wurden die DNA-Proben mit 1/5 Volumen DNA-Auftragspuffer (2.1.9.2) versetzt. Zur späteren Auswertung und Größenbestimmung der DNA-Fragmente wurde ein DNA-Längenstandard (GeneRuler™ 100 bp bzw. GeneRuler™ 1 kb; Abbildung 12) aufgetragen. Nach der Elektrophorese wurden die Gele für mindestens 15 min im Dimidiombromid-Bad gefärbt, mittels des UV-Transilluminators visualisiert und durch das Gel-Dokumentationssystem digitalisiert (2.2.5).

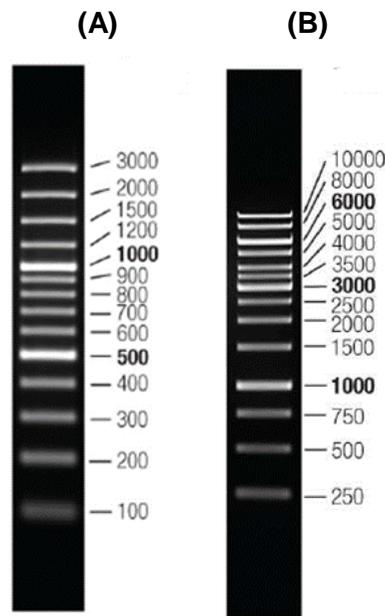


Abbildung 12: DNA-Längenstandards GeneRuler™ 100 bp (A) bzw. 1 kb (B) DNA Ladder

2.3.3.3 DNA-Aufreinigung

Die Aufreinigung von PCR-Produkten und Restriktionsansätzen erfolgte mit einem kommerziellen Aufreinigungs-Kit (E.Z.N.A. Cycle Pure Kit, Omega Bio-Tek Inc., Norcross, Georgia, USA), das nach den Angaben des Herstellers verwendet wurde. Plasmide wurden mittels des peqGOLD plasmid miniprep Kit (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen) den Angaben des Herstellers folgend aufgereinigt. Die anschließende Konzentrationsmessung von PCR-Produkten, Restriktionsansätzen und aufgereinigten Plasmiden wurde photometrisch mit Nanodrop (2.2.5) durchgeführt.

2.3.3.4 Restriktionsverdau

Das Schneiden der DNA an den spezifischen Restriktionsschnittstellen wurde mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen (*NcoI* und *XbaI*) den Angaben des Herstellers folgend durchgeführt und für 20 min bei 37 °C inkubiert. Der Restriktionsansatz wurde über ein Agarosegel elektrophoretisch überprüft (2.3.3.2) und anschließend mit dem Aufreinigungs-Kit (2.3.3.3) präpariert.

Die Restriktionsansätze für den Vektor und das PCR-Produkt wurden nach dem folgenden Pipettierschema angesetzt (Tabelle 10):

Tabelle 10: Pipettierschemata der Restriktionsansätze.

Vektor	PCR-Produkt
0,5 µg Vektor (= 108 µL)	2 µg PCR-Produkt (= 27 µL)
15 µL 10x Puffer (FD)	10 µL 10x Puffer (FD)
5 µL <i>NcoI</i> (FD)	10 µL <i>NcoI</i> (FD)
5 µL <i>XbaI</i> (FD)	10 µL <i>XbaI</i> (FD)
5 µL FastAP™ Phosphatase	-
12 µL bidest. H ₂ O	43 µL bidest. H ₂ O

2.3.3.5 Ligation

Die mit *NcoI* und *XbaI* geschnittenen PCR-Produkte wurden unter Verwendung der T4-DNA-Ligase in den ebenso verdauten kommerziellen Vektor pBAD/*Myc*-His B (2.1.4) ligiert. Die nötigen Ligationen zur Vektorerstellung wurden mit 45 ng (I) bzw. 90 ng (II) Vektor und 170 ng PCR-Produkt durchgeführt, alle verwendeten Puffer und Enzyme stammten von Fermentas GmbH (St. Leon-Rot). Die Ligation erfolgte für 1 h bei 22 °C. Anschließend wurde durch 15 min Inkubation bei 65 °C inaktiviert.

Die Ligationen wurden nach dem folgenden Pipettierschema angesetzt (Tabelle 11):

Tabelle 11: Pipettierschemata der Ligationen

I	II
0,5 µL Vektor	1 µL Vektor
15 µL PCR-Produkt	15 µL PCR-Produkt
0,5 µL T4-DNA-Ligase	0,5 µL T4-DNA-Ligase
2 µL Ligase-Puffer	2 µL Ligase-Puffer
2 µL bidest. H ₂ O	1,5 µL bidest. H ₂ O

2.3.3.6 Herstellung kompetenter *Escherichia coli* TOP10 Zellen

100 mL LB-Medium wurden 1 %ig mit einer Übernachtskultur von *E. coli* TOP10-Zellen angeimpft und bei 37 °C und 180 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 - 0,6 inkubiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugieren geerntet (3000 x g; 5 min; 4 °C) und mit 30 mL Calciumchlorid-Lösung (0,1 M; 4 °C) gewaschen. Nach dem Zentrifugieren (3000 x g;

5 min; 4 °C) wurde das Pellet in 2 mL Calciumchlorid-Lösung (0,1 M; 15 % Glycerol; 4 °C) resuspendiert. Die in 200 µL-Chargen aliquotierte Zellsuspension wurde direkt für die Transformation verwendet oder bei -80 °C gelagert.

2.3.3.7 Transformation von *Escherichia coli* TOP10 Zellen

Für die Transformation wurden 200 µL der kompetenten *E. coli* Zellen auf Eis aufgetaut, mit 8 µL Ligationsansatz versetzt und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock bei 42 °C für 90 s folgte eine weitere Inkubationzeit von 2 min auf Eis. Anschließend wurde 1 mL LB-Medium hinzugegeben und die Zellen unter Schütteln bei 37 °C für 30 min inkubiert. Nach dem Ausplattieren auf LB-Agar-Platten (100 µg/mL Ampicillin) wuchsen die Kolonien über Nacht bei 37 °C im Brutschrank.

2.3.3.8 Kolonie-PCR

Zum Screening der Transformanten wurde eine Kolonie-PCR durchgeführt. Dazu wurde etwas Zellmaterial von den gewachsenen Kolonien in ein PCR-Reaktionsgefäß überführt und wie in 2.3.3.1 beschrieben eine PCR durchgeführt. Die Kolonie-PCR wurde über ein Agarosegel elektrophoretisch überprüft. Die Amplifikation des PCR-Fragments bestätigte die Insertion des Acylphosphatasesgens in den Vektor.

2.3.3.9 Sequenzierung von DNA

Klone, die bei der Kolonie-PCR Amplifikate der gewünschten Größe zeigten, wurden in 50 mL LB-Medium (100 µg/mL Ampicillin) über Nacht bei 37 °C unter Schütteln angezogen. Von diesen Kulturen wurde Plasmid mittels des peqGOLD plasmid miniprep Kit (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen) extrahiert und mit dem Primer pBAD-for (2.1.6) sequenziert (GATC Biotech GmbH, Konstanz), um die Korrektheit der Gensequenz zu überprüfen.

2.3.4 **Durchführung der Aminosäure- und Peptidversuche mit *Lactobacillus sakei***

2.3.4.1 Metabolisierung von Aminosäuren in mMRS-Medium

Um die physiologische Fähigkeit der *L. sakei*-Stämme Aminosäuren aufzunehmen und zu metabolisieren zu überprüfen, wurden Modellfermentationen in mMRS-Medium mit einem Zusatz von 50 mMol/L an Aminosäuren in Doppelbestimmung durchgeführt. Hierfür wurden wie in 2.3.1.3 beschrieben Kolonien der Stämme *L. sakei* TMW 1.1322, *L. sakei* TMW 1.1383 und *L. sakei* TMW 1.1393 kultiviert, 2 mL mMRS-Medium damit angeimpft

und über Nacht bei 30 °C unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurden 18 mL mMRS-Aminosäure-Stammlösung (2.1.9.1), in denen je eine der Aminosäuren L-Valin, L-Leucin, L-Isoleucin, L-Phenylalanin oder L-Methionin enthalten war, sowie ein Blindwert ohne Substratzugabe, mit den Übernachtskulturen angeimpft und 7 Tage bei 30 °C unter Schütteln inkubiert.

Die Aminosäurekonzentrationen sowie die Konzentration an deren komplementären flüchtigen Metaboliten wurden zu Beginn und am Ende der Fermentation gemessen. Hierfür wurden 7 mL der Fermentationssuspensionen in ein steriles Zentrifugengefäß überführt und 5 min zentrifugiert (3000 x g; 15 °C). 5 mL der von Zellen befreiten Lösungen wurden für die Messung der flüchtigen Metabolite in ein 20 mL Headspace-Vial (VWR International GmbH, Darmstadt) überführt und nach Zusatz von 100 µL internem Standard durch SPME-GC/MS analysiert (2.3.2.1). Weitere 100 µL der von Zellen befreiten Lösungen wurden für die Bestimmung der Aminosäurekonzentrationen verdünnt (1:10) und nach Reinigung und Derivatisierung durch GC/MS analysiert (2.3.2.3).

Des Weiteren wurde die Entwicklung der Zellzahl während der gesamten Zeit beobachtet, um auch hier eventuelle Unterschiede im Zellwachstum in den unterschiedlichen Ansätzen zu erkennen. Deshalb wurden an den Tagen 1 und 2 zweimal täglich, an den Tagen 3 bis 7 täglich Proben entnommen und die OD₆₀₀ wie in 2.3.1.2 beschrieben bestimmt.

2.3.4.2 Metabolisierung von Dipeptiden in mMRS-Medium

In diesen Versuchen wurden Modellfermentationen in mMRS-Medium mit einem Überangebot an freien Aminosäuren und Dipeptiden durchgeführt. Hierdurch sollte die Aufnahme und die Metabolisierung von Peptidsubstraten durch die *L. sakei*-Stämme beobachtet werden. Des Weiteren sollten Unterschiede im Ausmaß der Metabolisierung im Vergleich zu freien Aminosäuren und aufgrund der Stellung der Aminosäuren innerhalb der Peptide überprüft werden. Aufgrund der geringen Löslichkeit der Dipeptide wurden die folgenden Ansätze mit den angegebenen Konzentrationen durchgeführt (Tabelle 12).

Tabelle 12: Arbeitsplan zur vergleichenden Bestimmung der Metabolisierung von Dipeptiden und freien Aminosäuren in mMRS-Medium.

Versuch	Ansatz	Zusatz	Konzentration
LEU_MET	BW	mMRS + <i>L. sakei</i>	-
	Leu-Met	mMRS + <i>L. sakei</i> + Leu-Met	2 mMol/L
	Met-Leu	mMRS + <i>L. sakei</i> + Met-Leu	2 mMol/L
	Leu + Met	mMRS + <i>L. sakei</i> + Leu + Met	je 2 mMol/L
	Leu	mMRS + <i>L. sakei</i> + Leu	4 mMol/L
	Met	mMRS + <i>L. sakei</i> + Met	4 mMol/L
PHE_VAL	BW	mMRS + <i>L. sakei</i>	-
	Phe-Val	mMRS + <i>L. sakei</i> + Phe-Val	2 mMol/L
	Val-Phe	mMRS + <i>L. sakei</i> + Val-Phe	2 mMol/L
	Phe + Val	mMRS + <i>L. sakei</i> + Phe + Val	je 2 mMol/L
	Phe	mMRS + <i>L. sakei</i> + Phe	4 mMol/L
	Val	mMRS + <i>L. sakei</i> + Val	4 mMol/L

Hierfür wurden wie in 2.3.1.3 beschrieben Kolonien kultiviert, 2 mL mMRS-Medium damit angeimpft und über Nacht bei 30 °C unter Schütteln inkubiert. Für Ansätze mit Dipeptid-Zusatz wurden die Dipeptide in ein steriles 15 mL-Zentrifugengefäß eingewogen (Leu-Met: 10,5 mg; Met-Leu: 10,5 mg; Phe-Val: 10,6 mg; Val-Phe: 10,6 mg), in 18 mL mMRS-Medium (0,3 % Glucose, keine Maltose) gelöst und steril filtriert (0,45 µm). Für Ansätze mit Zusatz freier Aminosäuren wurden 1 mL (4 mMol/L) bzw. je 0,5 mL (je 2 mMol/L) Aminosäure-Stammlösung in H₂O dest. (2.1.9.3) zu 17 mL mMRS-Medium (0,3 % Glucose, keine Maltose) pipettiert. Die Lösungen wurden mit den Übernachtkulturen angeimpft und 7 Tage bei 30 °C unter schütteln inkubiert.

Die Aminosäure- und Dipeptidkonzentrationen sowie die Konzentration an deren komplementären flüchtigen Metaboliten wurden zu Beginn und am Ende der Fermentation gemessen. Hierfür wurden 7 mL der Fermentationssuspensionen in ein steriles Zentrifugengefäß überführt und 5 min zentrifugiert (3000 x g; 15 °C). 5 mL der von Zellen befreiten Lösungen wurden für die Messung der flüchtigen Metabolite in ein 20 mL Headspace-Vial (VWR International GmbH, Darmstadt) überführt und nach Zusatz von 100 µL internem Standard durch SPME-GC/MS analysiert (2.3.2.1). 1 mL der zentrifugierten Lösung wurde in ein Eppendorf®-Reaktionsgefäß (ERG) überführt und bis

zur Messung durch LC-UV/ESI-MSⁿ (2.3.2.4) bei -18 °C gelagert. Weitere 100 µL der von Zellen befreiten Lösungen wurden für die Bestimmung der Aminosäurekonzentrationen verdünnt (1:10) und nach Reinigung und Derivatisierung durch GC/MS analysiert (2.3.2.3).

Wie in 2.3.4.1 beschrieben wurde auch hier die Entwicklung der Zellzahl während der gesamten Zeit beobachtet. Der Arbeitsplan wurde in Doppelbestimmung mit dem Stamm *L. sakei* TMW 1.1322 durchgeführt.

2.3.4.3 Resting Cells (R/C)

Die Ergebnisse der Untersuchungen zur Metabolisierung von Dipeptiden in mMRS-Medium durch *L. sakei* (3.1.2) zeigten auf, dass eine Beobachtung der Metabolisierung von Aminosäure- und Peptidzusätzen in geringen Konzentrationen in mMRS-Medium schwierig ist. Um die biologische Variabilität einzuschränken und gezielt einzelne Substrate für die Metabolisierung bereitzustellen, wurde eine Biotransformationsmethode entwickelt, die es ermöglichte selbst geringste Unterschiede im Ausmaß der Metabolisierung von Aminosäuren und Peptiden zu messen.

Hierfür dienten Zellsuspensionen mit einer OD₆₀₀ von 1 in einem 50 mMolaren Natrium-Phosphat-Puffer bei pH 6,5. Wie in 2.3.1.3 beschrieben, wurden Zellen der Stämme *L. sakei* TMW 1.1322, *L. sakei* TMW 1.1383 und *L. sakei* TMW 1.1393 kultiviert und geerntet. Die geernteten Zellen wurden 2 x mit Natrium-Phosphat-Puffer (50 mM; pH 6,5) durch Resuspension und Zentrifugieren gewaschen. Anschließend wurde durch Resuspension bis zu einer OD₆₀₀ von 1 in Natrium-Phosphat-Puffer (50 mM; pH 6,5) eine Zellsuspension hergestellt.

In Vorversuchen wurde das Maximum der Bildung der flüchtigen Substanzen in Abhängigkeit von der Zeit ermittelt und das Ergebnis für die vergleichenden Messungen zwischen unterschiedlichen Stämmen verwendet. Hierfür wurden freie Aminosäuren in einer Konzentration von 4 mMol/L in einer Suspension aus *Resting Cells* gelöst und Fermentationen bei 30 °C durchgeführt. Täglich wurden die Aminosäurekonzentrationen im Puffer sowie die Bildung von flüchtigen Substanzen gemessen und beobachtet. Außerdem wurden die Zellsuspensionen bzw. Verdünnungen der Suspensionen täglich auf mMRS-Agar-Platten ausgestrichen, um ein Sterben der Zellen feststellen zu können. Des Weiteren wurde der Einfluss der Coenzyme α -Ketoglutar säure (10 mM) und Pyridoxal-5-phosphat (2 mM) auf die Bildung der flüchtigen Aminosäuremetabolite untersucht.

2.3.4.4 Metabolisierung von Aminosäuren und Dipeptiden durch *Resting Cells*

Um die Transporteffizienz von Dipeptiden und Aminosäuren in die Zelle und das Ausmaß ihrer Metabolisierung zu vergleichen, wurden mit der dargestellten Biotransformationsmethode (2.3.4.3) Fermentationsversuche mit drei verschiedenen Stämmen *L. sakei* (TMW 1.1322, TMW 1.1383 und TMW 1.1393) und drei verschiedenen Substratkombinationen aus Dipeptiden und Aminosäuren in äquimolaren Konzentrationen durchgeführt. Durch die Auswahl der Dipeptide wurde außerdem ermittelt, ob die Stellung der Aminosäuren innerhalb der Peptide eine Bevorzugung der zellulären Transportsysteme bzw. der für die Metabolisierung von Aminosäuren verantwortlichen Enzyme erkennen lässt (Tabelle 13).

Tabelle 13: Arbeitsplan zur vergleichenden Bestimmung der Metabolisierung von Dipeptiden und freien Aminosäuren durch *Resting Cells* (R/C).

Versuch	Ansatz	Zusatz	Konzentration
LEU_MET	BW I	R/C + <i>L. sakei</i>	-
	Leu-Met	R/C + <i>L. sakei</i> + Leu-Met	10 mMol/L
	Met-Leu	R/C + <i>L. sakei</i> + Met-Leu	10 mMol/L
	Leu + Met	R/C + <i>L. sakei</i> + Leu + Met	je 10 mMol/L
PHE_VAL	BW I	R/C + <i>L. sakei</i>	-
	Phe-Val	R/C + <i>L. sakei</i> + Phe-Val	10 mMol/L
	Val-Phe	R/C + <i>L. sakei</i> + Val-Phe	10 mMol/L
	Phe + Val	R/C + <i>L. sakei</i> + Phe + Val	je 10 mMol/L
LEU_LEU	BW I	R/C + <i>L. sakei</i>	-
	Leu-Leu	R/C + <i>L. sakei</i> + Leu-Leu	10 mMol/L
	Leu + Leu	R/C + <i>L. sakei</i> + Leu + Leu	je 10 mMol/L

Hierfür wurden wie in 2.3.4.3 beschrieben *Resting Cells* hergestellt. Für Ansätze mit Aminosäure- oder Dipeptid-Zusatz wurden die Substrate (Leu-Met: 39,4 mg; Met-Leu: 39,4 mg; Phe-Val: 39,7 mg; Val-Phe: 39,7 mg; Leu-Leu: 36,7 mg; Leu: 19,7 mg; Met: 22,4 mg; Phe: 24,8 mg; Val: 17,6 mg; Leu 20 mM: 39,4 mg) sowie die Coenzyme (α -Ketoglutar säure: 25,2 mg; PLP: 7,4 mg) in ein steriles 50 mL-Zentrifugengefäß eingewogen und in 15 mL *Resting Cells* gelöst. Für den Blindwert wurden die Coenzyme (α -Ketoglutar säure: 33,6 mg; PLP: 9,9 mg) in ein steriles 50 mL-Zentrifugengefäß

eingewogen und in 20 mL *Resting Cells* gelöst. Anschließend wurden bei Ansätzen mit Substrat-Zusatz je 2 x 5 mL, bei den Blindwerten 3 x 5 mL in ein steriles 20 mL Headspace-Vial überführt und 100 µL interner Standard zugefügt. Des Weiteren wurden je 4 x 1 mL der Fermentationssuspensionen in ein ERG pipettiert. Alle Ansätze wurden bei 30 °C inkubiert.

Die Aminosäure- und Dipeptidkonzentrationen, sowie die Menge an D-Glucose in den Fermentationssuspensionen wurden an den Tagen 0, 1, 3 (bzw. 4) und 5 bestimmt. Hierfür wurden die Fermentationsansätze in den ERGs zum jeweiligen Zeitpunkt durch Zentrifugieren von den Zellen getrennt und der Überstand verwendet. Je 100 µL der von Zellen befreiten Lösungen wurden verdünnt (1:10) und für die Bestimmung der Aminosäurekonzentrationen nach Reinigung und Derivatisierung durch GC/MS analysiert (2.3.2.3) bzw. enzymatisch die Konzentration an D-Glucose bestimmt (2.3.2.5). Für die Bestimmung der Peptidkonzentrationen wurde die verbleibende Menge der zentrifugierten Lösungen bis zur Messung durch LC-UV/ESI-MSⁿ (2.3.2.4) bei -18 °C gelagert. Die Konzentrationen der komplementären flüchtigen Metabolite wurden an den Tagen 0, 3 (bzw. 4) und 5 der Fermentation gemessen. Hierfür wurden die Fermentationsansätze in den 20 mL Headspace-Vials zum jeweiligen Zeitpunkt durch SPME-GC/MS analysiert (2.3.2.1). Der Wert des Blindwertes für den Tag 0 wurde auch für Ansätze mit Substratzusatz verwendet. Durch die Methode und das verwendete Gerät bedingt (2.3.2.1), war eine Messung der flüchtigen Bestandteile in den Ansätzen nicht zum exakt gleichen Zeitpunkt durchführbar. Deshalb wurden die Ergebnisse aus den drei Messpunkten jedes Ansatzes durch eine Funktion beschrieben und der Gehalt zu dem in Vorversuchen bestimmten Maximum der Metabolitbildung berechnet (3.1.3.1).

Der Arbeitsplan wurde in Dreifachbestimmung für alle verwendeten Stämme *L. sakei* durchgeführt. Als sich zeigte, dass die Ergebnisse aus den Aminosäure- und Glucose-Bestimmungen in den unterschiedlichen Versuchen (Tabelle 13) mit den verschiedenen Stämmen *L. sakei* die gleichen Ergebnisse lieferten, wurde hier auf eine Dreifachbestimmung verzichtet. Sie wurden jedoch für jede Substratkombination und für jeden Stamm *L. sakei* mindestens einmal ermittelt.

Außerdem wurden für die Blindwerte der flüchtigen Metabolite der Dipeptide und Aminosäuren in Natrium-Phosphat-Puffer die Substrate (Leu-Met: 13,1 mg; Met-Leu: 13,1 mg; Phe-Val: 13,2 mg; Val-Phe: 13,2 mg; Leu-Leu: 12,2 mg; Leu: 6,6 mg; Met: 7,5 mg; Phe: 8,3 mg; Val: 5,9 mg; Leu 20 mM: 13,1 mg), sowie die Coenzyme (α -Ketoglutarensäure: 8,4 mg; PLP: 2,5 mg) in ein steriles 20 mL Headspace-Vial

eingewogen, in 5 mL Natrium-Phosphat-Puffer (50 mM; pH 7,4) gelöst und 5 Tage bei 30 °C inkubiert. Die Konzentrationen der komplementären flüchtigen Metabolite wurden an den Tagen 0, 3 (bzw. 4) und 5 durch SPME-GC/MS analysiert (2.3.2.1). Dies wurde für Dipeptide in Einfachbestimmung, für freie Aminosäuren in Dreifachbestimmung durchgeführt.

2.3.4.5 Metabolisierung von Aminosäuren und Tetrapeptiden durch *Resting Cells*

Die in Abschnitt 2.3.4.3 beschriebene Biotransformationsmethode wurde auch verwendet, um die Transporteffizienz von Tetrapeptiden und Aminosäuren in die Zelle und das Ausmaß ihrer Metabolisierung zu vergleichen. Hierfür wurden Fermentationsversuche mit drei verschiedenen Stämmen *L. sakei* (TMW 1.1322, TMW 1.1383 und TMW 1.1393) und einer Substratkombination aus Tetrapeptiden und Aminosäuren in äquimolaren Konzentrationen durchgeführt. Durch die Auswahl der Tetrapeptide sollte ermittelt werden, ob die Stellung der Aminosäuren innerhalb der Peptide eine Bevorzugung der zellulären Transportsysteme bzw. der für die Metabolisierung von Aminosäuren verantwortlichen Enzyme erkennen lässt (Tabelle 14).

Tabelle 14: Arbeitsplan zur vergleichenden Bestimmung der Metabolisierung von Tetrapeptiden und freien Aminosäuren durch *Resting Cells* (R/C).

Versuch	Ansatz	Zusatz	Konzentration
	BW I	R/C + <i>L. sakei</i>	-
PHE_MET_	F-M-L-V	R/C + <i>L. sakei</i> + F-M-L-V	10 mMol/L
LEU_VAL	M-F-V-L	R/C + <i>L. sakei</i> + M-F-V-L	10 mMol/L
	F + M + L + V	R/C + <i>L. sakei</i> + F + M + L + V	je 10 mMol/L

Die Versuche wurden analog den in Abschnitt 2.3.4.4 beschriebenen Untersuchungen zur Metabolisierung von Aminosäuren und Dipeptiden durch *Resting Cells* durchgeführt. Aufgrund der schlechten Löslichkeit der Tetrapeptide wurden diese für die Bestimmung der Aminosäure-, Peptid- und D-Glucosekonzentrationen in ein steriles 15 mL Zentrifugengefäß bzw. für die Bestimmung der flüchtigen Metabolite in die 20 mL Headspace-Vials eingewogen (F-M-L-V: 25,4 mg; M-F-V-L: 25,4 mg) und je 5 mL *Resting Cells*, in denen die Coenzyme gelöst waren, zugegeben.

Der Arbeitsplan wurde in Dreifachbestimmung für alle verwendeten Stämme *L. sakei* durchgeführt. Als sich zeigte, dass die Ergebnisse aus den Aminosäure- und Glucose-

Bestimmungen in den unterschiedlichen Versuchen (Tabelle 14) mit den verschiedenen Stämmen *L. sakei* die gleichen Ergebnisse lieferten, wurde hier auf eine Dreifachbestimmung verzichtet. Sie wurden jedoch für jede Substratkombination und für jeden Stamm *L. sakei* mindestens einmal ermittelt.

Außerdem wurden für die Blindwerte der flüchtigen Metabolite der Tetrapeptide in Natrium-Phosphat-Puffer die Substrate (F-M-L-V: 25,4 mg; M-F-V-L: 25,4 mg) sowie die Coenzyme (α -Ketoglutar säure: 8,4 mg; PLP: 2,5 mg) in Einfachbestimmung in ein steriles 20 mL Headspace-Vial eingewogen, in 5 mL Natrium-Phosphat-Puffer (50 mM; pH 7,4) gelöst und 5 Tage bei 30 °C inkubiert. Die Konzentrationen der komplementären flüchtigen Metabolite wurden an den Tagen 0, 3 (bzw. 4) und 5 durch SPME-GC/MS analysiert (2.3.2.1).

2.3.4.6 Metabolitbildung anderer Starterkulturen aus der Rohwurstreifung

Um die Methode zu überprüfen und Unterschiede zwischen verschiedenen Starterkulturen zu erkennen, wurden die in Tabelle 13 (2.3.4.4) und Tabelle 14 (2.3.4.5) beschriebenen Versuche in Einfachbestimmung mit *L. plantarum* TMW 1.708 und *S. carnosus* TMW 2.801, zwei weiteren in der Rohwurstherstellung verwendeten Starterkulturen, durchgeführt. Die Versuche wurden analog den in Abschnitt 2.3.4.4 und Abschnitt 2.3.4.5 beschriebenen Untersuchungen zur Metabolisierung von Aminosäuren und Dipeptiden bzw. Tetrapeptiden durch *Resting Cells* durchgeführt, auf eine Bestimmung der Aminosäure-, Peptid- und Glucosekonzentrationen wurde hier verzichtet.

2.3.4.7 Zusatz von α -Ketosäuren als Substrate

Da die Transaminierung der Aminosäuren zu α -Ketosäuren im ersten Reaktionsschritt des Aminosäuremetabolismus in *L. sakei* sehr gering ist (3.1.4), wurden mit der dargestellten Biotransformationsmethode (2.3.4.3) Fermentationsversuche mit äquimolaren Konzentrationen an Aminosäuren und deren komplementären α -Ketosäuren als Substrate (20 mMol/L) durch den Stamm *L. sakei* TMW 1.1383 durchgeführt. Die Versuche wurden analog den in Abschnitt 2.3.4.4 beschriebenen Untersuchungen zur Metabolisierung von Aminosäuren und Dipeptiden durch *Resting Cells* durchgeführt. Auf eine Bestimmung der Aminosäure- und Glucosekonzentrationen wurde hier verzichtet. Es wurde eine Konzentration der Substrate von 20 mMol/L in 15 mL *Resting Cells* gewählt (Val: 35,2 mg; KIV: 41,4 mg; Leu: 39,4 mg; KIC: 39,0 mg; Phe: 49,6 mg; PPA: 49,3 mg; Met: 44,8 mg; KMBA: 51,1 mg).

Außerdem wurden für die Blindwerte der flüchtigen Metabolite der α -Ketosäuren in Natrium-Phosphat-Puffer die Substrate (KIV: 13,8 mg; KIC: 13,0 mg; PPA: 16,4 mg; KMBA: 17,0 mg) sowie die Coenzyme (α -Ketoglutarat: 8,4 mg; PLP: 2,5 mg) in Doppelbestimmung in sterile 20 mL Headspace-Vial eingewogen, in 5 mL Natrium-Phosphat-Puffer (50 mM; pH 7,4) gelöst und 5 Tage bei 30 °C inkubiert. Die Konzentrationen der komplementären flüchtigen Metabolite wurden an den Tagen 0, 3 (bzw. 4) und 5 durch SPME-GC/MS analysiert (2.3.2.1).

2.3.5 Aktivitätsgeleitete Aufreinigung eines Enzyms mit Transaminierungsaktivität aus *Lactobacillus sakei* TMW 1.1322

2.3.5.1 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Die Proteinkonzentration wurde nach Bradford (1976) bestimmt. Die mit bidest. Wasser verdünnten Proben (100 μ L) wurden mit 1 mL Bradford-Lösung vermischt und nach frühestens 2 min photometrisch bei 595 nm gegen einen Blindwert ohne Proteingehalt (100 μ L bidest. Wasser) vermessen. Zur Berechnung der Proteinkonzentration wurde eine Kalibriergerade mit BSA als Standard erstellt.

2.3.5.2 Zellaufschluss von *Lactobacillus sakei* TMW 1.1322

Für die Herstellung von Rohproteinextrakten und die darauffolgende Proteinaufreinigung wurden wie in 2.3.1.3 beschrieben Zellen des Stammes *L. sakei* TMW 1.1322 in 20 L mMRS-Medium kultiviert und geerntet. Es wurde ausschließlich mit diesem Bakterienstamm gearbeitet, da es sich hierbei um den genomsequenzierten Stamm *L. sakei* 23K handelt. Die geernteten Zellen wurden zweimal mit Kalium-Phosphat-Puffer (50 mM; pH 7,4) durch Resuspension und Zentrifugieren gewaschen und vereint. Nach Zugabe von 8 mL Startpuffer (System Anionenaustausch; 2.2.1) wurden die Zellen durch 10-malige Ultraschallbehandlung (30 sec, Intensität 10 %) auf Eis lysiert. Die Zellbestandteile wurden durch zweimaliges Zentrifugieren (12000 x g; 20 min; 4 °C) von den löslichen Proteinen getrennt. Anschließend wurde die Proteinkonzentration im so erhaltenen Rohproteinextrakt bestimmt (2.3.5.1).

Zu Beginn der Arbeiten zur aktivitätsgeleiteten Aufreinigung eines Enzyms mit Transaminierungsaktivität wurde vor der Lysis durch Ultraschall eine Lysozymbehandlung durchgeführt. Hierfür wurden 10 mg/mL Lysozym aus Hühnereiweiß zugegeben und 1 h bei 30 °C inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift zur Entfernung des zugesetzten Lysozyms, wurden die Bakterien wie oben beschrieben mittels Sonotrode aufgeschlossen.

2.3.5.3 Enzymassay zur Überprüfung der Transaminierungsaktivität

Um die Transaminierungsaktivität der Rohproteinextrakte und der durch FPLC aufgereinigten Fraktionen zu überprüfen, wurde ein Enzymassay in Anlehnung an Thage et al. (2004) entwickelt. Hierbei wurde die enzymatisch katalysierte Bildung von α -Ketoisocapronsäure aus der Aminosäure Leucin bzw. von L-Glutaminsäure aus α -Ketoglutarsäure beobachtet. Der Assaypuffer mit einem Gesamtvolumen von 250 μ L bestand aus Kalium-Phosphat-Puffer (50 mM; pH 7,4; 2.1.9.2) und beinhaltete α -Ketoglutarsäure (5 mM), Pyridoxal-5'-phosphat (50 μ M), das Substrat Leucin (5 mM), sowie 100 μ L Rohproteinextrakt bzw. aufgereinigte Fraktion (im folgenden Proteinextrakt genannt). Stammlösungen von α -Ketoglutarsäure und Leucin wurden vor jedem Test frisch hergestellt, PLP-Stammlösung wurde für maximal 4 Wochen bei -20 °C gelagert. Die Inkubationszeit betrug 24 Stunden bei 37 °C, die Reaktion wurde durch Erhitzung auf 80 °C für 15 min gestoppt. Zu jedem Testansatz wurden Kontrollen hinzugefügt, Blindwert A (BW A) ohne Zusatz von Protein und Blindwert B (BW B) ohne Zusatz von Substrat.

Für die Herstellung des Assaypuffers wurden zu 75 μ L Kalium-Phosphat-Puffer (100 mM; pH 7,4) und 45 μ L bidest. H₂O je 10 μ L der Stammlösungen in bidest. H₂O (α -Ketoglutarsäure: 21,0 mg/mL; Leu: 16,4 mg/mL und PLP: 15,4 mg/100 mL) pipettiert. Die Reaktion wurde durch Zusatz von 100 μ L Proteinextrakt und Inkubation bei 37 °C gestartet. Für BW A wurden 100 μ L Kalium-Phosphat-Puffer (50 mM; pH 7,4) anstelle von Proteinextrakt, für BW B 10 μ L bidest. H₂O anstelle von Leucin-Stammlösung verwendet.

Die gebildete Menge an α -Ketoisocapronsäure wurde durch HPLC-UV analysiert (2.3.2.6), die gebildete Menge an L-Glutaminsäure wurde durch einen käuflich erworbenen Enzymtest beobachtet (2.3.2.7).

2.3.5.4 FPLC-Aufreinigung

Für die Identifizierung eines Enzyms mit Transaminierungsaktivität wurde eine zweistufige, aktivitätsgeleitete Aufreinigung durch Fast Protein Liquid Chromatographie (FPLC) gewählt. Im ersten Schritt wurden 15 mL des wie in 2.3.5.2 beschrieben hergestellten Rohproteinextraktes durch eine ionenaustauschchromatographische Trennung an den quartären Ammoniumverbindungen der Q-Sepharose™ High Performance-Matrix einer HiLoad 16/10 Q Sepharose HP-Säule (GE Healthcare Biosciences AB, Uppsala, Schweden) fraktioniert (System Anionenaustausch; 2.2.1). Das UV-Chromatogramm der Aufreinigung ist in Abbildung 68 (Anhang) dargestellt. Je 100 μ L der erhaltenen Fraktionen wurden direkt auf Transaminaseaktivität überprüft.

Die aktiven Fraktionen aus dem ersten Aufreinigungsschritt wurden vereint und mithilfe eines VIVASPIN 20 3000 MWCO PES-Konzentrators (Sartorius Stedim Biotech S.A., Aubagne Cedex, Frankreich) auf ein Volumen von ca. 1,5 mL eingeeengt und der Natriumchlorid-Gehalt analog dem Elutionspuffer für das System Gelfiltration (2.2.1) auf 0,15 M eingestellt. Im zweiten Aufreinigungsschritt wurden die Proteine aus 700 μ L der konzentrierten aktiven Fraktionen durch Gelfiltration ihrer Größe nach fraktioniert. Hierfür diente die Sephadex™-Matrix einer Superdex 200 10/300 GL-Säule (GE Healthcare Biosciences AB, Uppsala, Schweden), bestehend aus quervernetzten Dextran/Agarose-Gelkügelchen (System Gelfiltration; 2.2.1). Das UV-Chromatogramm der Aufreinigung ist in Abbildung 69 (Anhang) dargestellt. Je 100 μ L der erhaltenen Fraktionen wurden direkt auf Transaminaseaktivität überprüft.

Da der UV-Peak des zweiten Aufreinigungsschrittes eine sehr hohe Absorption zeigte, auf SDS-PAGE-Gelen jedoch keine Proteinbanden erkennbar waren (nicht gezeigt), wurden die vereinten aktiven Fraktionen aus der Gelfiltration mittels LC-UV/ESI-MSⁿ analysiert. Hierfür wurde die gleiche Methode wie für die Bestimmung der Dipeptidkonzentrationen angewandt (2.2.2).

2.3.5.5 Entsalzung und Gefriertrocknung aktiver Fraktionen

Die aktiven Fraktionen nach dem zweiten Aufreinigungsschritt (2.3.5.4) wurden, um eine gute Trennung bei der anschließenden SDS-PAGE zu gewährleisten, mit den käuflich erwerblichen Zeba™ Desalt Spin Columns 5 mL (Thermo Fisher Scientific, Bonn) den Angaben des Herstellers folgend entsalzt. Hierfür wurden die Fraktionen auf die Entsalzungssäule aufgetragen, diese in ein steriles 15 mL-Zentrifugengefäß gegeben und 2 min bei 1000 x g zentrifugiert. Das Eluat entsprach den entsalzten, vereinten Fraktionen und wurde vor der Gefriertrocknung auf Transaminierungsaktivität überprüft. Aufgrund der geringen Probemenge wurden dazu 50 μ L entsalzte Fraktionen mit 50 μ L Kalium-Phosphat-Puffer (100 mM; pH 7,4) versetzt und ein Enzymassay wie in 2.3.5.3 beschrieben durchgeführt. Es wurde die gebildete Menge an L-Glutaminsäure gemessen (2.3.2.7), da dieser Nachweis eine geringere Nachweisgrenze als die HPLC-Bestimmung der KIC aufweist.

Um die entsalzten Fraktionen zu konzentrieren, wurden sie in ein 1,5 mL-ERG überführt und über Nacht gefriergetrocknet. Die lyophilisierten Proteine wurden vor der SDS-PAGE in Kalium-Phosphat-Puffer (50 mM; pH 7,4) gelöst.

2.3.5.6 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) und Färbung

Zur Untersuchung von Proteinlösungen auf Größe und Reinheit des Zielproteins wurde eine Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) durchgeführt. Dazu wurden vier Teile Proteinlösung mit einem Teil 5x Ladepuffer (2.1.9.2) versetzt. Zur späteren Auswertung und Größenbestimmung der Proteine wurde ein Protein-Größenstandard (SDS 7 Marker MW 14000 - 66000; Abbildung 13) verwendet, welcher vor der Denaturierung 1:1 mit Dithiothreitol versetzt wurde. Die vorbereiteten Proben und der Protein-Größenstandard wurden 5 min bei 95 °C denaturiert und vor dem Auftragen auf das Gel auf Eis gekühlt. Anschließend wurden die Proben auf homogene Tris-Glycin-Gele (12 % bzw. 18 % SDS, 1 mm Schichtdicke) oder auf ein Tris-Glycin-Gradienten-Gel (4 - 20 % SDS, 1 mm Schichtdicke) (Anamed Elektrophorese GmbH, Groß-Bieberau) aufgetragen und in einer vertikalen Gelkammer für 90 Minuten bei einer konstanten elektrischen Spannung von 125 V aufgetrennt.



Abbildung 13: Protein-Größenstandard. SDS 7 Marker MW 14000 - 66000.

Für die Sichtbarmachung der Proteinbanden auf den Gelen wurden zwei Methoden gewählt. Zum einen wurden die Gele in Coomassie-Färbelösung für eine Stunde gefärbt, zweimal eine Stunde in Entfärbelösung für Proteingele geschüttelt und über Nacht in dest. H₂O entfärbt (2.1.9.3). Zum anderen wurde eine modifizierte Silberfärbung nach Blum et al. (1987) angewandt. Alle Arbeitsschritte wurden unter Schütteln durchgeführt, für die Zusammensetzung der Lösungen siehe 2.1.9.3. Sollten Banden für die Sequenzierung von Proteinen ausgeschnitten werden, wurde für alle Lösungen und Waschschriffe bidest.

H₂O verwendet. Die Proteingele wurden mindestens 2 Stunden oder über Nacht in Fixierlösung gelegt und anschließend 3x 20 min mit Waschlösung gewaschen. Auf eine 1-minütige Behandlung mit Sensitivierlösung und drei Waschschrötte mit bidest. H₂O für je 20 sec folgte die einstündige Färbung mit Färbelösung. Nach weiteren drei Waschschrötte mit bidest. H₂O für je 20 sec wurden die Proteinbanden durch 5 - 10-minütiges Schütteln in Entwicklerlösung sichtbar gemacht. Es folgten ein weiterer Waschschrötte in bidest. H₂O für eine Minute, eine 5-minütige Behandlung mit Stopplösung und ein letzter Waschschrötte für 30 min in bidest. H₂O. Die Gele wurden verschweißt in 1 %iger Essigsäure bei 4 °C gelagert.

2.3.5.7 Sequenzierung von Proteinbanden

Aufgereinigte Proteinbanden, welche zur Identifizierung des Enzyms mit Transaminierungsaktivität von Interesse waren, wurden aus den gefärbten Gelen ausgeschnitten, in einem 0,2 mL ERG mit 150 µL Fixierlösung (2.1.9.3) versetzt und bei -20 °C gelagert. Die Sequenzierung wurde durch das Zentrallabor für Proteinanalytik (ZfP) der Ludwig-Maximilians-Universität München durchgeführt.

2.3.6 **Klonierung, heterologe Expression, Aufreinigung und biochemische Überprüfung einer putativen Acylphosphatase aus *Lactobacillus sakei* TMW 1.1322 in *Escherichia coli* TOP10**

2.3.6.1 Klonierung

Die Nukleotidsequenz eines putativen Acylphosphatasegens aus *L. sakei* TMW 1.1322 (= *L. sakei* 23K) war bereits aus einer Datenbank (Chaillou et al. 2005) bekannt (NC 007576; Abbildung 70, Anhang). Als Template für die PCR-Reaktion wurde genomische DNA aus *L. sakei* TMW 1.1322-Zellen verwendet (2.3.3.1). Die PCR mit KOD DNA-Polymerase wurde mit Primern, die jeweils eine Restriktionsschnittstelle enthielten (2.1.6), durchgeführt (2.3.3.1). Das aufgereinigte PCR-Amplifikat (2.3.3.3) wurde mit den entsprechenden Restriktionseendonukleasen (*NcoI* und *XbaI*) an den spezifischen Restriktionsschnittstellen geschnitten (2.3.3.4) und in den mit den gleichen Restriktionseendonukleasen geschnittenen Expressionsvektor pBAD/*Myc*-His B (2.1.4) ligiert (2.3.3.5; Abbildung 71, Anhang). Der Expressionsvektor wurde in kompetente *E. coli* TOP10-Zellen (2.3.3.6) transformiert (2.3.3.7). Die Insertion des Genfragments in den Vektor pBAD/*Myc*-His B wurde mittels Kolonie-PCR überprüft (2.3.3.8). Des Weiteren wurde aus Klonen, die bei der Kolonie-PCR Amplifikate der gewünschten Größe zeigten,

Plasmid extrahiert und sequenziert (2.3.3.9), um die Korrektheit der Gensequenz zu überprüfen.

2.3.6.2 Heterologe Expression

Für die heterologe Expression einer putativen Acylphosphatase in *E. coli* wurden LB-Agar-Platten (100 µg/mL Ampicillin) mit Glycerolkulturen des Klons beimpft und bei 37 °C für 2 Tage kultiviert. Anschließend wurden diese mit Parafilm® verschlossen und bei 4 °C für maximal 7 Tage gelagert.

Um Klone für die Expression des Proteins und die anschließende Aufreinigung zu kultivieren, wurden 50 mL LB-Medium (100 µg/mL Ampicillin) mit einer Kolonie beimpft und über Nacht unter Schütteln (160 rpm) bei 37 °C inkubiert. 4x 500 mL LB-Medium (100 µg/mL Ampicillin) wurden mit je 5 mL der Übernachtskultur angeimpft und bei 37 °C unter Schütteln (160 rpm) bis zu einer OD₆₀₀ von 0,7 inkubiert. Nach Erreichen einer OD₆₀₀ von 1 durch Inkubation unter Schütteln (160 rpm) bei 30 °C wurde die Expression des rekombinanten Proteins durch Zugabe von L(+)-Arabinose (100 µM) induziert. Die Expression erfolgte über Nacht bei 30 °C unter Schütteln (120 rpm).

2.3.6.3 Aufreinigung

2.3.6.3.1 *Zellaufschluss von Escherichia coli TOP10*

Für die Herstellung von Rohproteinextrakten und die darauffolgende Proteinaufreinigung wurden wie in 2.3.6.2 beschrieben Zellen des Klons kultiviert, induziert und nach der Expression durch Zentrifugieren (3000 x g, 20 min, 4 °C) geerntet. Die geernteten Zellen wurden zweimal mit Kalium-Phosphat-Puffer (50 mM; pH 7,4) durch Resuspension und Zentrifugieren gewaschen und vereint. Nach Zugabe von 5 mL Waschpuffer (System His-Trap; 2.2.1) wurden die Zellen durch 5-malige Ultraschallbehandlung (30 sec, Intensität 10 %) auf Eis lysiert. Die Zellbestandteile wurden durch zweimaliges Zentrifugieren (12000 x g; 20 min; 4 °C) von den löslichen Proteinen getrennt. Anschließend wurde die Proteinkonzentration im so erhaltenen Rohproteinextrakt bestimmt (2.3.5.1).

2.3.6.3.2 *His-Tag-Affinitätschromatographie*

Für die Aufreinigung der heterolog exprimierten Acylphosphatase wurde eine affinitätschromatographische Trennung (IMAC) des His-Tags an der Ni-Sepharose™ High Performance-Matrix einer HisTrap FF 5 mL-Affinitätssäule (GE Healthcare Biosciences

AB, Uppsala, Schweden), welche an ein FPLC-System angeschlossen war, durchgeführt. Es wurden 5 mL des wie in 2.3.6.3.1 beschrieben hergestellten Rohproteinextraktes injiziert und fraktioniert (System His-Trap; 2.2.1). Die Fraktionen unter dem Peak im UV-Chromatogramm der FPLC-Aufreinigung (Abbildung 72, Anhang) wurden durch die Methode nach Bradford (2.3.5.1) auf Proteingehalt überprüft.

In gleicher Weise wurden Zellen des Wildtyps des Stammes *E. coli* TOP10 kultiviert, aufgeschlossen und der His-Tag-Affinitätschromatographie unterzogen.

2.3.6.3.3 Pufferwechsel, Konzentrierung und SDS-PAGE

Bei den vier Fraktionen mit der höchsten Proteinkonzentration (0,69 - 1,37 µg/mL; Fraktionen 13 - 16) wurde ein Pufferwechsel durchgeführt, da sich das für die Elution von der Ni-Sepharose™ High Performance-Matrix notwendige Imidazol störend auf die Enzymaktivität auswirken könnte. Es wurden die käuflich erwerblichen Zeba™ Desalt Spin Columns 5 mL (Thermo Fisher Scientific, Bonn) den Angaben des Herstellers folgend vorbereitet. Anschließend wurden die Fraktionen auf die Entsalzungssäule aufgetragen, diese in ein steriles 15 mL-Zentrifugengefäß gegeben und 2 min bei 1000 x g zentrifugiert. Das Eluat entsprach den Proteinen aus den vereinten Fraktionen im gewünschten Kalium-Phosphat-Puffer (50 mM; pH 7,4). Es wurde mithilfe eines VIVASPIN 2 3000 MWCO PES-Konzentrators (Sartorius Stedim Biotech S.A., Aubagne Cedex, Frankreich) auf ein Volumen von ca. 1,5 mL eingeengt.

Zur Untersuchung der konzentrierten Proteinlösung auf Größe und Reinheit des Zielproteins, wurde eine SDS-PAGE wie in 2.3.5.6 beschrieben mit einem homogenen Tris-Glycin-Gel (18 % SDS) durchgeführt.

Mit den identischen Fraktionen der His-Tag-Affinitätschromatographie des Wildtyps des Stammes *E. coli* TOP10 wurde in gleicher Weise verfahren.

2.3.6.4 Biochemische Überprüfung

2.3.6.4.1 *Enzymassay zur Überprüfung der Acetylphosphataseaktivität*

Die Hauptaktivität der putativen Acylphosphatase, die Hydrolyse von Acylphosphaten, wurde durch einen Enzymassay nach Albina et al. (1999) überprüft. Es wurde der enzymatische Abbau des als Substrat zugesetzten Acetylphosphat gemessen. Der Assaypuffer mit einem Gesamtvolumen von 200 µL bestand aus Triethanolaminpuffer (0,1 M; pH 7,4; 2.1.9.2) und beinhaltete NAD⁺ (10 mM), das Substrat Acetylphosphat

(4 mM), sowie 50 μL des konzentrierten, aufgereinigten Enzyms. Stammlösungen von NAD^+ und Acetylphosphat wurden vor dem Test frisch hergestellt. Die Inkubationszeit betrug zwei Stunden bei Raumtemperatur. Zu jedem Testansatz wurden Kontrollen hinzugefügt, Blindwert A (BW A) ohne Zusatz von Protein und Blindwert B (BW B) ohne Zusatz von Substrat. Die Testansätze wurden in Zweifachbestimmung durchgeführt, die Kontrollen in Einfachbestimmung.

Für die Herstellung des Assaypuffers wurden zu 140 μL NAD^+ -Stammlösung in Triethanolamin-Puffer (9,5 mg/mL) 10 μL der Acetylphosphat-Stammlösung in Triethanolamin-Puffer (14,7 mg/mL) pipettiert. Die Reaktion wurde durch Zusatz von 50 μL Proteinlösung und Inkubation bei Raumtemperatur gestartet. Für BW A wurden 50 μL Kalium-Phosphat-Puffer (50 mM; pH 7,4) anstelle von Proteinlösung, für BW B 10 μL Triethanolaminpuffer anstelle von Acetylphosphat-Stammlösung verwendet.

Nach der zweistündigen Inkubationszeit wurde der Gehalt an Acetylphosphat in den Enzymassays und Kontrollen wie in 2.3.2.8 beschrieben bestimmt.

Mit den konzentrierten Fraktionen des Wildtyps des Stammes *E. coli* TOP10 wurde der Enzymassay in gleicher Weise durchgeführt.

2.3.6.4.2 Enzymassay zur Überprüfung der Transaminierungsaktivität

Um die Transaminierungsaktivität der Rohproteinextrakte, des aufgereinigten und konzentrierten Proteins sowie der konzentrierten Fraktionen des Wildtyps des Stammes *E. coli* TOP10 zu überprüfen, wurde der in 2.3.5.3 beschriebene Enzymassay in Doppelbestimmung durchgeführt. Als einzige Unterschiede wurden dem Assaypuffer NAD^+ in einer Konzentration von 5 mMol/L zugesetzt und die Inkubationszeit betrug 1 h, 8 h und 24 h.

Die gebildete Menge an α -Ketoisocaprinsäure wurde durch HPLC-UV analysiert (2.3.2.6), die durch die heterolog exprimierte Acylphosphatase gebildete Menge an L-Glutaminsäure wurde durch einen käuflich erworbenen Enzymtest beobachtet (2.3.2.7). Außerdem wurde die Konzentration an gebildeter KIC durch LC-UV/ESI-MSⁿ gemessen. Hierfür wurde die gleiche Methode wie für die Bestimmung der Dipeptidkonzentrationen angewandt (2.2.2), für die Auswertung der Massenspektren wurde die Massenspur des m/z 129 [M - H]⁻-Ions ausgewählt. Die Quantifizierung der KIC durch LC-UV/ESI-MSⁿ wurde anhand einer Kalibriergerade des käuflich erworbenen Standards durchgeführt. Es wurden drei unterschiedliche Konzentrationen des Standards in Kalium-Phosphat-Puffer (50 mM;

pH 7,4) injiziert (Abbildung 73, Anhang). Über die hierdurch erhaltene Geradengleichung konnte die Konzentration an KIC in den Enzymassays berechnet werden.

Mit den konzentrierten Fraktionen des Wildtyps des Stammes *E. coli* TOP10 wurde der Enzymassay in gleicher Weise durchgeführt.

3. Ergebnisse und Diskussion

3.1 Metabolisierung von Aminosäuren und Peptiden durch *Lactobacillus sakei*

3.1.1 Metabolisierung von Aminosäuren in mMRS-Medium

Um die physiologische Fähigkeit verschiedener *L. sakei*-Stämme Aminosäuren aufzunehmen und zu metabolisieren zu überprüfen, wurden Modellfermentationen in mMRS-Medium mit einem Zusatz von 50 mMol/L an Aminosäuren durchgeführt. Hierfür wurden Ansätze, in denen je eine der Aminosäuren Valin, Leucin, Isoleucin, Phenylalanin oder Methionin in einer Konzentration von 50 mMol/L enthalten war, sowie ein Blindwert ohne Aminosäurezugabe, mit ca. 10^6 Zellen/mL angeimpft und 7 Tage bei 30 °C inkubiert. Die Aminosäurekonzentrationen sowie die Konzentration an deren komplementären flüchtigen Metaboliten wurden zu Beginn und am Ende der Fermentation gemessen. Die Entwicklung der Zellzahl wurde während der gesamten Zeit beobachtet, um auch hier eventuelle Unterschiede im Zellwachstum in den unterschiedlichen Ansätzen zu erkennen (2.3.4.1).

3.1.1.1 Aminosäurekonzentrationen

Nach der 7-tägigen Fermentation konnte anhand der Konzentrationsmessung der nicht zugesetzten Aminosäuren festgestellt werden, dass die Konzentrationen der Aminosäuren Alanin, Glycin, Leucin, Isoleucin, Threonin, Tyrosin und Valin in allen Ansätzen zunahmten, die von Asparagin, Asparaginsäure, Methionin und Serin abnahmen und der Gehalt an Cystin, Glutaminsäure, Histidin, 4-Hydroxyprolin, Lysin, Ornithin, Phenylalanin, Prolin und Tryptophan während der Fermentationszeit annähernd gleich blieb.

In Abbildung 14 ist das Ergebnis der Bestimmung der freien Aminosäuren nach sieben Tagen Fermentation in mMRS-Medium für die zugesetzten Aminosäuren am Beispiel von *L. sakei* TMW 1.1393 graphisch dargestellt. Aus den Doppelbestimmungen wurde der Durchschnitt gebildet.

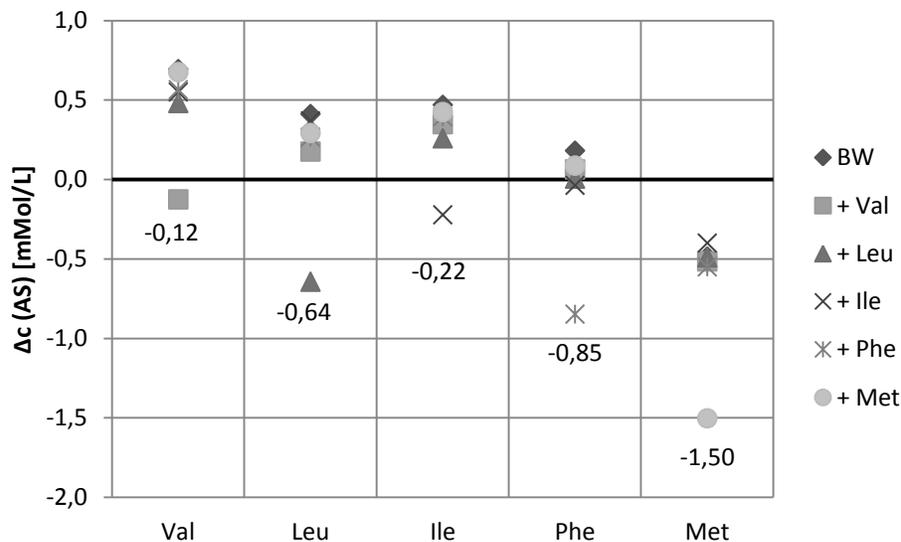


Abbildung 14: Zusammenfassung der Änderung der Aminosäurekonzentrationen Δc [mMol/L] während der Inkubationsperiode in den Lösungen mit Aminosäurezusatz durch *L. sakei* TMW 1.1393. Jedes Symbol stellt einen Ansatz mit dem entsprechenden Aminosäurezusatz dar (Legende). Positiver Wert bedeutet Zunahme, negativer Wert bedeutet Abnahme der Aminosäurekonzentration während der Fermentation.

Der graphisch dargestellte Wert entspricht dem Umsatz Δc [mMol/L], d.h. $(C_{\text{freie AS}} \text{ Tag 7}) - (C_{\text{freie AS}} \text{ Tag 0})$. Anhand dieser Darstellung sind Unterschiede im Aminosäure-Umsatz während der Fermentationszeit erkennbar. Liegen die Werte aus den verschiedenen Ansätzen nahe zusammen, so wurde während der Fermentation von dieser Aminosäure die gleiche Menge freigesetzt bzw. metabolisiert. Ein positiver Wert bedeutet somit eine Zunahme (Freisetzung), ein negativer Wert hingegen eine Abnahme (Metabolisierung) der Konzentration an freien Aminosäuren während der 7-tägigen Fermentation.

Durch die Bestimmung der freien Aminosäuren ist erkennbar, dass in den Ansätzen mit einem 50 mMolaren Zusatz der jeweiligen Aminosäure auch deren Umsatz erhöht ist. Während der siebentägigen Fermentation wurden bei einem Überangebot an einer freien Aminosäure 0,6 mMol/L (Isoleucin) – 1,02 mMol/L (Methionin) mehr von dieser umgesetzt, als dies durchschnittlich in den anderen Ansätzen der Fall war. Dieses Ergebnis konnte auch bei den anderen Stämmen beobachtet werden.

3.1.1.2 Konzentration an flüchtigen Metaboliten

Neben den Aminosäurekonzentrationen wurden auch die in Tabelle 5 (2.3.2.1) dargestellten flüchtigen Komponenten mittels SPME-GC/MS quantitativ bestimmt.

Zusätzlich wurde der Metabolit 2-Methylbutanal aus der Aminosäure Isoleucin detektiert. Da für ihn keine absolute Quantifizierung durchgeführt wurde (2.3.2.2), sind hier die relativen Konzentrationen bezogen auf den internen Standard 1,2-Dimethoxyethan in nMol-Äquivalente/mL angegeben.

Bei den meisten Ansätzen, in denen Aminosäuren zugesetzt wurden, kam es während der 7-tägigen Fermentation zu einer vermehrten Bildung der komplementären Metabolite (Abbildung 15). Die graphisch dargestellten Werte entsprechen der Konzentrationsänderung $\Delta c (c_{\text{Metabolit Tag 7}} - c_{\text{Metabolit Tag 0}})$ in [ng/mL] bzw. [$\mu\text{g/mL}$]. Durch diese Darstellung ist die Veränderung der Konzentration der flüchtigen Metabolite während der Fermentationszeit erkennbar. Liegen die Werte aus den verschiedenen Ansätzen nahe zusammen, so wurde während der Fermentation von der flüchtigen Verbindung die gleiche Menge gebildet bzw. metabolisiert. Ein positiver Wert bedeutet eine Zunahme (Bildung), ein negativer Wert hingegen eine Abnahme (Metabolisierung) der Konzentration einer flüchtigen Verbindung während der 7-tägigen Fermentation.

Am stärksten war die vermehrte Produktion bei einem Zusatz von Methionin zu erkennen. Es wurden 7231,1 ng/mL 3-(Methylthio)-propanal (Methional) mehr gebildet, als dies durchschnittlich in den anderen Ansätzen der Fall war. Dimethyldisulfid wurde um 50,2 ng/mL vermehrt gebildet. Auch bei den verzweigtkettigen Aminosäuren Valin, Leucin und Isoleucin war die verstärkte Metabolisierung deutlich messbar. Es kam zur erhöhten Bildung der komplementären Aldehyde 2-Methylpropanal ($\Delta c = 33,7 \text{ ng/mL}$), 3-Methylbutanal ($\Delta c = 73,3 \text{ ng/mL}$) und 2-Methylbutanal ($\Delta c_{\text{rel}} = 59,6 \text{ nMol/mL}$). Der Zusatz von Phenylalanin führte zu einer um 750,0 ng/mL erhöhten Bildung an Phenylacetaldehyd und um 133,5 ng/mL höheren Konzentration an Benzaldehyd. Der Alkohol 3-Methyl-1-butanol aus Leucin wurde um 84,0 ng/mL mehr gebildet, als dies durchschnittlich in den anderen Ansätzen der Fall war. Lediglich die aus den verzweigtkettigen Aminosäuren entstehenden Carbonsäuren bildeten hier eine Ausnahme. 2-Methylpropansäure wurde in dem Ansatz mit Leucin-Zusatz in einer höheren Konzentration gebildet als in dem Ansatz mit Valin-Zusatz, dem eigentlichen biogenetischen Vorläufer. Bei 3-Methylbuttersäure betrug die Änderung der Konzentration nach Leucin-Zusatz im Vergleich zu den anderen Ansätzen im Durchschnitt lediglich 13,1 $\mu\text{g/mL}$.

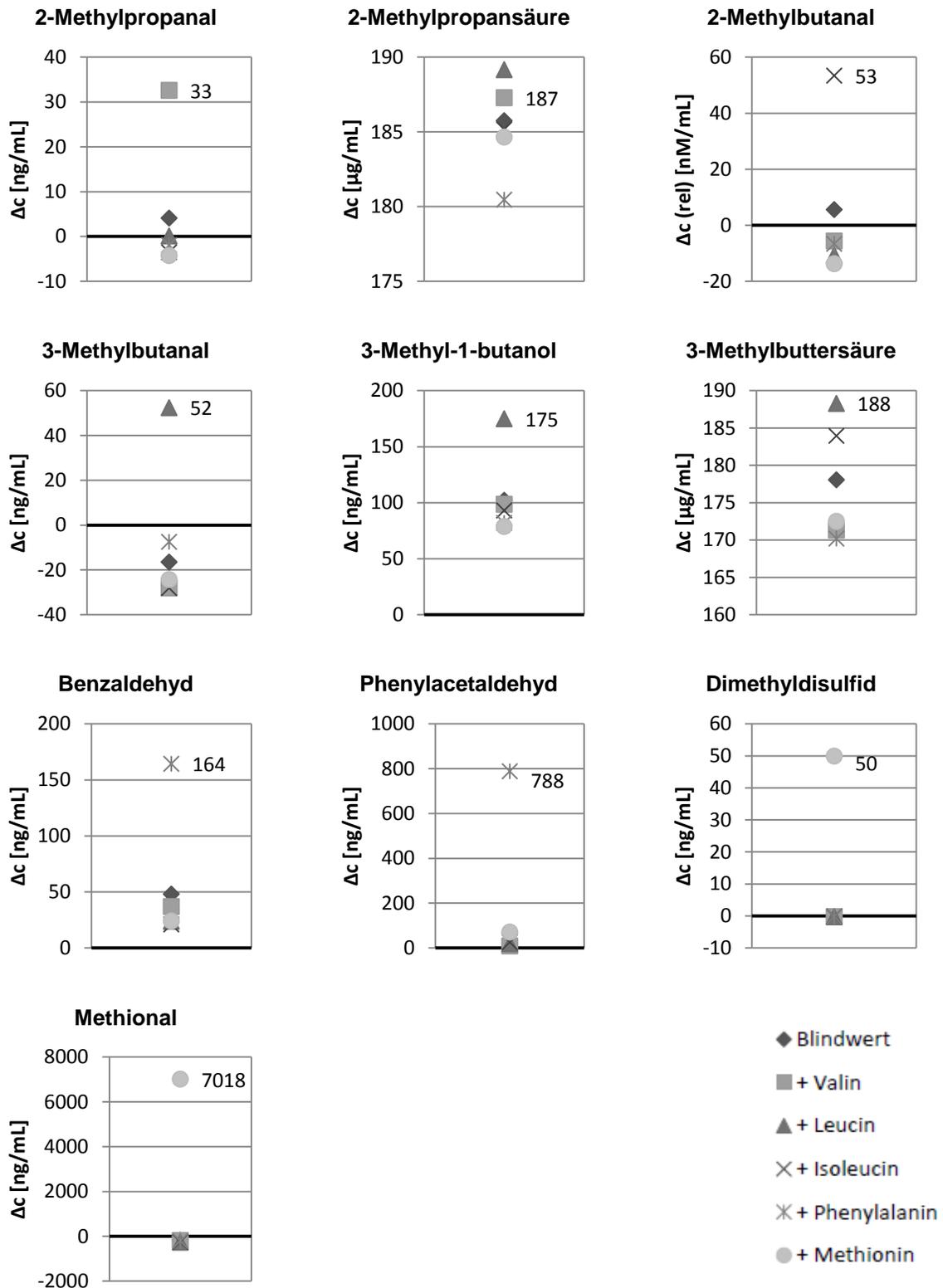


Abbildung 15: Änderung der Konzentrationen Δc [ng/mL] bzw. [$\mu\text{g/mL}$] ausgewählter flüchtiger Verbindungen in den Inkubationslösungen mit Aminosäurezusatz durch *L. sakei* TMW 1.1393 nach sieben Tagen Fermentation. Angegeben ist die Konzentrationsänderung des flüchtigen Metabolits ($c_{\text{Metabolit}}$ Tag 7) - ($c_{\text{Metabolit}}$ Tag 0) in dem Ansatz mit der zugesetzten Aminosäure (Legende).

3.1.1.3 Zellzahl

Die Beobachtung der Zellzahl (2.3.4.1) zeigte, dass innerhalb von 24 Stunden in allen Ansätzen ein Wachstum der *L. sakei* TMW 1.1393 Zellen bis zu einer OD₆₀₀ von 2,3 – 2,4 stattfand. Den restlichen Fermentationsverlauf über änderte sich die Zellzahl nur geringfügig. Es kam zu keinem weiteren Zellwachstum (Abbildung 16).

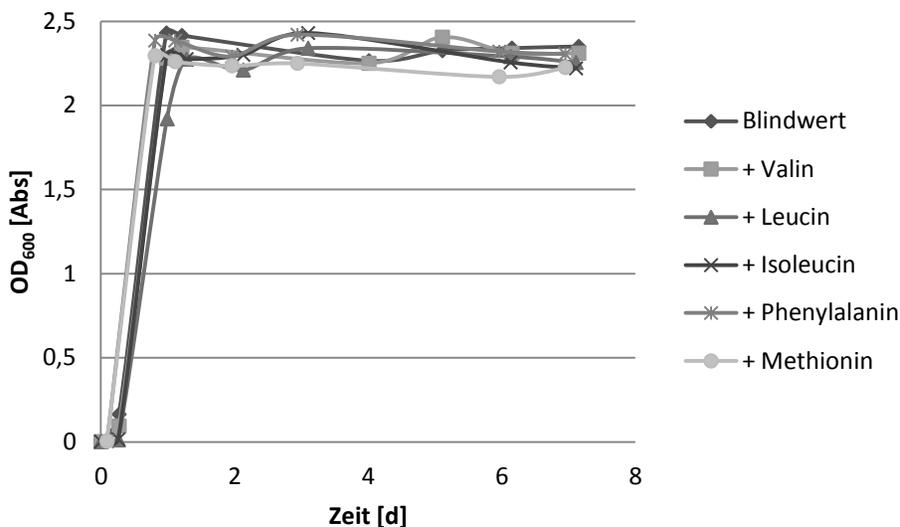


Abbildung 16: Bestimmung der *L. sakei* TMW 1.1393 Zellzahl während sieben Tagen Fermentation in mMRS-Medium nach Zusatz verschiedener Aminosäuren (Legende).

Auch der Stamm *L. sakei* TMW 1.1322 zeigte dieses Verhalten, im Gegensatz zu *L. sakei* TMW 1.1383, welcher bis zu einer OD₆₀₀ von 2,5 - 2,7 wuchs. Es konnten keine signifikanten Unterschiede im Zellwachstum durch die Zugabe von freien Aminosäuren festgestellt werden.

3.1.2 **Metabolisierung von Dipeptiden in mMRS-Medium**

Durch diese Versuche sollte die Aufnahme und die Metabolisierung von Peptidsubstraten durch die *L. sakei*-Stämme beobachtet werden. Des Weiteren sollten Unterschiede im Ausmaß der Metabolisierung im Vergleich zu freien Aminosäuren und aufgrund der Stellung der Aminosäuren innerhalb der Peptide überprüft werden. Deshalb wurden Modellfermentationen in mMRS-Medium mit einem Überangebot an freien Aminosäuren und Dipeptiden durchgeführt. Hierfür wurden Ansätze, in denen Kombinationen der Aminosäuren Valin, Leucin, Phenylalanin und Methionin in Form von Dipeptiden oder frei vorliegend in äquimolaren Mengen enthalten waren, sowie ein Blindwert ohne Aminosäurezugabe, mit ca. 10^6 Zellen/mL angeimpft und 7 Tage bei 30 °C inkubiert

(Tabelle 12, 2.3.4.2). Die Aminosäure- und Peptidkonzentrationen sowie die Konzentration an deren komplementären flüchtigen Metaboliten wurden zu Beginn und am Ende der Fermentation gemessen. Während der gesamten Zeit wurde die Entwicklung der Zellzahl beobachtet, um eventuelle Unterschiede im Zellwachstum in den unterschiedlichen Ansätzen zu erkennen (2.3.4.2).

3.1.2.1 Aminosäure- bzw. Dipeptidkonzentrationen

Anhand der Messung der Dipeptidkonzentrationen durch LC-UV/ESI-MSⁿ wurde erkannt, dass alle zugesetzten Dipeptide innerhalb von 24 Stunden nicht mehr im mMRS-Medium nachweisbar waren. Dies deutete auf einen schnellen Peptidtransport in die Zellen oder eine hohe Aktivität von Peptidasen hin. Das Ergebnis der Bestimmung der Konzentration an freien Aminosäuren im Medium war nicht eindeutig. In den Ansätzen mit einer 2 mMolaren Dipeptidzugabe waren nach der Fermentation die aus ihnen durch Hydrolyse entstehenden freien Aminosäuren vermehrt nachweisbar. Wurden freie Aminosäuren zugegeben, konnte zwar ein geringfügig vermehrter Abbau dieser nachgewiesen werden, der jedoch aufgrund der biologischen Variabilität nicht als eindeutig gewertet werden kann.

3.1.2.2 Konzentration an flüchtigen Metaboliten

Es wurden die in Tabelle 5 (2.3.2.1) aufgeführten flüchtigen Metabolite aus den zugesetzten Aminosäuren ausgewertet. In Abbildung 17 ist das Ergebnis der Bestimmung der flüchtigen Metabolite nach sieben Tagen Fermentation in mMRS-Medium im Versuch PHE_VAL (Tabelle 12; 2.3.4.2) am Beispiel der Metabolite Phenylacetaldehyd und 2-Methylpropanal dargestellt. Aus den Doppelbestimmungen wurde der Durchschnitt gebildet. Der graphisch dargestellte Wert entspricht der Änderung Δc [ng/mL] (3.1.1.2).

In Ansätzen mit den Dipeptiden Phe-Val und Val-Phe bzw. freiem Phenylalanin kam es während des Fermentationszeitraums zur Bildung von Phenylacetaldehyd. Im Blindwert wurde eine höhere Konzentration an Phenylacetaldehyd gemessen als in den Ansätzen mit Dipeptidzusatz („+ Val-Phe“ und „+ Phe-Val“: 2 mM) und Valinzusatz („Val“: 4 mM). Dies deutet darauf hin, dass die Peptidsubstrate nicht von den Bakterien zu Phenylacetaldehyd metabolisiert wurden. In den beiden Ansätzen mit Phenylalaninzusatz („+ Phe + Val“: 2 mM; „+ Phe“: 4 mM) kam es zur vermehrten Bildung von Phenylacetaldehyd, mit Konzentrationen von 48,5 ng/mL und 77,9 ng/mL (Abbildung 17 oben).

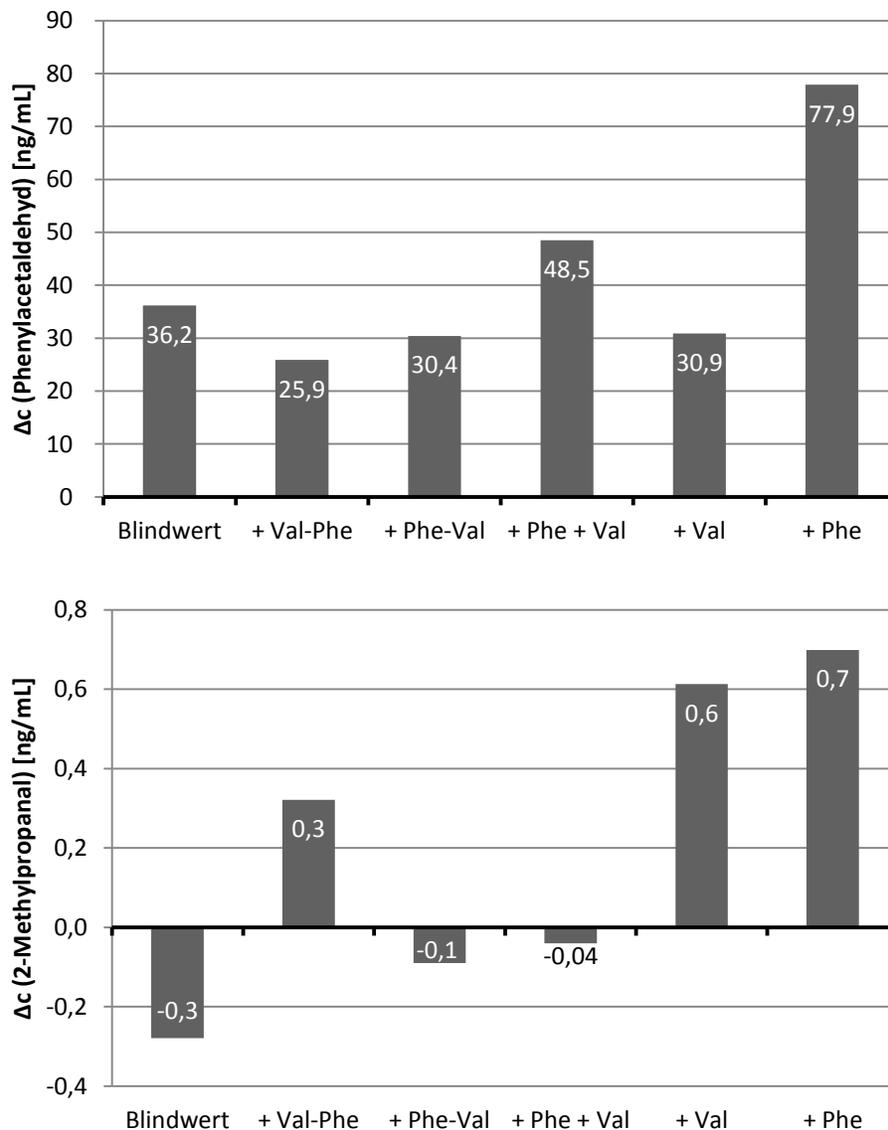


Abbildung 17: Änderung der Konzentrationen Δc [ng/mL] von Phenylacetaldehyd (oben) und 2-Methylpropanal (unten) während der siebentägigen Fermentation in den Inkubationslösungen durch *L. sakei* TMW 1.1322 nach Zusatz verschiedener Aminosäure-Substrate.

Bei der Bildung von 2-Methylpropanal aus Valin entsprach das Ergebnis hingegen keinem zu erwartenden Muster. Im Blindwert ohne Aminosäurezusatz kam es zu einer Konzentrationsabnahme um 0,3 ng/mL. Der Zusatz von Val-Phe führte zur Bildung von 2-Methylpropanal in einer Konzentration von 0,3 ng/mL, bei Phe-Val-Zugabe waren nach der Fermentation hingegen 0,1 ng/mL weniger 2-Methylpropanal zu messen als vor der Fermentation. Auch der Zusatz von freien Aminosäuren führte zu unterschiedlichen Ergebnissen. Im Ansatz mit den freien Aminosäuren Phenylalanin und Valin (je 2 mMolar nebeneinander vorliegend) kam es zu einer Abnahme der Konzentration an

2-Methylpropanal während der Fermentation. In den Ansätzen mit jeweils 4 mMol/L Phenylalanin bzw. Valin als einziger Substratzusatz nahm der Gehalt an 2-Methylpropanal nahezu im gleichen Ausmaß zu, obwohl Phenylalanin kein biogenetischer Vorläufer des Aldehyds ist (Abbildung 17, unten).

Auch die Ergebnisse aus dem Versuch LEU_MET (Tabelle 12; 2.3.4.2) waren nicht eindeutig.

3.1.2.3 Zellzahl

Die *L. sakei* TMW 1.1322 Zellen zeigten innerhalb von 24 Stunden in allen Ansätzen ein Wachstum bis zu einer OD₆₀₀ von 2,4 – 2,7. Den restlichen Fermentationsverlauf über änderte sich die Zellzahl nur geringfügig, es kam zu keinem weiteren Zellwachstum (Abbildung 18).

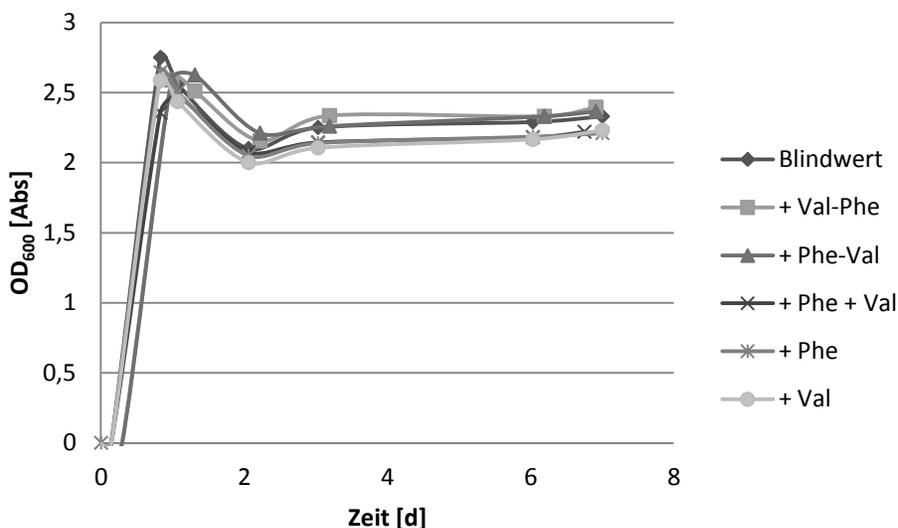


Abbildung 18: Bestimmung der *L. sakei* TMW 1.1322 Zellzahl während sieben Tagen Fermentation in mMRS-Medium nach Zusatz äquimolarer Aminosäuren-Kombinationen (Legende).

Dieses Ergebnis konnte auch im Versuch LEU_MET (Tabelle 12; 2.3.4.2) beobachtet werden, es konnten keine signifikanten Unterschiede im Zellwachstum durch die Zugabe unterschiedlicher Aminosäuresubstrate festgestellt werden.

3.1.3 Metabolisierung von Aminosäuren und Peptiden durch *Resting Cells*

Die Ergebnisse der Versuche zur Metabolisierung von Aminosäuren und Peptiden in mMRS-Medium (3.1.2) zeigten, dass die Beobachtung der Metabolisierung von geringen Mengen an zugesetzten Aminosäuren und Peptiden in einem komplexen mMRS-Medium schwierig war. Aus diesem Grund wurde eine Methode entwickelt, die es ermöglichte den *L. sakei*-Stämmen gezielt einzelne Substrate anzubieten und deren Metabolisierung ohne Fremdeinflüsse zu beobachten (2.3.4.3).

3.1.3.1 Vorversuche mit *Resting Cells*

Durch Vorversuche mit *Resting Cells* konnte festgestellt werden, dass bei einer Fermentation in Natrium-Phosphat-Puffer (50 mM; pH 6,5) mit ausschließlich Aminosäurezusatz nach 24 Stunden keine Aminosäuren mehr nachweisbar waren. Nach Zugabe von 0,3 % D-Glucose hingegen veränderte sich der Aminosäuregehalt in der Suspension während des gesamten Fermentationszeitraumes nur geringfügig (Abbildung 19).

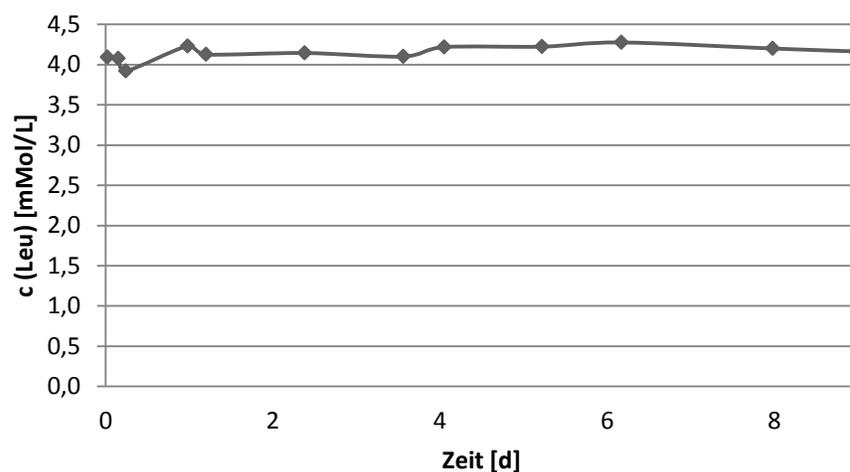


Abbildung 19: Verlauf der Konzentration an freiem Leucin [mMol/L] während der Inkubation mit gewaschenen *L. sakei* TMW 1.1322 Zellen in 50 mMolarem Natrium-Phosphat-Puffer mit 0,3% D-Glucose, pH 6,5 ($OD_{600} = 1$).

Auch bei Zusatz von anderen freien Aminosäuren spiegelte sich das gleiche Bild wieder. Lediglich die Konzentration an Methionin sank während des 9-tägigen Fermentationszeitraumes um ca. 2 mMol/L. Die Versuche zeigten, dass außer den

Aminosäuren eine weitere Energiequelle vorhanden sein muss, damit die Aminosäure-Substrate nicht vollständig im Primärstoffwechsel abgebaut, sondern die aromaaktiven flüchtigen Metabolite gebildet werden.

Die Bestimmung der flüchtigen Verbindungen mittels SPME-GC/MS zeigte, dass die Bildung der potentiell aromarelevanten Stoffe aus freien Aminosäuren zwischen Tag 4 und Tag 6 ein Maximum durchläuft (Abbildung 20).

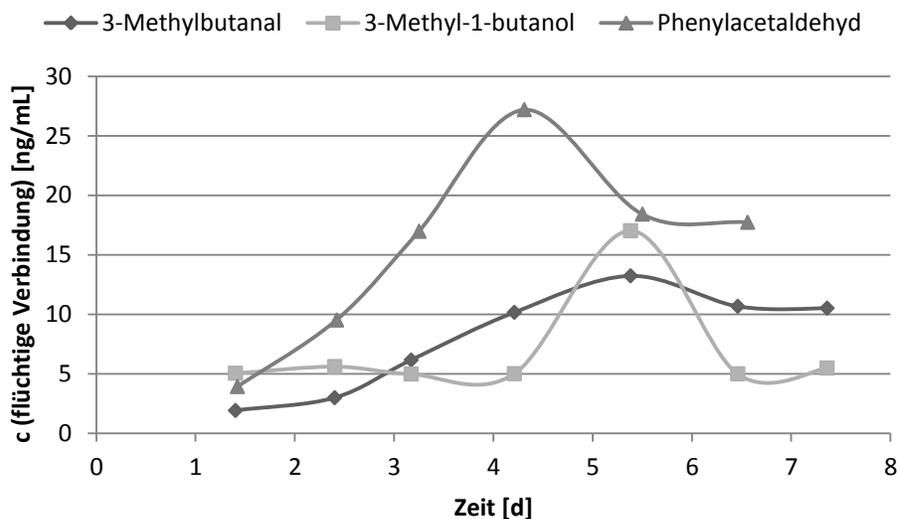


Abbildung 20: Bildung flüchtiger Verbindungen [ng/mL] nach Inkubation von gewaschenen *L. sakei* TMW 1.1322 Zellen in 50 mMolarem Natrium-Phosphat-Puffer mit 0.3% D-Glucose, pH 6,5 ($OD_{600} = 1$). Bildung von 3-Methylbutanal (—◆—) und 3-Methyl-1-butanol (—■—) nach Zugabe von Leucin (4 mMol/L) zur Zellsuspension. Bildung von Phenylacetaldehyd (—▲—) nach Zugabe von Phenylalanin (4 mMol/L) zur Zellsuspension.

Die höchsten Konzentrationen der Metabolite aus Valin, Leucin und Methionin konnten an Tag 5 gemessen werden, an Tag 4 hingegen konnte die größte Menge an Phenylacetaldehyd in einer Suspension mit Phenylalanin-Zusatz nachgewiesen werden.

Das Ausplattieren der Zellen bzw. von Verdünnungen der Suspension auf mMRS-Agar zeigte, dass die Anzahl lebender Zellen im Puffer sich nur sehr langsam verringerte. So konnten selbst nach neun Tagen noch lebende Zellen nachgewiesen werden, jedoch deutlich weniger als in den ersten sieben Tagen der Fermentationszeit.

Durch Zusatz der Coenzyme α -Ketoglutar säure (10 mMol/L) und Pyridoxal-5'-phosphat (2 mMol/L) konnte der Umsatz der Substrate deutlich gesteigert werden (Abbildung 21).

α -Ketoglutar säure stellt ein Cosubstrat bei Transaminierungsreaktionen dar, während Pyridoxal-5'-phosphat als prosthetische Gruppe in Aminotransferasen fungiert.

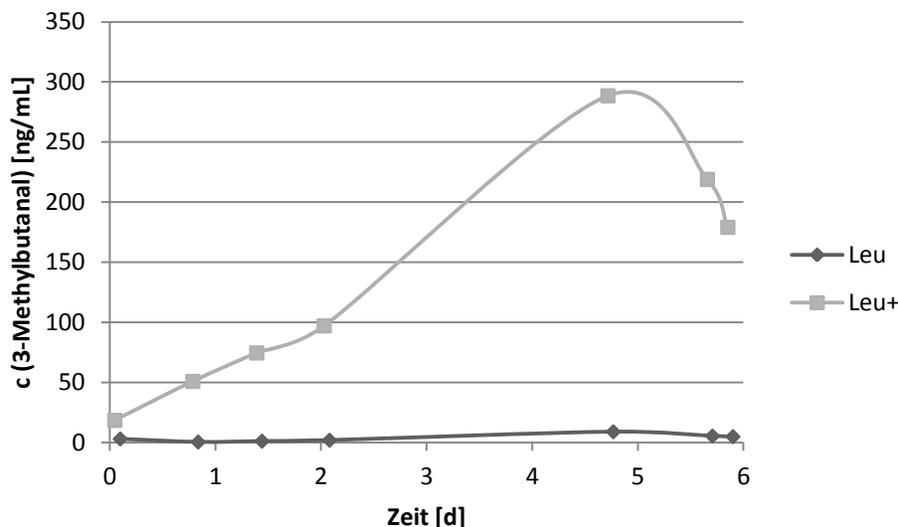


Abbildung 21: Bildung von 3-Methylbutanal aus Leucin (20 mMol/L) durch *L. sakei* TMW 1.1322 in 50 mMolarem Natrium-Phosphat-Puffer mit 0,3 % D-Glucose, pH 6,5 ($OD_{600} = 1$) ohne (Leu, \blacklozenge) und mit (Leu+, \blacksquare) Zusatz von Coenzymen.

Die beschriebene Biotransformationsmethode in Natrium-Phosphat-Puffer (50 mM; pH 6,5) mit 0,3% D-Glucose, α -Ketoglutar säure (10 mMol/L) und Pyridoxal-5-phosphat (2 mMol/L) erwies sich als geeignet um die Metabolisierung von geringen Aminosäurekonzentrationen zu beobachten. Durch weniger Störsignale und weniger Substrate als im zuvor verwendeten mMRS-Medium wurde die biologische Variabilität gesenkt und selbst bei Zugabe geringer Mengen der Substrate konnten noch Unterschiede im Metabolisierungsmaß zwischen den verschiedenen Stämmen *L. sakei* gemessen werden. Abbildung 22 zeigt die Ionenspur m/z 71 eines SPME-GC/MS-Chromatogramms der flüchtigen Verbindungen aus der Zellsuspension. Bei einer Retentionszeit von 9,45 min bzw. 9,25 min sind die Peaks des Leucin-Metaboliten 3-Methylbutanal an Tag 1 und Tag 5 der Fermentation übereinandergelegt dargestellt. Es ist deutlich die Bildung dieser für das Aroma der Rohwurst wichtigen Substanz erkennbar und selbst kleinste Unterschiede im Grad der Metabolisierung sind messbar.

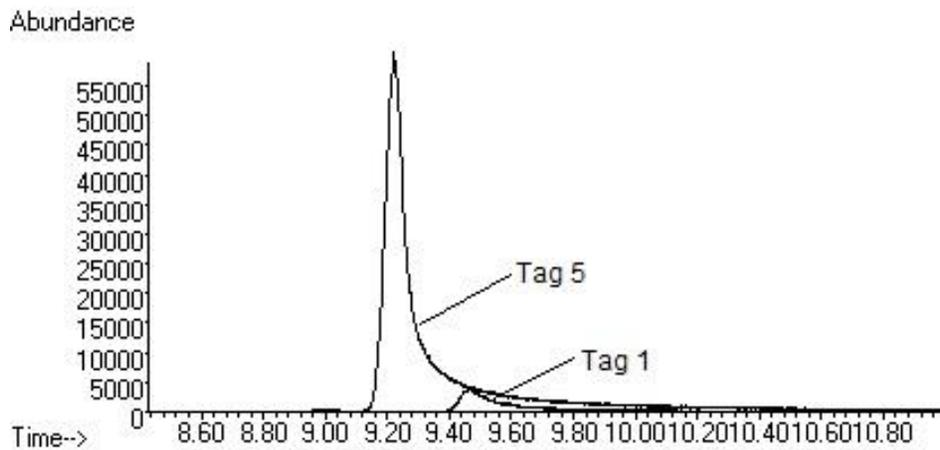


Abbildung 22: GC/MS Analyse der in Zellsuspensionen gebildeten flüchtigen Stoffe. Ionenspur m/z 71. Bildung des Metaboliten 3-Methylbutanal aus Leucin in Natrium-Phosphat-Puffer mit 0,3 % D-Glucose nach einem Tag und fünf Tagen Inkubation bei 30 °C.

3.1.3.2 Wachstumskurven der Bakterienstämme

Das Ergebnis der Bestimmung der Wachstumskurven der Bakterienstämme in mMRS-Medium (2.3.1.4) ist in Abbildung 23 dargestellt.

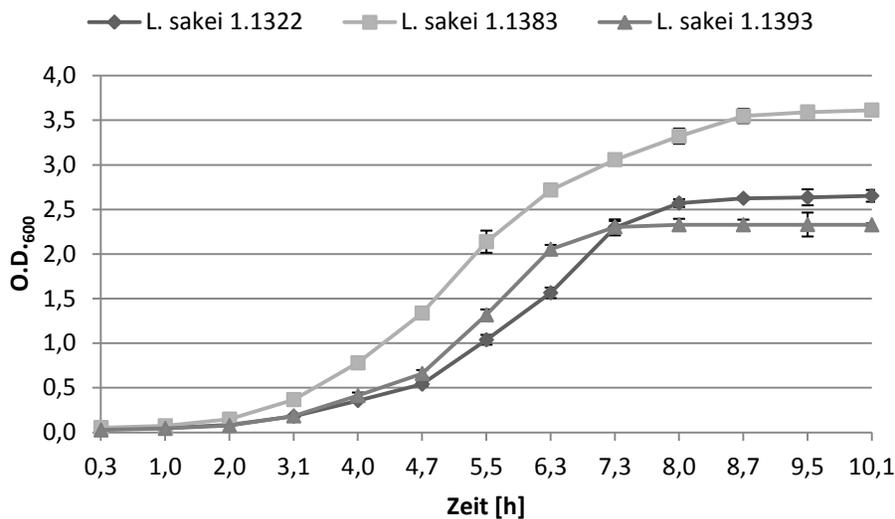


Abbildung 23: Bestimmung des Zellwachstums in Abhängigkeit von der Zeit durch Messung der OD₆₀₀ von *L. sakei* TMW 1.1322 (◆), *L. sakei* TMW 1.1383 (■) und *L. sakei* TMW 1.1393 (▲).

Für den Beginn der stationären Wachstumsphase ergab sich für *L. sakei* TMW 1.1322 eine OD_{600} von 2,3 - 2,6; für *L. sakei* TMW 1.1383 eine OD_{600} von 3,3 - 3,5 und für *L. sakei* TMW 1.1393 eine OD_{600} von 2,0 - 2,2.

3.1.3.3 Metabolisierung von Aminosäuren und Dipeptiden durch *Resting Cells*

3.1.3.3.1 *Aminosäure- bzw. Dipeptidkonzentrationen*

Die Messung der Dipeptidkonzentrationen in den Fermentationssuspensionen zeigte, dass die zugesetzten Dipeptide innerhalb von 24 Stunden auch nach Zusatz von 0,3 % D-Glucose nahezu vollständig abgebaut waren (Abbildung 24). Dies war in allen Ansätzen und unabhängig vom verwendeten *L. sakei*-Stamm zu beobachten.

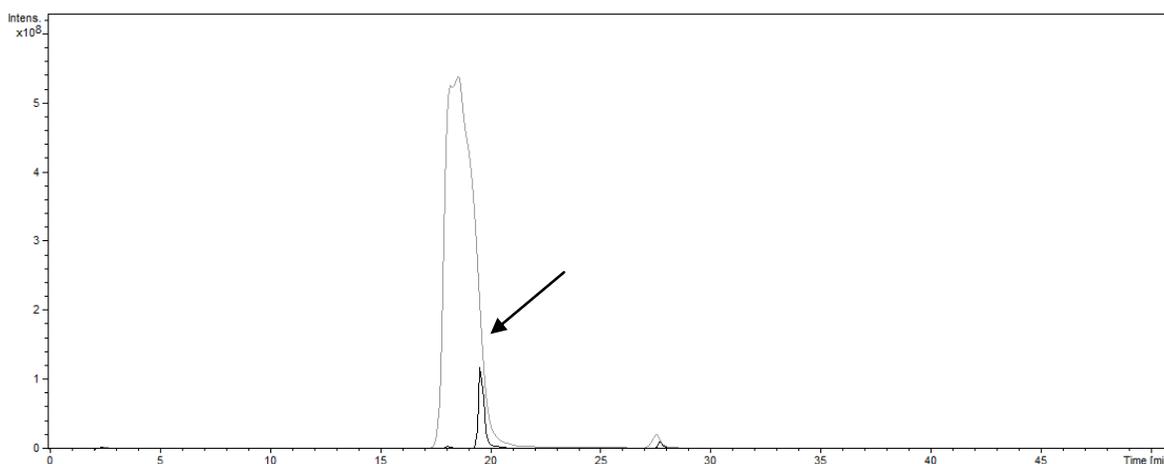


Abbildung 24: Massenspur m/z 263 (positiver Modus) der LC-UV/ESI-MSⁿ Analyse des Fermentationsansatzes mit Zusatz des Dipeptides Met-Leu ($M = 262,37$ g/mol) vor (grau) und nach (schwarz) 24-stündiger Fermentationszeit.

Die Bestimmung der freien Aminosäurekonzentrationen in den Fermentations-suspensionen ergab, in Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus der Bestimmung der Dipeptidkonzentrationen, dass der Gehalt an freien Aminosäuren in den Ansätzen mit Peptid-Zusatz während der Fermentationszeit anstieg. Die Konzentrationen der zugesetzten freien Aminosäuren hingegen änderte sich nur geringfügig (Abbildung 25). Die graphisch dargestellten Werte in Abbildung 25 entsprechen dem Umsatz Δc [mMol/L].

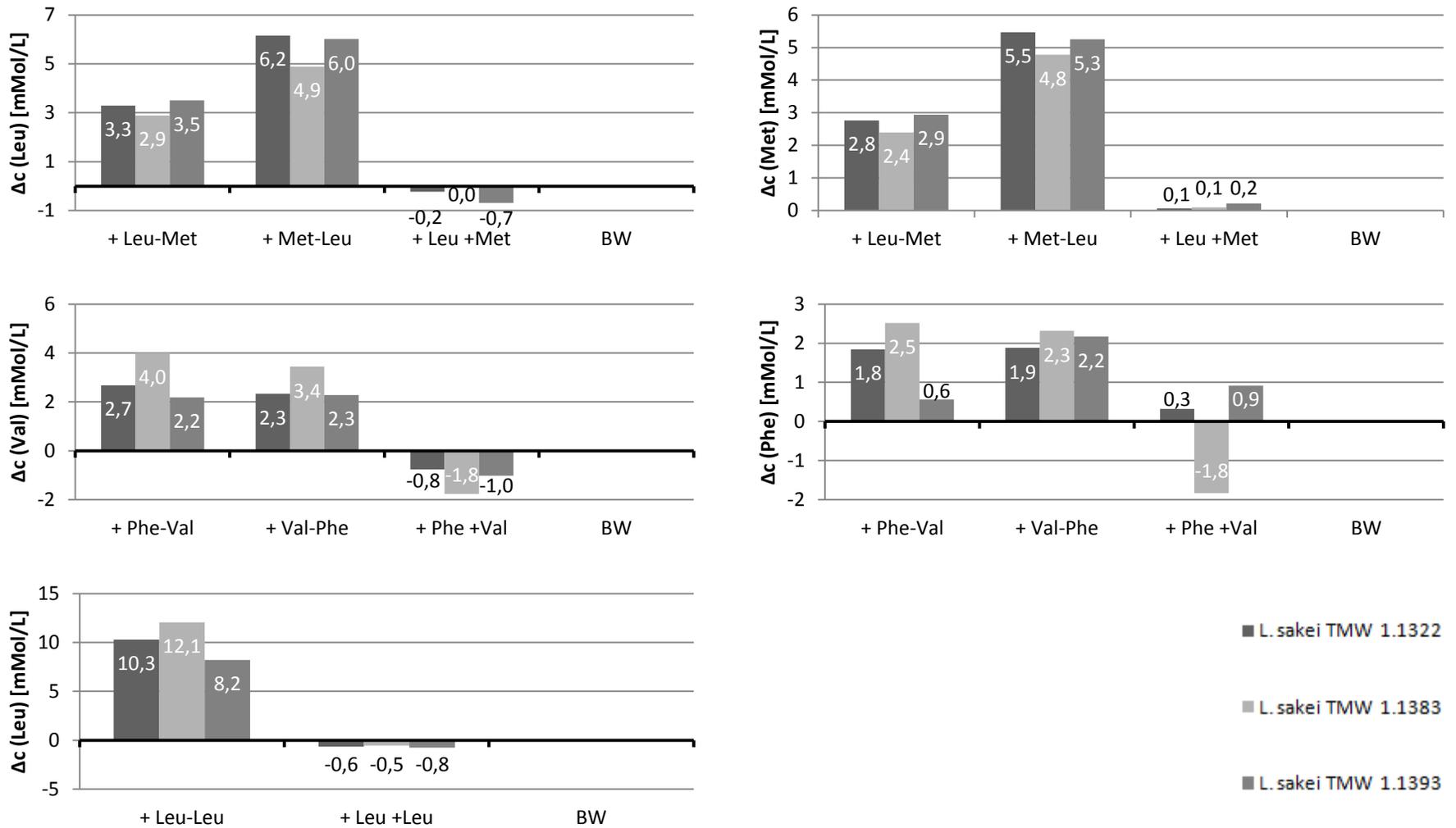


Abbildung 25: Vergleich der Konzentrationsänderungen Δc [mMol/L] an freien Aminosäuren (Achsenbeschriftung) in den Ansätzen der Versuche LEU_MET (oben), PHE_VAL (Mitte) und LEU_LEU (unten) (Tabelle 13; 2.3.4.4) durch die verschiedenen Stämme *L. sakei* (Legende) während der 5-tägigen Fermentationszeit.

Leucin-Konzentrationen von 2,9 bis 6,2 mMol/L und Methionin-Konzentrationen von 2,4 bis 5,5 mMol/L wurden in den Ansätzen mit Dipeptidzusatz (10 mMol/L) des Versuches LEU_MET am Ende der Fermentationszeit gemessen. Im Versuch PHE_VAL wurden 2,2 bis 4,0 mMol/l Valin und 0,6 bis 2,5 mMol/L Phenylalanin aus den Dipeptidsubstraten (10 mMol/L) freigesetzt. Die analysierten Leucin-Konzentrationen aus dem Dipeptid Leu-Leu im Versuch LEU_LEU bewegten sich zwischen 8,2 und 12,1 mMol/L. Im Versuch LEU_MET wurden durch alle drei *L. sakei*-Stämme höhere Konzentrationen an Leucin und Methionin aus dem Dipeptid Met-Leu freigesetzt, wobei *L. sakei* TMW 1.1383 von den verwendeten Stämmen hier die geringsten Mengen produzierte. Der gleiche Stamm wies in den Versuchen PHE_VAL und LEU_LEU hingegen in allen Ansätzen mit Peptiden die höchsten Aminosäurekonzentrationen im Medium auf. Die Bestimmung der intrazellulären Aminosäurekonzentrationen durch Messung vor und nach der Lysis der Milchsäurebakterien mittels Lysozym aus Hühnereiweiß und Ultraschall ergab keinen Anstieg der gemessenen Konzentrationen in den Ansätzen mit Dipeptidzugabe.

Bei Zusatz freier Aminosäuren (je 10 mMol/L) zu *Resting Cells* veränderten sich deren Konzentrationen nur geringfügig. Der höchste Umsatz war im Versuch PHE_VAL durch den Stamm *L. sakei* TMW 1.1383 nachzuweisen, hier kam es zu einem Abbau von 1,8 mMol/L der freien Aminosäuren während der Fermentationszeit. In den Blindwerten ohne Substratzugabe konnten keine freien Aminosäuren gemessen werden.

3.1.3.3.2 Glucosekonzentrationen

Vorversuche zeigten, dass *Resting Cells* die höchsten Metabolitmengen nach Zugabe von 0,3 % D-Glucose zur Fermentationssuspension produzierten. Es wurde deshalb auch die Änderung der Glucosekonzentrationen mittels Enzymtest (2.3.2.5) während der fünftägigen Fermentationszeit bestimmt (Abbildung 26). Die graphisch dargestellten Werte in Abbildung 26 entsprechen dem Umsatz Δc [g/L], d.h. $(c_{D-Glucose} \text{ Tag 5}) - (c_{D-Glucose} \text{ Tag 0})$.

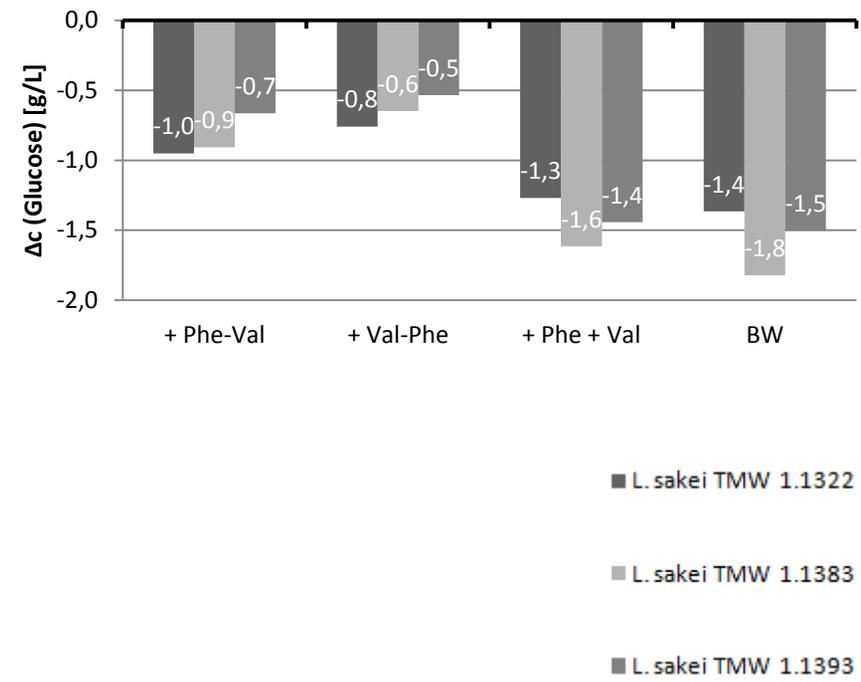
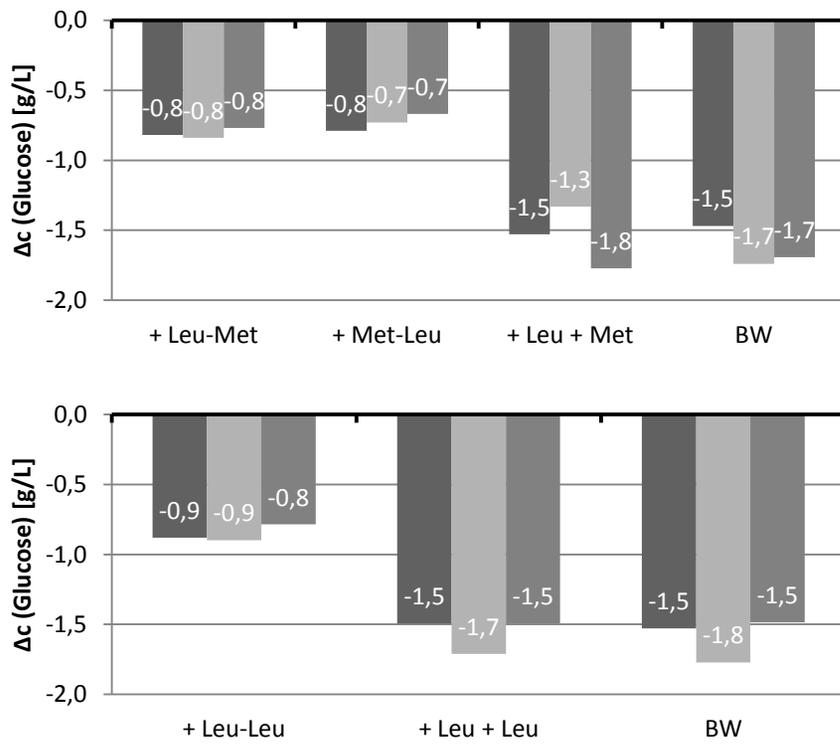


Abbildung 26: Vergleich der Konzentrationsänderungen Δc [g/L] an D-Glucose in den Ansätzen der Versuche LEU_MET (oben links), PHE_VAL (oben rechts) und LEU_LEU (unten links) (Tabelle 13; 2.3.4.4) durch die verschiedenen Stämme *L. sakei* (Legende) während der 5-tägigen Fermentationszeit. Der Wert entspricht dem Umsatz.

Da in allen Ansätzen nach einer Fermentationszeit von 48 Stunden konstante Konzentrationen gemessen werden konnten, schien ein 0,3 %iger D-Glucose-Zusatz für die Energiegewinnung der Bakterien ausreichend zu sein. In allen Versuchen und unabhängig von den *L. sakei*-Stämmen zeigte sich, dass der Gehalt an D-Glucose in den Ansätzen mit Dipeptid-Zusatz um durchschnittlich 0,8 g/L (0,5 bis 1,0 g/L) sank, während er sich in den Ansätzen mit Zusatz freier Aminosäuren bzw. im Blindwert ohne Substratzusatz um durchschnittlich 1,5 g/L (1,3 bis 1,8 g/L) verringerte.

3.1.3.3 Konzentration an flüchtigen Metaboliten

Die Konzentration an flüchtigen Metaboliten (Tabelle 13; 2.3.4.4) wurde für alle Ansätze mit allen *L. sakei*-Stämmen in Dreifachbestimmung ermittelt. In Tabelle 15 sind die Ergebnisse inklusive Standardabweichungen dargestellt. Die ermittelten Blindwerte der Substrate in Natrium-Phosphat-Puffer (50 mM; pH 6,5) - Blindwert II - enthält Tabelle 16.

Graphische Darstellungen der gemessenen Konzentrationen an flüchtigen Metaboliten sind in Abbildung 74 bis Abbildung 76 (Anhang) zu finden. Hier wurden die Werte aus den Dreifachbestimmungen gemittelt und nach Abzug der Blindwerte der Substrate in Natrium-Phosphat-Puffer (50 mM; pH 6,5) die Standardabweichungen eingetragen. Um die verwendeten Stämme *L. sakei* miteinander vergleichen zu können, ist in jedem Diagramm die Konzentration für einen flüchtigen Metabolit in den verschiedenen Ansätzen und den verschiedenen Stämmen nebeneinander dargestellt (Achsenbeschriftung).

Im Versuch **LEU_MET** war die Bildung von 3-Methylbutanal bei allen Milchsäurebakterien aus dem Dipeptid Met-Leu höher als aus Leu-Met (Tabelle 15). In gleicher Weise wurden größere Mengen an Methional und Dimethyldisulfid aus dem gleichen Dipeptid freigesetzt. Auch der Metabolit 3-Methylbuttersäure wurde durch zwei Stämme (TMW 1.1322 und TMW 1.1393) aus dem Dipeptid Met-Leu vermehrt gebildet. Dies weist auf eine hydrolytische und metabolische Präferenz der Bakterienstämme hin. Bei den Metaboliten aus der Aminosäure Methionin fiel auf, dass Methional lediglich von *L. sakei* TMW 1.1393 aus dem Dipeptid Leu-Met gebildet wurde, während alle Stämme diese Verbindung aus Met-Leu produzierten. Die gefundene Menge an Dimethyldisulfid variierte zwischen den Ansätzen und von Stamm zu Stamm stark.

Tabelle 15: Ergebnisse der Dreifachbestimmungen mit Standardabweichungen der flüchtigen Metabolite in den Dipeptidversuchen.

Flüchtige Verbindung	Versuch / Ansatz											
	LEU_MET									Blindwert I		
	L-M			M-L			L + M			A	B	C
	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C
3-Methylbutanal	22 (5)	43 (14)	56 (16)	61 (7)	86 (9)	94 (4)	104 (8)	102 (12)	163 (9)	1 (2)	2 (3)	iS
3-Methyl-1-butanol	32 (11)	17 (4)	14 (5)	32 (9)	19 (1)	10 (2)	91 (15)	64 (2)	71 (18)	1 (1)	1 (1)	4 (7)
3-Methylbuttersäure	5 (2)	35 (3)	16 (0)	11 (5)	27 (2)	23 (1)	32 (6)	46 (18)	36 (1)	1 (2)	17 (1)	2 (3)
3-(Methylthio)-propanal	nn	nn	67 (95)	122 (25)	176 (36)	189 (50)	257 (68)	295 (46)	347 (80)	nn	nn	nn
Dimethyldisulfid	4 (1)	2 (3)	1 (0)	19 (6)	7 (6)	18 (4)	13 (1)	8 (5)	19 (2)	nn	nn	nn
	PHE_VAL											
	F-V			V-F			F + V			Blindwert I		
	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C
2-Methylpropanal	1 (0)	20 (11)	1 (0)	1 (0)	22 (7)	1 (0)	28 (19)	53 (16)	37 (14)	nn	iS	iS
2-Methylpropansäure	nn	11 (5)	nn	nn	2 (1)	nn	nn	6 (1)	nn	nn	nn	nn
Phenylacetaldehyd	6 (5)	18 (13)	23 (4)	8 (5)	18 (12)	30 (4)	56 (2)	102 (18)	69 (21)	nn	iS	7 (11)
Benzaldehyd	143 (51)	247 (94)	214 (40)	200 (73)	272 (85)	424 (23)	329 (101)	601 (88)	630 (102)	22 (2)	38 (1)	34 (12)
	LEU_LEU											
	L-L			L + L			Blindwert I					
	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C
3-Methylbutanal	147 (23)	138 (2)	153 (42)				253 (79)	237 (66)	311 (139)	2 (2)	iS	iS
3-Methyl-1-butanol	31 (18)	20 (4)	7 (4)				192 (63)	150 (33)	89 (21)	iS	nn	nn
3-Methylbuttersäure	40 (10)	46 (10)	22 (4)				61 (23)	53 (10)	43 (12)	15 (0)	19 (7)	16 (8)

Konzentrationen: [µg/mL] für 2-Methylpropansäure und 3-Methylbuttersäure; [ng/mL] für alle anderen Metabolite

nn = nicht nachweisbar; iS = in Spuren (<1 ng/mL bzw. <1 µg/mL)

Stämme: A = *L. sakei* TMW 1.1322, B = *L. sakei* TMW 1.1383, C = *L. sakei* TMW 1.1393

Blindwert I: *Resting Cells* ohne Substratzugabe

Tabelle 16: Blindwert II

Ergebnisse der Bestimmungen der flüchtigen Metabolite der Substrate in Natrium-Phosphat-Puffer (50 mM; pH 6,5)

Flüchtige Verbindung	Ansatz											
	L-M	M-L	F-V	V-F	L-L	F-M-L-V	M-F-V-L	L (10mM)	L (20 mM)	M	V	F
3-Methylbutanal	2	4			9 (0)	nn	nn	13 (3)	23 (2)			
3-Methyl-1-butanol	1	2			15 (0)	nn	nn	8 (3)	16 (1)			
3-Methylbuttersäure	nn	nn			nn	nn	nn	1 (1)	iS			
2-Methylpropanal			1	iS		iS	iS				7 (2)	
2-Methylpropansäure			nn	nn		nn	nn				nn	
Phenylacetaldehyd			nn	nn		nn	nn					17 (1)
Benzaldehyd			7	6		34	22					2 (1)
3-(Methylthio)-propanal	nn	nn				nn	nn			nn		
Dimethyldisulfid	1	iS				1	7			2 (1)		

Konzentrationen: [$\mu\text{g/mL}$] für 2-Methylpropansäure und 3-Methylbuttersäure; [ng/mL] für alle anderen Metabolitenn = nicht nachweisbar; iS = in Spuren ($<1 \text{ ng/mL}$ bzw. $<1 \mu\text{g/mL}$)

Die größte Menge an flüchtigen Metaboliten wurde jedoch bei Zusatz der freien Aminosäuren Leucin und Methionin als Substrate für die drei Milchsäurebakterienstämme gebildet. Lediglich die gebildete Menge an Dimethyldisulfid war im Ansatz mit Met-Leu-Zugabe größer. Addiert man jedoch die gebildeten Mengen an Methional und Dimethyldisulfid, war auch hier die Konzentration bei Zusatz der freien Aminosäuren am höchsten.

Im Versuch **PHE_VAL** wurde der Metabolit 2-Methylpropanal in allen Ansätzen durch den Stamm *L. sakei* TMW 1.1383 in deutlich höheren Konzentrationen als durch die anderen Stämme gebildet. Auch bildete dieser Stamm im Gegensatz zu den beiden anderen den Metaboliten 2-Methylpropansäure. Die höchste Konzentration war in dem Ansatz mit Phe-Val-Zugabe messbar. Die Metabolitbildung aus der Aminosäure Phenylalanin war bei allen verwendeten Stämmen in dem Ansatz mit Zusatz der freien Aminosäuren am größten. In den Ansätzen mit Dipeptid-Zusatz variierten die gebildeten Mengen an Metaboliten aus Phenylalanin. Der Metabolit Benzaldehyd wurde vermehrt aus dem Dipeptid Val-Phe gebildet. Die Beobachtung, dass der Stamm *L. sakei* TMW 1.1383 die höchsten Konzentrationen an flüchtigen Metaboliten aus der Aminosäure Valin bildete, setzte sich für Phenylalanin nicht fort. Der Stamm *L. sakei* TMW 1.1393 zeigte eine vermehrte Bildung von Metaboliten aus diesem Substrat.

Durch den Versuchsansatz **LEU_LEU** fand ein direkter Vergleich des Transportes und der Metabolisierung einer Aminosäure (Leucin) und dem korrespondierenden Dipeptid statt. Obwohl äquimolare Mengen der Substrate zugegeben wurden (10 mMol/L Leu-Leu und 20 mMol/L Leu) wurden immer die höchsten Konzentrationen an flüchtigen Metaboliten bei Zugabe von freiem Leucin detektiert. Die gebildeten Mengen an Metaboliten variierten zwischen den Stämmen *L. sakei*.

Die chemische Bildung der flüchtigen Metabolite aus den Modellsubstraten war vernachlässigbar (Tabelle 16).

Tabelle 17 beinhaltet die im gleichen *Resting Cell* System ermittelten Werte für *L. plantarum* TMW 1.708 und *S. carnosus* TMW 2.801, zwei weiteren in der Rohwurstherstellung verwendeten Starterkulturen (2.3.4.6).

Tabelle 17: Ergebnisse der Bestimmung flüchtiger Metabolite in den Dipeptidversuchen nach Fermentation mit anderen Starterkulturen.

Flüchtige Verbindung	Versuch / Ansatz							
	LEU_MET				Blindwert I			
	L-M		M-L		L + M			
	<i>L. plantarum</i>	<i>S. carnosus</i>						
3-Methylbutanal	13	526	22	693	75	476	nn	3
3-Methyl-1-butanol	9	817	24	233	146	3425	nn	44
3-Methylbuttersäure	29	328	35	232	60	548	20	221
3-(Methylthio)-propanal	67	nn	86	nn	332	1433	nn	nn
Dimethyldisulfid	4	20	50	27	48	2	nn	iS
	PHE_VAL							
	F-V		V-F		F + V		Blindwert I	
	<i>L. plantarum</i>	<i>S. carnosus</i>						
2-Methylpropanal	iS	50	iS	25	1	1	nn	nn
2-Methylpropansäure	24	103	23	113	19	283	3	2
Phenylacetaldehyd	27	14	15	9	84	36	8	nn
Benzaldehyd	123	29	64	30	1134	6	35	2
	LEU_LEU							
	L-L		L + L		Blindwert I			
	<i>L. plantarum</i>	<i>S. carnosus</i>						
3-Methylbutanal	24	923			21	784	iS	3
3-Methyl-1-butanol	2580	115			368	8519	iS	44
3-Methylbuttersäure	364	192			205	479	26	221

Konzentrationen: [µg/mL] für 2-Methylpropansäure und 3-Methylbuttersäure; [ng/mL] für alle anderen Metabolite

nn = nicht nachweisbar; iS = in Spuren (<1 ng/mL bzw. <1 µg/mL)

Stämme: *L. plantarum* = *L. plantarum* TMW 1.708, *S. carnosus* = *S. carnosus* TMW 2.801

Blindwert I: *Resting Cells* ohne Substratzugabe

In Abbildung 77 (Anhang) sind anhand einiger Beispiele (Achsenbeschriftung) die Unterschiede zu den Milchsäurebakterien graphisch dargestellt. Der Übersichtlichkeit wegen wurde nur ein Stamm *L. sakei* neben *L. plantarum* TMW 1.708 und *S. carnosus* TMW 2.801 aufgetragen. Die Blindwerte der Substrate in Natrium-Phosphat-Puffer (50 mM; pH 6,5) - Blindwert II (Tabelle 16) - wurden hier subtrahiert.

Der Vergleich der Metabolitbildung von *L. sakei* mit anderen Starterkulturen aus der Rohwurstherstellung zeigte deutliche Unterschiede im Ausmaß der Metabolisierung der Substrate (Tabelle 17). Vor allem *S. carnosus* TMW 2.801 bildete in den meisten Fällen deutlich mehr Metabolite aus den verzweigt-kettigen Aminosäuren Leucin und Valin (z.B. 3-Methylbutanal und 2-Methylpropansäure) als die Milchsäurebakterien. Dieser Stamm bildete auch in den Versuchen LEU_MET und LEU_LEU höhere Konzentrationen an 3-Methylbutanal aus in Dipeptiden gebundenem Leucin als aus der freien Aminosäure. *S. carnosus* produzierte jedoch weniger flüchtige Verbindungen aus der aromatischen Aminosäure Phenylalanin (Phenylacetaldehyd und Benzaldehyd) im Vergleich zu den Milchsäurebakterien. Aus Methionin in Dipeptiden gebunden konnten bei diesem Stamm für den Metabolit Methional geringere Konzentrationen gemessen werden, wohingegen höhere Konzentrationen an Dimethyldisulfid aus den gleichen Substraten gebildet wurden. Bei Zusatz von freiem Methionin verhielt es sich umgekehrt, wobei *S. carnosus* deutlich größere Mengen an Methional als die Milchsäurebakterien produzierte.

Der Peptid- und Aminosäuremetabolismus von *L. plantarum* TMW 1.708 hingegen ähnelte dem der *L. sakei*-Stämme. Es produzierte annähernd die gleichen Mengen an 3-Methylbutanol, 3-Methylbuttersäure, Benzaldehyd, Phenylacetaldehyd und Methional, jedoch geringere Konzentrationen an 3-Methylbutanal und 2-Methylpropanal und höhere Konzentrationen an 2-Methylpropansäure und Dimethyldisulfid als die *L. sakei*-Stämme.

3.1.3.4 Metabolisierung von Aminosäuren und Tetrapeptiden durch Resting Cells

3.1.3.4.1 *Aminosäure- bzw. Tetrapeptidkonzentrationen*

Aufgrund der schlechten Löslichkeit der Tetrapeptide in wässrigen Systemen lagen bei diesen Ansätzen die Substrate in Form einer Suspension vor. Die Bestimmung der Tetrapeptidkonzentrationen war somit nicht möglich. Die Ansätze wurden in regelmäßigen Abständen geschüttelt. Es konnte visuell erkannt werden, dass es während der 5-tägigen Fermentationszeit zu einem Abbau der Tetrapeptide kam.

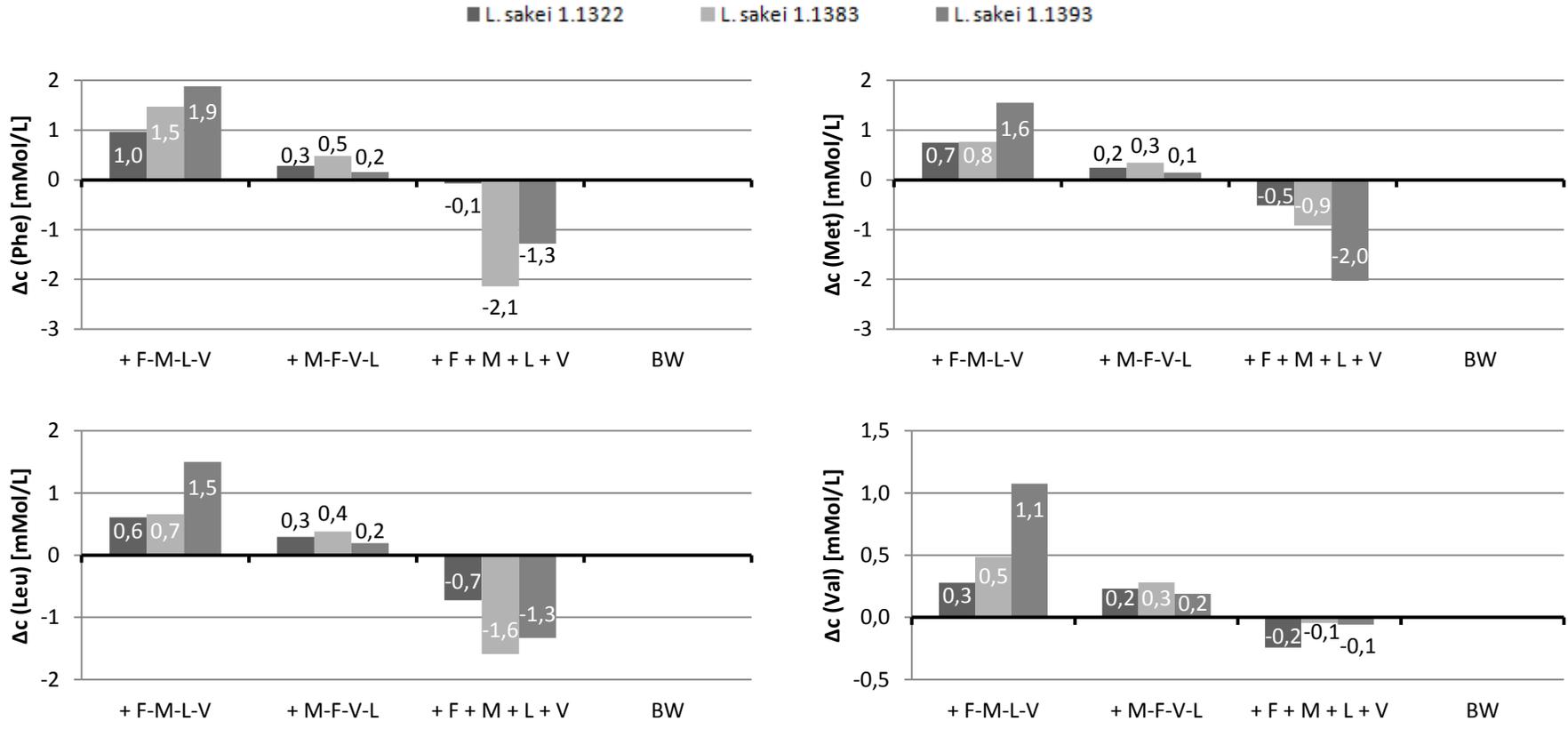


Abbildung 27: Vergleich der Konzentrationsänderungen Δc [mMol/L] an freien Aminosäuren (Achsenbeschriftung) in den Ansätzen des Versuches PHE_MET_LEU_VAL (Tabelle 14; 2.3.4.5) durch die verschiedenen Stämme *L. sakei* (Legende) während der 5-tägigen Fermentationszeit.

Die Bestimmung der Aminosäurekonzentrationen in den Fermentationssuspensionen zeigte, dass der Gehalt an freien Aminosäuren in den Ansätzen mit Peptidzusatz während der Fermentationszeit anstieg. In den Ansätzen mit Zusatz freier Aminosäuren hingegen sanken die Konzentrationen geringfügig (Abbildung 27). Die graphisch dargestellten Werte in Abbildung 27 entsprechen der Konzentrationsänderung Δc [mMol/L] während des Fermentationszeitraums.

Auffällig war ein höherer Anstieg der Konzentrationen aller Aminosäuren in den Ansätzen mit Phe-Met-Val-Leu-Zusatz durch alle Stämme, mit der höchsten Konzentration an Phenylalanin (1,9 mMol/L) durch den Stamm *L. sakei* TMW 1.1393. Von den anderen Aminosäuren setzte dieser Stamm 1,1 bis 1,6 mMol/L aus dem Tetrapeptid frei. Die weiteren Stämme lieferten lediglich 1,0 mMol/L (*L. sakei* TMW 1.1322) und 1,5 mMol/L (*L. sakei* TMW 1.1383) Phenylalanin und 0,3 bis 0,7 mMol/L (*L. sakei* TMW 1.1322) bzw. 0,5 bis 0,8 mMol/L (*L. sakei* TMW 1.1383) der anderen Aminosäuren aus diesem Substrat. In den Ansätzen mit dem isomeren Tetrapeptid Met-Phe-Val-Leu konnte ein maximaler Anstieg in der Phenylalanin-Konzentration (0,5 mMol/L) durch den Stamm *L. sakei* TMW 1.1383 gemessen werden, während die weiteren Stämme 0,3 mMol/L (*L. sakei* TMW 1.1322) und 0,2 mMol/L (*L. sakei* TMW 1.1393) Phenylalanin freisetzen. Die anderen Aminosäuren wurden in Konzentrationen von 0,1 bis 0,4 mMol/L aus Met-Phe-Val-Leu freigesetzt.

In den Ansätzen mit Zusatz freier Aminosäuren (je 10 mMol/L) kam es zu einem geringfügigen Abbau dieser. Die Umsätze differierten innerhalb der Stämme stark, mit Konzentrationsunterschieden von 0,1 bis 2,0 mMol/L. Der höchste Umsatz war durch den Stamm *L. sakei* TMW 1.1393 nachzuweisen, hier kam es zu einem Abbau von 2,0 mMol/L an freiem Methionin während der Fermentationszeit. In den Blindwerten ohne Substratzugabe konnten keine freien Aminosäuren gemessen werden. Dies zeigte sich in allen Versuchen mit *L. sakei* Stämmen.

3.1.3.4.2 Glucosekonzentrationen

Neben den Peptid- und Aminosäurekonzentrationen wurde auch die Änderung der D-Glucosekonzentrationen mittels Enzymtest (2.3.2.5) während der fünftägigen Fermentationszeit beobachtet (Abbildung 28). Die graphisch dargestellten Werte in Abbildung 28 entsprechen den Konzentrationsänderungen Δc [g/L].

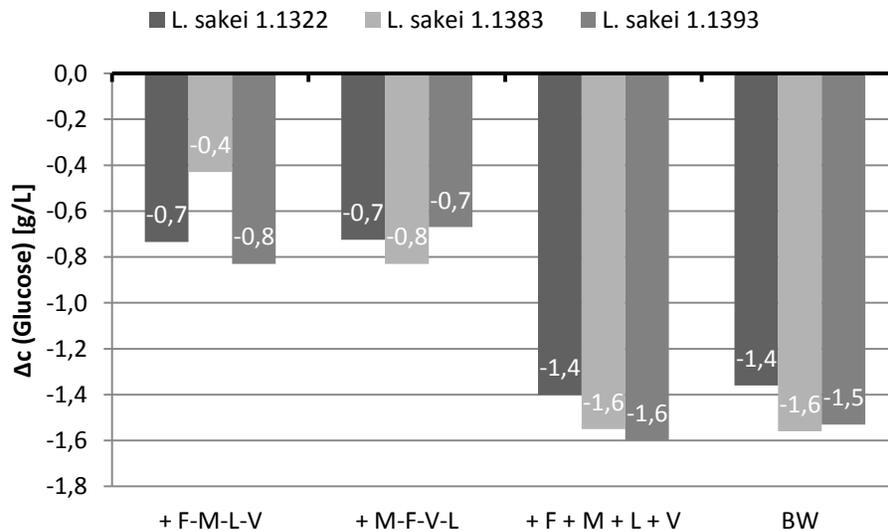


Abbildung 28: Vergleich der Konzentrationsänderungen Δc [g/L] an D-Glucose in den Ansätzen des Versuches PHE_MET_LEU_VAL (Tabelle 14; 2.3.4.5) durch die verschiedenen *L. sakei* Stämme (Legende) während der 5-tägigen Fermentationszeit.

In allen Versuchen und unabhängig von den *L. sakei*-Stämmen konnten, analog zu den Ergebnissen aus den Dipeptidversuchen, konstante Glucosekonzentrationen nach einer Fermentationszeit von 48 Stunden gemessen werden. Der Gehalt sank in den Ansätzen mit Tetrapeptidzusatz um durchschnittlich 0,7 g/L (0,4 bis 0,8 g/L), während er sich in den Ansätzen mit Zusatz freier Aminosäuren bzw. im Blindwert ohne Substratzusatz um durchschnittlich 1,5 g/L (1,4 bis 1,6 g/L) verringerte.

3.1.3.4.3 Konzentration an flüchtigen Metaboliten

Die Konzentration an flüchtigen Metaboliten (Tabelle 14, 2.3.4.5) wurde für alle Ansätze mit allen *L. sakei*-Stämmen in Dreifachbestimmung ermittelt. In Tabelle 18 sind die Ergebnisse inklusive Standardabweichungen dargestellt. Die ermittelten Blindwerte der Substrate in Natrium-Phosphat-Puffer (50 mM; pH 6,5) - Blindwert II - enthält Tabelle 16 (3.1.3.3.3).

Tabelle 18: Ergebnisse der Dreifachbestimmungen mit Standardabweichungen der flüchtigen Metabolite in den Tetrapeptidversuchen.

Flüchtige Verbindung	Versuch / Ansatz											
	PHE_MET_LEU_VAL											
	F-M-L-V			M-F-V-L			F + M + L + V			Blindwert I		
	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C
3-Methylbutanal	14 (5)	10 (1)	31 (10)	5 (1)	6 (2)	8 (3)	134 (22)	158 (24)	168 (47)	nn	nn	nn
3-Methyl-1-butanol	6 (3)	2 (2)	6 (3)	10 (4)	5 (2)	7 (1)	96 (12)	36 (4)	103 (18)	nn	iS	3 (3)
3-Methylbuttersäure	nn	nn	nn	nn	nn	nn	12 (3)	23 (1)	42 (4)	nn	nn	nn
2-Methylpropanal	iS	iS	1 (0)	iS	iS	iS	11 (2)	4 (2)	29 (10)	nn	nn	nn
2-Methylpropansäure	nn	nn	nn	nn	nn	nn	5 (1)	nn	59 (20)	nn	nn	nn
Phenylacetaldehyd	2 (4)	nn	45 (14)	nn	nn	56 (12)	208 (48)	135 (47)	635 (170)	nn	nn	2 (4)
Benzaldehyd	199 (20)	306 (93)	235 (26)	66 (16)	126 (35)	76 (18)	744 (95)	657 (47)	964 (157)	8 (4)	24 (11)	23 (21)
3-(Methylthio)-propanal	nn	nn	nn	nn	nn	nn	671 (154)	503 (30)	1126 (260)	nn	nn	nn
Dimethyldisulfid	1 (0)	1 (1)	7 (5)	14 (7)	9 (1)	17 (5)	36 (7)	16 (2)	53 (24)	nn	nn	nn

Konzentrationen: [$\mu\text{g/mL}$] für 2-Methylpropansäure und 3-Methylbuttersäure; [ng/mL] für alle anderen Metabolite

nn = nicht nachweisbar; iS = in Spuren ($<1 \text{ ng/mL}$ bzw. $<1 \mu\text{g/mL}$)

Stämme: A = *L. sakei* TMW 1.1322, B = *L. sakei* TMW 1.1383, C = *L. sakei* TMW 1.1393

Blindwert I: *Resting Cells* ohne Substratzugabe

Eine graphische Darstellung der gemessenen Konzentrationen einiger flüchtiger Metabolite ist in Abbildung 78 (Anhang) zu finden.

Die Beobachtung, dass die *L. sakei*-Stämme die größten Mengen an flüchtigen Metaboliten bei Zusatz von freien Aminosäuren bilden war im Versuch PHE_MET_LEU_VAL noch ausgeprägter (Tabelle 18). Die Milchsäurebakterien bildeten höhere Konzentrationen an 3-Methylbutanal aus dem Tetrapeptid Phe-Met-Leu-Val als aus dem Substrat Met-Phe-Val-Leu. 3-Methylbuttersäure wurde lediglich in den Ansätzen mit Zusatz freier Aminosäuren gemessen. Die Nachweisgrenze ($\mu\text{g/mL}$) ist jedoch für diesen Metaboliten im Vergleich zu den anderen flüchtigen Substanzen (ng/mL) relativ hoch. In den Ansätzen mit Tetrapeptiden als Aminosäurequelle wurden von allen Stämmen sehr geringe Mengen der Metabolite aus Valin (2-Methylpropanal und 2-Methylpropansäure) gebildet. Der Stamm *L. sakei* TMW 1.1393 produzierte größere Mengen an beiden Metaboliten aus der freien Aminosäure, als die beiden anderen verwendeten Stämme. Der gleiche Stamm zeigte eine Präferenz für die Bildung von Phenylacetaldehyd aus den Tetrapeptiden und Phenylalanin. Bei den gebildeten Mengen an Benzaldehyd zeigte sich, dass das Tetrapeptid Phe-Met-Leu-Val von allen Stämmen stärker hin zu diesem Metabolit verstoffwechselt wurde als das Tetrapeptid Met-Phe-Val-Leu. Die Metabolitbildung aus der Aminosäure Phenylalanin war bei allen verwendeten Stämmen in dem Ansatz mit Zusatz freier Aminosäuren am größten. Methional wurde von keinem verwendeten Stamm aus den Tetrapeptid-Substraten gebildet. Des Weiteren konnte die Bevorzugung des Peptides Met-Phe-Val-Leu als Substrat für die Bildung von Dimethyldisulfid beobachtet werden. Außerdem konnte durch den Versuch festgestellt werden, dass der Stamm *L. sakei* TMW 1.1393 bei diesen Substratkombinationen deutlich größere Mengen an Metaboliten aus den Aminosäuren Leucin, Valin, Phenylalanin und Methionin bildete als die anderen Stämme.

Tabelle 19 beinhaltet die im gleichen System ermittelten Werte für *L. plantarum* TMW 1.708 und *S. carnosus* TMW 2.801, zwei weiteren in der Rohwurstherstellung verwendeten Starterkulturen (2.3.4.6).

Tabelle 19: Ergebnisse der Bestimmung flüchtiger Metabolite in den Tetrapeptidversuchen nach Fermentation mit anderen Starterkulturen.

Flüchtige Verbindung	Versuch / Ansatz							
	PHE_MET_LEU_VAL				Blindwert I			
	F-M-L-V		M-F-V-L		F + M + L + V		Blindwert I	
	<i>L. plantarum</i>	<i>S. carnosus</i>						
3-Methylbutanal	2	10	1	5	74	308	nn	nn
3-Methyl-1-butanol	5	133	4	124	69	2285	nn	1
3-Methylbuttersäure	nn	317	nn	361	nn	620	nn	120
2-Methylpropanal	iS	iS	iS	iS	1	1	nn	nn
2-Methylpropansäure	nn	164	nn	171	nn	212	nn	nn
Phenylacetaldehyd	nn	nn	nn	nn	117	353	nn	nn
Benzaldehyd	183	nn	71	6	1296	192	20	30
3-(Methylthio)-propanal	nn	nn	nn	nn	322	204	nn	nn
Dimethyldisulfid	4	iS	19	5	51	1	nn	iS

Konzentrationen: [$\mu\text{g}/\text{mL}$] für 2-Methylpropansäure und 3-Methylbuttersäure; [ng/mL] für alle anderen Metabolite

nn = nicht nachweisbar; iS = in Spuren ($<1 \text{ ng}/\text{mL}$ bzw. $<1 \mu\text{g}/\text{mL}$)

Stämme: *L. plantarum* = *L. plantarum* TMW 1.708, *S. carnosus* = *S. carnosus* TMW 2.801

Blindwert I: *Resting Cells* ohne Substratzugabe

In Abbildung 79 (Anhang) sind, analog zu Abbildung 77, anhand einiger Beispiele (Achsenbeschriftung) die Unterschiede zu den Milchsäurebakterien graphisch dargestellt.

Analog zu den Ergebnissen der Dipeptidversuche zeigte auch der Vergleich der Metabolitbildung aus Tetrapeptiden durch *L. sakei* mit *S. carnosus* TMW 2.801 deutliche Unterschiede im Ausmaß der Metabolisierung der Substrate (Tabelle 19). So bildete der Stamm aus den verzweigt-kettigen Aminosäuren Leucin und Valin deutlich höhere Konzentrationen an Metaboliten. Aus der aromatischen Aminosäure Phenylalanin und dem schwefelhaltigen Methionin wurden weniger flüchtige Substanzen gebildet als durch die Milchsäurebakterien.

L. plantarum TMW 1.708 wies auch in den Tetrapeptidversuchen ein ähnliches Verhalten wie die *L. sakei*-Stämme auf. Es produzierte von manchen Metaboliten ähnliche Mengen wie die *L. sakei*-Stämme (3-Methylbutanal, 3-Methyl-1-butanol, Benzaldehyd, Dimethyldisulfid), für andere Metabolite konnten geringere Konzentrationen detektiert werden (3-Methylbuttersäure, 2-Methylpropanal, 2-Methylpropansäure, Phenylacetaldehyd, Methional).

3.1.3.5 Metabolisierung von Aminosäuren und α -Ketosäuren durch *Resting Cells*

Da bekannt ist, dass Aminosäuren über ihre korrespondierenden α -Ketosäuren zu flüchtigen Metaboliten verstoffwechselt werden, sollte überprüft werden ob dieser Biogeneseweg auch in *L. sakei* Stämmen aktiv ist. Hierzu wurde die Metabolitbildung nach Aminosäure- und α -Ketosäure-Fermentation verglichen.

Die Konzentration an flüchtigen Metaboliten wurde für alle Ansätze in Einfachbestimmung ermittelt. In Tabelle 20 und Tabelle 21 sind die Ergebnisse der Bestimmung der flüchtigen Metabolite (2.3.4.7) dargestellt.

Eine graphische Darstellung der gemessenen Konzentrationen an flüchtigen Metaboliten ist in Abbildung 80 (Anhang) zu finden. Von den ermittelten Werten wurden die Blindwerte der Substrate in Natrium-Phosphat-Puffer (50 mM; pH 6,5) - Blindwert II - subtrahiert. In jedem Diagramm ist die Konzentration eines flüchtigen Metabolites für eine Substratkombination (Aminosäure und α -Ketosäure) nebeneinander dargestellt (Achsenbeschriftung).

Tabelle 20: Ergebnisse der Bestimmung der flüchtigen Metabolite nach Zusatz der Aminosäuren Valin und Leucin sowie ihrer komplementären α -Ketosäuren.

Flüchtige Verbindung	Substrat / Ansatz											
	Val			KIV			Leu			KIC		
	R/C	BW I	BW II	R/C	BW I	BW II	R/C	BW I	BW II	R/C	BW I	BW II
2-Methylpropanal	38	iS	12	20	nn	nn						
2-Methylpropansäure	46	54	nn	180	23	45						
3-Methylbutanal							175	nn	23	nn	nn	nn
3-Methyl-1-butanol							161	nn	16	nn	nn	nn
3-Methylbuttersäure							72	92	iS	526	48	31

Konzentrationen: [$\mu\text{g/mL}$] für 2-Methylpropansäure und 3-Methylbuttersäure; [ng/mL] für alle anderen Metabolite
 R/C = *Resting Cells* + Substrate; nn = nicht nachweisbar; iS = in Spuren (<1 ng/mL bzw. <1 $\mu\text{g/mL}$)
 Blindwerte: BW I: *Resting Cells* ohne Substratzugabe, BW II: Substrate in Natrium-Phosphat-Puffer (50 mM; pH 6,5)

Tabelle 21: Ergebnisse der Bestimmung der flüchtigen Metabolite nach Zusatz der Aminosäuren Phenylalanin und Methionin sowie ihrer komplementären α -Ketosäuren.

Flüchtige Verbindung	Substrat / Ansatz											
	Phe			PPA			Met			KMBA		
	R/C	BW I	BW II	R/C	BW I	BW II	R/C	BW I	BW II	R/C	BW I	BW II
Phenylacetaldehyd	260	nn	22	nn	nn	nn						
Benzaldehyd	990	11	5	17402	7	5682						
3-(Methylthio)-propanal							686	nn	nn	nn	nn	nn
Dimethyldisulfid							14	iS	3	659	iS	146

Konzentration: [ng/mL]; R/C = *Resting Cells* + Substrate; nn = nicht nachweisbar; iS = in Spuren (<1 ng/mL)
 Blindwerte: BW I: *Resting Cells* ohne Substratzugabe, BW II: Substrate in Natrium-Phosphat-Puffer (50 mM; pH 6,5)

Die vergleichende Metabolisierung von Aminosäuren und deren komplementären α -Ketosäuren zeigte, dass in einigen Fällen deutlich mehr flüchtiger Metabolit aus den α -Ketosäuren gebildet wird. So wurden im Fall von 3-Methylbuttersäure die 7-fache Menge aus α -Ketoisocaproinsäure (KIC) im Vergleich zu Leucin gebildet, bei 2-Methylpropansäure konnte fast die 4-fache Menge aus α -Ketoisovaleriansäure (KIV) im Vergleich zu Valin gemessen werden. Am deutlichsten wurde dies bei den Metaboliten aus Phenylalanin und Methionin, hier lagen nach der Fermentation die 17-fache und die 47-fache Menge an Benzaldehyd aus Phenylpyruvat (PPA) und Dimethyldisulfid aus α -Keto- γ -(methylthio)buttersäure (KMBA) vor. Die Metabolite 2-Methylpropanal, 3-Methylbutanal, 3-Methyl-1-butanol, Phenylacetaldehyd und Methional wurden vermehrt bzw. ausschließlich aus der jeweiligen Aminosäure gebildet (Tabelle 20 und Tabelle 21; Abbildung 80, Anhang)

3.1.4 Zusammenfassung und Diskussion

Ziel der Untersuchungen zur Metabolisierung von Aminosäuren in mMRS-Medium durch *L. sakei* (3.1.1) war es, die physiologische Fähigkeit der *L. sakei*-Stämme Aminosäuren aufzunehmen und zu metabolisieren zu überprüfen. Die Ergebnisse zeigten, dass sich die dargestellte Methodik gut eignete um Unterschiede im Metabolismus von freien Aminosäuren bei einem 50 mMolaren Überangebot zu beobachten. Durch das Überangebot im mMRS-Medium kam es in allen Fällen zu einer vermehrten Umsetzung der zugesetzten freien Aminosäuren. Die Zunahme der Konzentrationen der Aminosäuren Alanin, Glycin, Leucin, Isoleucin, Threonin, Tyrosin und Valin im mMRS-Medium während der Fermentation, wenn diese nicht zugesetzt wurden, ist durch die Aktivität von Proteinasen und Peptidasen, die Aminosäuren aus den im Medium enthaltenen Proteinen und Peptiden abspalten, erklärbar. Da die extrazelluläre proteolytische Aktivität von *L. sakei* als gering beschrieben wird (Freiding et al., 2011; Sanz et al., 1999), ist dies auf intrazellulären Proteinasen und Peptidasen aus gestorbenen und lysierten Zellen zurückzuführen. Candogan et al. (2009) konnten während der Reifung von Rohwurst die Zunahme der freien Aminosäurekonzentrationen durch *L. sakei* beobachten. Fadda et al. (1999) stellten ebenso eine signifikante Freisetzung von freien Aminosäuren durch dieses Bakterium an sarkoplasmatischen Proteinen aus Schweinemuskel fest, während Sanz et al. (1999) ähnliche Ergebnisse an Myofibrillen aus Schweinefleisch erhielten.

Als Folge des vermehrten Aminosäure-Umsatzes wurden die komplementären flüchtigen Metabolite (Tabelle 5, 2.3.2.1) vermehrt gebildet. Lediglich die aus den verzweigtkettigen Aminosäuren entstehenden Carbonsäuren bildeten hier eine Ausnahme. Es ist jedoch zu

erwähnen, dass die Konzentrationen hier um das tausendfache höher waren und die Carbonsäuren somit die mengenmäßig am meisten gebildeten Metabolite darstellten. Dies wurde auch durch Larrouture et al. (2000) festgestellt, die den Metabolismus von Leucin in einer Konzentration von 2 mMol/L durch *Resting Cells* verschiedener Starterkulturen verglichen. *L. sakei* TMW 1.1322 bildete hier lediglich 3-Methylbuttersäure, weitere Metabolite aus diesem Substrat konnten sie nicht detektieren. Herranz et al. (2005) wies die vermehrte Bildung der flüchtigen Metabolite aus zugesetzten verzweigtkettigen Aminosäuren in Rohwürsten nach. Die sensorische Analyse ergab eine bessere Qualität der Rohwürste bei Aminosäurezusatz. Allerdings waren neben einem *Lactobacillus*-Stamm (*L. plantarum*) auch zwei *Staphylococcus*-Stämme (*S. carnosus* und *S. xylosus*) in der Starterkultur. Der Einfluss des *Lactobacillus* auf die Bildung der flüchtigen Substanzen wurde nicht erörtert. Tremonte et al. (2010) konnten durch Untersuchungen zum Einfluss von *S. xylosus* auf das Wachstum und die Proteolyseaktivität von *L. sakei*-Stämmen feststellen, dass beide Faktoren durch die Anwesenheit von *Staphylococcus*-Stämmen gesteigert wurden. Montel et al. (1998) halten die Beteiligung von *L. sakei* an der Entwicklung charakteristischer Aromen für wahrscheinlich, da die innere Bakterienflora von Rohwürsten von Milchsäurebakterien dominiert wird und sie Zellzahlen von 10^8 koloniebildende Einheiten pro Gramm am Ende der Reifung erreichen.

Im Zellwachstum konnten keine signifikanten Unterschiede bei Zugabe der Substrate beobachtet werden. Studien mit *Lactobacillus plantarum* und *Pediococcus pentosaceus* zeigten, dass es zu einem Anstieg des Zellwachstums bei Zugabe von Aminosäuren zu MRS-Medium kommt (Aredes Fernández et al., 2003; Saguir et al., 2008). In der hier vorliegenden Studie wurde auch das Wachstum einer Kontrolle ohne Aminosäurezusatz gemessen, das Ergebnis konnte jedoch für *L. sakei* nicht bestätigt werden.

Es sollten Untersuchungen zur Metabolisierung von Dipeptiden in mMRS-Medium durch *L. sakei* (3.1.2) durchgeführt werden, um die Aufnahme und die Metabolisierung von Peptidsubstraten durch die *L. sakei*-Stämme zu bestimmen. Des Weiteren sollten Unterschiede im Ausmaß der Metabolisierung im Vergleich zu freien Aminosäuren und aufgrund der Stellung der Aminosäuren innerhalb der Peptide überprüft werden. Anhand der durchgeführten Bestimmungen wurde festgestellt, dass eine Beobachtung der Metabolisierung von Aminosäuren und Peptiden in einer Konzentration von 2 mMol/L bzw. 4 mMol/L in mMRS-Medium schwierig ist. Durch die hohen Konzentrationen an Proteinen, Peptiden und Aminosäuren aus Pepton, Fleischextrakt und Hefeextrakt im mMRS-Medium, gestaltete sich die Beobachtung der Metabolisierung von geringen Mengen an zugesetzten freien Aminosäuren und Peptiden als schwierig. Auch für die Beobachtung

der Bildung von flüchtigen Verbindungen und die Messung von geringfügigen Unterschieden im Metabolitmuster von verschiedenen Stämmen *L. sakei* war das verwendete mMRS-Medium zu komplex. Durch die vielen Aminosäure-, Peptid- und Proteinenthaltenden Inhaltsstoffe war es nicht möglich, absolut reproduzierbare Ausgangssituationen zu schaffen und somit geringe Unterschiede in den Metabolisierungsmustern der Lactobazillen zu messen. Der Substratüberschuss und die biologische Variabilität führten zu nicht eindeutigen Ergebnissen. Wie sich herausstellte war ein weniger komplexes und definierteres System nötig, um die geringfügigen Unterschiede im Abbau und der Metabolisierung von Aminosäuresubstraten messen und vergleichen zu können. Hierfür wurde eine Methode zur Messung geringster Unterschiede in der Metabolisierung von Aminosäuren und Peptiden entwickelt (2.3.4.3).

Ziel der Versuche zur Metabolisierung von Aminosäuren und Peptiden durch *Resting Cells* (3.1.3) war es zu klären, ob Unterschiede im Umfang der Metabolisierung durch verschiedene Stämme *L. sakei* messbar sind und ob die Stellung der Aminosäuren innerhalb der Peptide eine Bevorzugung der zellulären Transportsysteme bzw. der Enzyme, die für die Metabolisierung der Aminosäuren zu den flüchtigen Substanzen verantwortlich sind, erkennen lassen.

Aufgrund der Ergebnisse der Messung der Dipeptid- und Aminosäurekonzentrationen in den Fermentationssuspensionen kann angenommen werden, dass die Dipeptide teilweise in ihre Aminosäure-Komponenten hydrolysiert wurden. Da in den Ansätzen mit Dipeptidzusatz nach deren Spaltung nicht die vollständige zugesetzte Menge an Aminosäuren extrazellulär, wie auch intrazellulär gemessen werden konnte wird davon ausgegangen, dass sie rasch und unverändert aufgenommen und teilweise extrazellulär hydrolysiert werden. Durchschnittlich wurden lediglich 3,3 mMol/L Aminosäuren aus 10 mMol/L Dipeptiden freigesetzt und nur durchschnittlich 0,9 mMol/L freie Aminosäuren von den Zellen aufgenommen. Daher kann angenommen werden, dass 5,8 mMol/L Dipeptide unmittelbar aufgenommen wurden. Dies legt nahe, dass ein erheblicher Anteil der Dipeptide unverändert von den Milchsäurebakterien assimiliert wurde. Freie Aminosäuren hingegen stellten ungeeignete Substrate dar und wurden nur in geringen Mengen umgesetzt. Ähnliche Ergebnisse sind auch für *Lactococcus lactis* (Stuart et al., 1999; Kunji et al., 1993) und *Escherichia coli* (Mandelstam, 1958) bei einem Mangel an Energiequellen in der stationären Phase beobachtet worden. Sie zeigten, dass die Fähigkeit der Bakterien Perioden mit einem Mangel an Kohlenhydraten zu überleben mit ihrer Fähigkeit bestimmte Aminosäuren zu transportieren und metabolisieren zusammenhängen könnte. Da die Synthese neuer Proteine während dieser Periode

beobachtet wurde, nahmen sie an, dass Peptide das Überleben verlängern indem sie eine Energiequelle liefern, Aminosäuren bereitstellen und den Abbau von essentiellen Proteinen minimieren. Saguir et al. (2008) beobachteten in *L. plantarum* einen hohen Dipeptid-Umsatz, was die Anwesenheit einer Peptid-Hydrolase mit einer hohen Aktivität in den Zellen nahelegt. Die Akkumulation von Aminosäuren aus Dipeptiden in den Zellen war höher als aus freien Aminosäuren, was die Hauptrolle der Dipeptide als Stickstoffquelle für das mikrobielle Wachstum bestätigte. In *Lactobacillus sanfranciscensis* und *Lactobacillus plantarum* konnte ein ineffizienter Transport von freien Aminosäuren gezeigt werden, was in niedrigen Aminosäurekonzentrationen und einer niedrigen Aminosäure-Metabolisierung resultierte. Dennoch wurden die eingesetzten Peptide quantitativ durch die intrazellulären Peptidasen hydrolysiert (Vermeulen et al., 2006).

In den Dipeptidversuchen konnten größere Mengen an freien Aminosäuren in den Medien nach der Fermentationszeit gemessen werden, als dies bei den Tetrapeptiden der Fall war. Diese wurden jedoch auch nicht im gleichen Maße aufgenommen bzw. gespalten. Visuell waren auch nach der Fermentationszeit größere Mengen an Tetrapeptiden in den Suspensionen vorhanden. Aufgrund der sehr schlechten Löslichkeit der Tetrapeptide in wässrigen Systemen lagen bei diesen Ansätzen die Substrate in Form einer Suspension vor. Eine mögliche Ursache für die geringe Aufnahme ist der Mangel an Oligopeptid-Transportsystemen in *L. sakei*. Lediglich ein putatives Transportsystem für Oligopeptide wurde in der Gensequenz von *L. sakei* durch den Vergleich mit anderen Milchsäurebakterien erkannt. Es konnten jedoch homologe Gene die ein Di-/Tripeptid-ABC-Transportsystem bestehend aus fünf Untereinheiten (DppA/P, DppB, DppC, DppD und DppF) und ein Di-/Tripeptid-*ion-linked*-Transportsystem (DtpT) kodieren identifiziert werden (1.4; Freiding et al., 2011; Liu et al., 2010).

Durch die Bestimmung der freien Aminosäurekonzentrationen wurden auch Unterschiede zwischen den Stämmen und aufgrund der Substrate erkannt. Im Versuch LEU_MET wurden durch alle drei *L. sakei*-Stämme höhere Konzentrationen an Aminosäuren aus dem Dipeptid Met-Leu freigesetzt, während in den Versuchen PHE_VAL und LEU_LEU der Stamm *L. sakei* TMW 1.1383 in allen Ansätzen den höchsten Aminosäureumsatz aufwies. Im Versuch PHE_MET_LEU_VAL war ein höherer Anstieg der Konzentrationen aller Aminosäuren in den Ansätzen mit Phe-Met-Val-Leu-Zusatz durch alle Stämme zu beobachten, wobei *L. sakei* TMW 1.1393 die größten Mengen freisetzte. Dies deutete auf eine unterschiedliche Metabolisierung der strukturisomeren Peptide durch die beteiligten Transportsysteme und Hydrolasen und substratspezifische Differenzen zwischen den

verwendeten Stämmen bezüglich des Ausmaßes der Substrataufnahme und Verwertung hin.

Die Bestimmung der D-Glucose-Konzentrationen zeigte, dass der Gehalt in den Ansätzen mit Zusatz freier Aminosäuren bzw. im Blindwert ohne Substratzusatz stärker sank, als in den Ansätzen mit Peptid-Zusatz. Der geringere Verbrauch an D-Glucose bei Vorhandensein von Peptiden in den Fermentationssuspensionen ist durch eine positive Energiebilanz der Peptide in der Zelle erklärbar. Ein geringerer Energieverbrauch für die Aufnahme von Peptiden im Vergleich zu freien Aminosäuren wurde auch bei *Pediococcus pentosaceus* beobachtet (Aredes Fernández et al., 2003) und Unterschiede im Glucoseverbrauch bei Zugabe von Dipeptiden und freien Aminosäuren zu MRS-Medium mit *Lactobacillus plantarum* wurden festgestellt (Saguir et al., 2008).

Vor allem die Messung der Konzentrationen an flüchtigen Metaboliten aus den Aminosäure-Substraten nach der Fermentation sollte Unterschiede zwischen den *L. sakei*-Stämmen aufzeigen. Die Konzentrationen der flüchtigen Metabolite in den Fermentationssuspensionen wurden mit denen ohne Substratzugabe (Blindwert I) bzw. ohne Bakterienzugabe (Blindwert II) verglichen. Geringe Mengen der flüchtigen Metabolite konnten auch in den Blindwerten bestimmt werden. In den Fermentationssuspensionen mit Milchsäurebakterien und Substraten war die Bildung jedoch, je nach Metabolit, 2- bis 400-fach höher als in den Blindwerten. Eine signifikante chemische Bildung der Metabolite konnte hierdurch ausgeschlossen werden und alle *L. sakei*-Stämme waren somit in der Lage die verabreichten Substrate zu flüchtigen Substanzen umzuwandeln.

Im Dipeptid-Versuch LEU_MET zeigte sich, dass die Bildung von 3-Methylbutanal bei allen Milchsäurebakterien aus dem Dipeptid Met-Leu höher war als aus Leu-Met. Diese Beobachtung wurde, in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Bestimmung der freien Aminosäuren, als erster Hinweis auf eine stellungsabhängige Metabolisierung der Aminosäuren innerhalb der Dipeptide gewertet und durch die Untersuchungen mit Tetrapeptiden bestätigt. Hier wurde das Peptid Phe-Met-Leu-Val eingesetzt, welches die Kombination Met-Leu beinhaltet. Auch dieses Substrat wurde in höherem Umfang zu 3-Methylbutanal umgewandelt, als dies bei dem Substrat Met-Phe-Val-Leu der Fall war. Die Auswertung der Metabolitbildung aus Dipeptiden ergab auch, dass die Metabolite aus der Aminosäure Methionin (Methional und Dimethyldisulfid) verstärkt aus dem Peptid Met-Leu gebildet wurden. Auch in den Ansätzen mit dem Tetrapeptid Met-Phe-Val-Leu (Methionin am N-Terminus) als Substrat zeigte sich eine Bevorzugung dieses Peptids für die Bildung von Dimethyldisulfid. Die vermehrte Bildung der flüchtigen Metabolite aus

diesen Peptiden könnte durch die Spezifität einer von Sanz und Toldrá (1997) aufgereinigten und charakterisierten Aminopeptidase in *L. sakei* erklärbar sein. Diese zeigte unterschiedliche K_M -Werte für Met-AMC (AMC = 7-Amino-4-methylcoumarin) im Vergleich zu Leu-AMC und somit unterschiedliche Affinitäten gegenüber N-terminalen Aminosäure-Resten. Die Ergebnisse der Methional und Dimethyldisulfid-Bildung stützten die Hypothese der unterschiedlichen Metabolisierung der strukturisomeren Peptide. Der Metabolit Methional wurde des Weiteren lediglich von *L. sakei* TMW 1.1393 aus dem Dipeptid Leu-Met gebildet. Es wird angenommen, dass Dimethyldisulfid durch Oxidation von Methanthiol gebildet wird, welches durch Eliminierung entweder aus Methional oder Methionin entsteht. Da Dimethyldisulfid auch in den Ansätzen mit Leu-Met-Zusatz der anderen *L. sakei*-Stämme zu finden war, kann davon ausgegangen werden, dass zuvor Methional gebildet wurde. Eine Bildung über den alternativen Stoffwechselweg durch Cystathionin- γ -Lyase ist unwahrscheinlich. Keines der Gene, die Enzyme des Methionin- und Cystein-Metabolismus in Milchsäurebakterien kodieren, konnte im Genom von *L. sakei* 23K identifiziert werden (Gao et al., 1998; Liu et al., 2008).

Durch den Versuch PHE_VAL wurde eine Stamm-spezifische Präferenz für die Bildung von 2-Methylpropanal und 2-Methylpropansäure beobachtet. Die größten Mengen dieser Metabolite wurden durch den Stamm *L. sakei* TMW 1.1383 bei Zugabe von Phe-Val, Val-Phe oder der freien Aminosäuren Phenylalanin und Valin zu den Fermentationssuspensionen gebildet, was die hydrolytische Präferenz dieses Stammes bestätigt. Hierbei schien auch die Stellung der Aminosäuren innerhalb der Peptide von Bedeutung zu sein. In dem Ansatz mit Zusatz von Phe-Val wurde fast die fünffache Menge an 2-Methylpropansäure gebildet als dies bei Val-Phe-Zusatz der Fall war. Eine ähnliche Bevorzugung konnte für die flüchtigen Metabolite aus Phenylalanin nicht beobachtet werden. Sie wurden vermehrt durch den Stamm *L. sakei* TMW 1.1393 gebildet. Dieser zeigte auch in den Tetrapeptidversuchen eine Präferenz für die Bildung von Phenylacetaldehyd aus den Tetrapeptiden und Phenylalanin. Somit ist es wahrscheinlicher, dass sich die Stämme in ihrer Fähigkeit die Aminosäure Valin zu metabolisieren unterscheiden, als in ihrer Aufnahmefähigkeit für die Peptid- und Aminosäuresubstrate. Bei den gebildeten Mengen an Benzaldehyd zeigte sich, dass das Tetrapeptid Phe-Met-Leu-Val von allen Stämmen zu höheren Konzentrationen dieser flüchtigen Verbindung metabolisiert wurde als das Tetrapeptid Met-Phe-Val-Leu. Dies demonstriert die Bevorzugung eines Substrates aufgrund der Stellung der Aminosäuren innerhalb der Peptide und deutet auf eine höhere Affinität des peptidolytischen Systems dieser Aminosäurekombination gegenüber hin. Gleichmaßen wurden höhere

Aminosäurekonzentrationen aus Phe-Met-Leu-Val (2,6 bis 6,1 mMol/L) im Vergleich zu Met-Phe-Val-Leu (0,7 bis 1,5 mMol/L) freigesetzt.

Deutliche Konzentrationsunterschiede an 3-Methylbutanal, 3-Methylbuttersäure, Methional und Dimethyldisulfid wurden aus den Dipeptiden Leu-Met und Met-Leu als auch 2-Methylpropansäure und Benzaldehyd aus den Dipeptiden Phe-Val und Val-Phe durch die drei verwendeten *L. sakei*-Stämme freigesetzt. Dies deutete auf eine unterschiedliche Metabolisierung der strukturisomeren Dipeptide hin. Bei den Tetrapeptiden konnten Unterschiede im Gehalt an 3-Methylbutanal, Benzaldehyd und Dimethyldisulfid aus den Tetrapeptiden Phe-Met-Leu-Val und Met-Phe-Val-Leu erkannt werden. Dies stützt die Hypothese der unterschiedlichen Metabolisierung der strukturisomeren Peptide. In den Dipeptidversuchen konnte des Weiteren eine verstärkte Metabolitbildung durch die Stämme *L. sakei* TMW 1.1383 und *L. sakei* TMW 1.1393 hinsichtlich der Metabolite aus Valin bzw. Phenylalanin festgestellt werden. Auch die Tetrapeptidversuche zeigten eine vermehrte Umsetzung der Aminosäure Phenylalanin durch den Stamm *L. sakei* TMW 1.1393. Dieses Ergebnis wurde als substratspezifische Differenz bezüglich der Aufnahme und des Ausmaßes der Metabolitbildung aus Aminosäuren zwischen den verwendeten Stämmen gewertet.

Freie Aminosäuren konnten in den Versuche als die effizientesten Vorstufen für die Bildung von aromarelevanten flüchtigen Metaboliten durch Milchsäurebakterien identifiziert werden. Obwohl sie nur geringfügig von den Bakterienzellen absorbiert wurden lieferten sie im Allgemeinen höhere Konzentrationen der Aromastoffe. Durch den Dipeptid-Versuch LEU_LEU konnte der Transport und die Metabolisierung einer Aminosäure in äquimolaren Mengen in gebundener (Dipeptid) und freier Form direkt verglichen werden. In den Tetrapeptidversuchen war dieses Phänomen sehr viel ausgeprägter. In einigen Fällen konnten in den Ansätzen mit Peptidzusatz keine flüchtigen Metabolite nachgewiesen werden. Die einzige Ausnahme bildete der Metabolit 2-Methylpropansäure im Dipeptid-Versuch PHE_VAL. Hier bildete *L. sakei* TMW 1.1383 die höchste Konzentration in dem Ansatz mit einer 10 mMolaren Konzentration des Dipeptides Phe-Val. Von den anderen Stämmen *L. sakei* wurde diese Substanz nicht akkumuliert. Die meisten Studien, in denen die bevorzugte Aufnahme von Peptiden im Vergleich zu freien Aminosäuren nachgewiesen wurde, beschränkten sich auf die Erfassung des Wachstums der Mikroorganismen und die Hydrolyse der Peptidsubstrate (Foucaud et al., 2001; Kunji et al., 1996; Saguir et al., 2008; Smit und Konings, 1990). Die Bildung von Metaboliten aus Substraten wurden lediglich vor kurzem in einer Studie beobachtet (Vermeulen et al., 2006). Alle Experimente wurden jedoch in chemisch definierten oder Vollmedien bzw. im

Lebensmittel durchgeführt. Für die hier durchgeführten Studien wurden als System *Resting Cells* ausgewählt, um den Einfluss der Medienbestandteile auszuschließen und den Bakterien lediglich ein Substrat anzubieten. Es konnte somit die Aufnahme und der Metabolismus der Substrate durch die Bakterien in der stationären Phase unabhängig vom Wachstum beobachtet werden. Ein Vergleich der Ergebnisse mit den genannten Studien ist folglich schwer möglich. Dennoch konnte auch hier die bevorzugte Aufnahme von Peptiden, vor allem der Dipeptide, im Vergleich zu freien Aminosäuren nachgewiesen werden. Sie führte jedoch nicht zu einer vermehrten Bildung der Metabolite. Dies legt nahe, dass die Peptide nach dem Transport in die Zelle hauptsächlich für andere Zwecke als die Produktion von aromarelevanten flüchtigen Substanzen verwendet werden, z.B. im Primärstoffwechsel der Bakterien zur Bildung von Proteinen. Das Transportsystem, welches den Transport der Substrate (als Peptide oder als freie Aminosäure) in die Zelle reguliert, scheint das Schicksal der Aminosäure in der Zelle zu lenken.

Der Vergleich des flüchtigen Metabolitspektrums der *L. sakei*-Stämme mit dem anderer in der Rohwurstherstellung verwendeter Starterkulturen zeigte deutliche Unterschiede. Vor allem bei *S. carnosus* TMW 2.801, der während der Rohwurstfermentation für die Aromastoffbildung verantwortlich gemacht wird (Beck et al., 2004; Hugas und Monfort, 1997; Masson et al., 1999; Montel et al., 1998), konnten große Unterschiede im Umfang der Metabolisierung von verzweigtkettigen, aromatischen und schwefelhaltigen Aminosäuren im Vergleich zu den Milchsäurebakterien gemessen werden. Auch kam es bei der Bildung von 3-Methylbutanal aus Leucin in den Versuchen LEU_MET und LEU_LEU zu höheren Konzentrationen in den Ansätzen mit Dipeptid-Zusatz als dies bei Vorhandensein freier Aminosäuren der Fall war. Außerdem wurde zum Vergleich der Stamm *L. plantarum* TMW 1.708 verwendet, ein weiteres Milchsäurebakterium das vor allem, wie auch *L. sakei*, für die Absenkung des pH-Wertes während der Rohwurstfermentation verantwortlich gemacht wird (Hammes et al., 1990; Krämer, 2002). Es zeigte in den Versuchen ein ähnliches Verhalten wie die *L. sakei*-Stämme, lediglich im Versuch PHE_VAL konnten durch *L. plantarum* TMW 1.708 mehr flüchtige Substanzen aus der Aminosäure Phenylalanin freigesetzt werden als dies bei den *L. sakei*-Stämmen und *S. carnosus* der Fall war. Es wurden wenige Studien zum Aminosäurestoffwechsel mit *Resting Cells* unterschiedlicher Starterkulturen durchgeführt. Eine vergleichbare Arbeit stammt von Larrouture et al. (2000), sie verglichen den Leucin-Metabolismus unterschiedlicher Starterkulturen aus der Rohwurstherstellung durch *Resting Cells*. Hierbei kamen sie zu ähnlichen Ergebnissen wie in der hier vorliegenden Arbeit: *L. plantarum* zeigte zwar einen deutlich erhöhten Abbau des Substrats und die Bildung großer Mengen

α -Ketoisocaproensäure im Vergleich zu den anderen untersuchten Starterkulturen, es führte jedoch nicht zur Bildung der für die Rohwurst aromarelevanten Metabolite. *S. carnosus* zeichnete sich durch eine sehr intensive Bildung des für Rohwürste wichtigen Aromastoffes 3-Methylbuttersäure (Söllner und Schieberle, 2009) aus. Auch Masson et al. (1999) untersuchten die Metabolitbildung aus Leucin durch *Resting Cells* von *S. carnosus*. Sie konnten, analog zu den hier dargestellten Ergebnissen, die Bildung der flüchtigen Substanzen 3-Methylbutanal, 3-Methyl-1-butanol und 3-Methylbuttersäure nachweisen, wobei in allen Ansätzen die Konzentration der Carbonsäure am höchsten war. Auch Montel et al. (1996) und Stahnke (1999) kamen durch Untersuchungen mit Rohwurstmodellen zu dem Ergebnis, dass *S. carnosus* vor allem 3-Methylbuttersäure aus Leucin bildet. Dies stützt auch die in der Literatur weitläufig auffindbare Meinung, dass vor allem *Staphylococcus*-Stämme für die sensorische Qualität der Produkte verantwortlich sind (Beck et al., 2004; Hugas und Monfort, 1997; Masson et al., 1999; Montel et al., 1998).

Die vergleichende Metabolisierung von Aminosäuren und deren komplementären α -Ketosäuren zeigte, dass in einigen Fällen deutlich mehr flüchtige Metabolite aus den α -Ketosäuren gebildet wurden (3.1.3.5). Dieses Ergebnis legt nahe, dass die enzymatische Aktivität in *L. sakei* hinsichtlich des ersten Schritts des metabolischen Aminosäureabbaus, der Transaminierung der Aminosäuren zu α -Ketosäuren, gering und geschwindigkeitsbestimmend ist. Vergleichbare Studien, vor allem mit Milchsäurebakterien, sind hierzu nicht durchgeführt worden. Beck et al. (2004) untersuchten den Abbau verzweigt-kettiger Aminosäuren durch *S. xylosus*. Sie setzten hierbei die α -Ketosäuren KIV und α -Keto- β -methylvaleriansäure (KMV) im Vergleich zu α -Ketoglutarsäure als Akzeptoren der Aminogruppe aus Leucin bei der Transaminierung ein. Es zeigte sich eine deutlich verbesserte Metabolisierung von Leucin zu 3-Methylbuttersäure durch Zusatz der Cosubstrate KIV und KMV. Die Autoren schlossen hieraus auf eine bessere Funktionalität dieser Verbindungen als Aminoakzeptoren, die Metabolisierung der Cosubstrate wurde nicht untersucht. Larrouture-Thiveyrat und Montel (2003) führten Studien zum Metabolismus von radioaktiv markiertem Leucin mit *Carnobacterium piscicola* (früher *Streptococcus lactis* var. *maltigenes*), unter anderem mit *Resting Cells*, durch. Sie gaben hierbei während des Wachstums der Bakterien bis zu 2 % KIC zum Medium und stellten während des Wachstums, wie auch im System der *Resting Cells*, eine deutlich höhere Metabolitbildung aus Leucin fest. Auch sie schlossen auf die Funktion der KIC als Aminoakzeptor bei der Transaminierungsreaktion, untersuchten jedoch nicht die Metabolisierung der KIC ohne Zugabe von Leucin. In den hier

durchgeführten Experimenten kann die Wirkung der α -Ketosäuren als Cosubstrate ausgeschlossen werden, da sie nicht in Kombination mit den Aminosäuren als Substrat angeboten wurden, Cosubstrat für die Transaminierungsreaktionen war in allen Fällen α -Ketoglutarsäure.

3.1.5 Schlussfolgerung

In mehreren Studien wurde die phänotypische Heterogenität von *L. sakei*-Stämmen nachgewiesen (Champomier-Vergès et al., 2001). Auch Unterschiede in der Genomgröße von *L. sakei*-Stämmen legen nahe, dass das metabolische Potenzial dieser Stämme ebenso unterschiedlich sein kann (Chaillou et al., 2009; Champomier et al., 1987). Durch den Vergleich von drei Stämmen *L. sakei* konnten in den hier durchgeführten Experimenten einige substratspezifische Differenzen bezüglich des Ausmaßes der Metabolitbildung aus Aminosäuren festgestellt und diese Vermutung somit bestätigt werden. Die Gegenüberstellung der gemessenen Konzentrationen an flüchtigen Substanzen mit den im gleichen System ermittelten Werten für *S. carnosus* zeigten aber auch, dass das metabolische Potential von *L. sakei* in Bezug auf die Bildung der aromarelevanten Metabolite als gering einzustufen ist. Da Milchsäurebakterium jedoch hohe Keimzahlen am Ende der Reifung von Rohwürsten erreichen, sollte ihr Einfluss auf das Aroma dieser Produkte nicht unterschätzt werden.

Anhand der in dieser Arbeit durchgeführten Experimente konnte gezeigt werden, dass Peptide und Aminosäuren in *L. sakei*-Zellen unterschiedlich abgebaut werden. Während Dipeptide zwar besser von den Milchsäurebakterien aufgenommen werden als freie Aminosäuren, konnten höhere Metabolitkonzentrationen aus freien Aminosäuren gemessen werden. Es kann angenommen werden, dass ein Teil der Peptide im Primärstoffwechsel der Bakterien, z.B. zur Bildung von Proteinen, verwendet wird. Im Vergleich zu Tetrapeptiden wurden Dipeptide von den zellulären Transportsystemen und Peptidasen deutlich bevorzugt. In fast allen Experimenten zeigte sich eine Bevorzugung der freien Aminosäuresubstrate hinsichtlich der Bildung von aromarelevanten flüchtigen Metaboliten. Die in mehreren Studien mit Milchsäurebakterien belegte bevorzugte Aufnahme und Umwandlung von Peptiden im Vergleich zu freien Aminosäuren konnte unter den angewandten Bedingungen und im Hinblick auf die Bildung aromarelevanter Verbindungen somit nur teilweise für *L. sakei* bestätigt werden.

Des Weiteren konnte die unterschiedliche Metabolisierung strukturisomerer Peptide in verschiedenen Versuchen nachgewiesen werden. Dies zeigt die Spezifität und Komplexität der Transport- und peptidolytischen Systeme dieser Mikroorganismen.

3.2 Aktivitätsgeleitete Aufreinigung eines Enzyms mit Transaminierungsaktivität aus *Lactobacillus sakei* TMW 1.1322

Die vergleichende Metabolisierung von Aminosäuren und deren komplementären α -Ketosäuren zeigte, dass in einigen Fällen deutlich mehr flüchtiger Metabolit aus den α -Ketosäuren gebildet wird (3.1.3.5). Dies weist darauf hin, dass das Vermögen von *L. sakei*, Transaminierungsreaktionen durchzuführen, gering ist. Die Transaminierungsaktivität von *L. sakei* TMW 1.1322 konnte jedoch durch Einsatz radioaktiv markierter Substrate nachgewiesen werden (Larrouture et al., 2000). Auch durch die in dieser Arbeit beschriebenen Versuche zur Metabolisierung von Aminosäuren und Peptiden durch Lactobazillen konnte eine Metabolisierung der Aminosäuresubstrate gezeigt werden (3.1). Bei der Untersuchung des genetischen Potentials von über 50 Stämmen *L. sakei* konnte jedoch in keinem Stamm eine Gensequenz für in Milchsäurebakterien bekannte Transaminasen mit einer Spezifität für verzweigt-kettige bzw. aromatische Aminosäuren gefunden werden (Freiding et al., 2011). Somit stellte sich die Frage, welches Enzym für die Bildung der flüchtigen Metabolite aus Aminosäuren bzw. für den ersten Metabolisierungsschritt, der Transaminierung von Aminosäuren zu α -Ketosäuren, verantwortlich ist. Aus diesem Grund wurde die aktivitätsgeleitete Aufreinigung eines Enzyms mit Transaminierungsaktivität aus *L. sakei* TMW 1.1322 durchgeführt (2.3.5).

3.2.1 Ionenaustauschchromatographie

Im ersten Schritt der zweistufigen aktivitätsgeleiteten Aufreinigung wurde der wie in 2.3.5.2 beschrieben hergestellte Rohproteinextrakt aus *L. sakei* TMW 1.1322 durch eine ionenaustauschchromatographische Trennung an den quartären Ammoniumverbindungen der Q-Sepharose™ High Performance-Matrix einer HiLoad 16/10 Q Sepharose HP-Säule fraktioniert (System Anionenaustausch; 2.2.1). Die erhaltenen Fraktionen sowie der Rohproteinextrakt mit Kontrollen wurden anschließend direkt durch einen Enzymassay auf Transaminierungsaktivität (Bestimmung des Produktes Glutaminsäure mittels Enzymtest oder α -Ketoisocaproinsäure (KIC) mittels HPLC-UV) überprüft (2.3.5.3). In den aktiven Fraktionen wurde außerdem der Proteingehalt bestimmt (2.3.5.1).

Der Enzymtest zur Bestimmung der Glutaminsäurekonzentrationen in den Enzymassays wurde direkt nach der Inkubationszeit durchgeführt, da er schneller ein Ergebnis über die Transaminierungsaktivität der Fraktionen lieferte als die Bestimmung der KIC durch HPLC-UV. Mit der Glutaminsäure-Methode konnte nur indirekt die Bildung von KIC

nachgewiesen werden. Bei der Transaminierungsreaktion von Leucin zur KIC stellt α -Ketoglutar säure ein Cosubstrat dar, welches die Aminogruppe aus Leucin aufnimmt und dabei selbst zu L-Glutaminsäure umgewandelt wird. Somit konnte über den Gehalt an L-Glutaminsäure die Transaminierungsaktivität beobachtet werden. In Abbildung 29 ist das Ergebnis der Bestimmung der Konzentrationen an L-Glutaminsäure mittels Enzymtest (2.3.2.7) im Rohproteinextrakt, den Kontrollen und den ersten neun Fraktionen aus der ionenaustauschchromatographischen Trennung graphisch dargestellt.

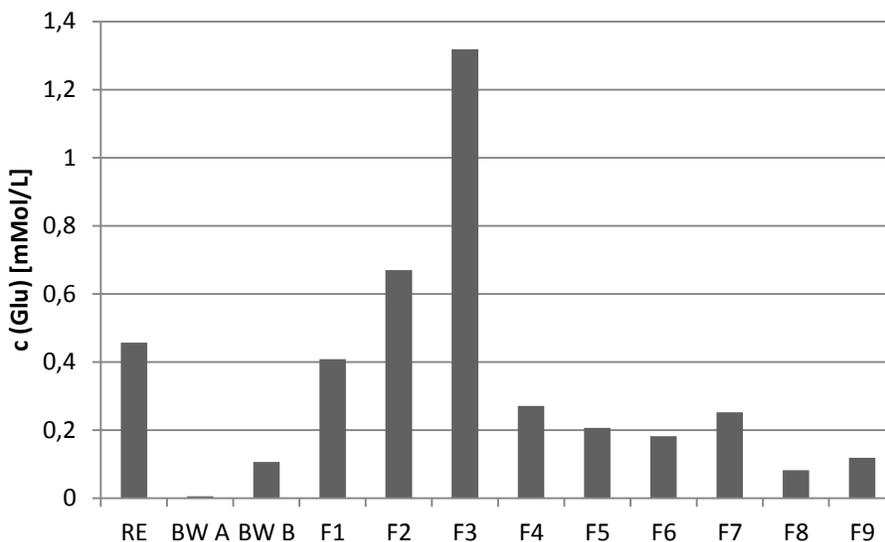


Abbildung 29: Graphische Darstellung der gemessenen Konzentrationen an L-Glutaminsäure (Glu) [mMol/L] mittels Enzymtest zur Bestimmung der Transaminierungsaktivität nach ionenaustauschchromatographischer Fraktionierung und 24 h Inkubation bei 37 °C. RE = Rohproteinextrakt; BW A = Kontrolle ohne Zusatz von Protein; BW B = Kontrolle ohne Zusatz von Substrat; F 1 - F 9 = Fraktionen 1 - 9 der chromatographischen Trennung.

Der Rohproteinextrakt wie auch die zugehörige Kontrolle Blindwert B zeigten Transaminierungsaktivität. Im Rohproteinextrakt konnten 0,46 mMol/L, im Blindwert B hingegen 0,11 mMol/L L-Glutaminsäure nachgewiesen werden. In den Fraktionen der ionenaustauschchromatographischen Trennung konnte ab der ersten Fraktion L-Glutaminsäure bestimmt werden. Es kam zu einem Konzentrationsanstieg bis Fraktion 3 (1,32 mMol/L), in Fraktion 4 bis 7 wurden 0,08 - 0,27 mMol/L L-Glutaminsäure gemessen. Für die weitere Aufreinigung des Proteins wurden die Fraktionen 1 bis 7 verwendet.

In Abbildung 30 ist das Ergebnis der Bestimmung der Konzentrationen an KIC durch HPLC-UV (2.3.2.6) im Rohproteinextrakt, den Kontrollen und den ersten 30 Fraktionen aus der ionenaustauschchromatographischen Trennung graphisch dargestellt, es ist die

Konzentration an KIC [mMol/L] im Assaypuffer des jeweiligen Ansatzes nach 24 Stunden Fermentationszeit bei 37 °C angegeben.

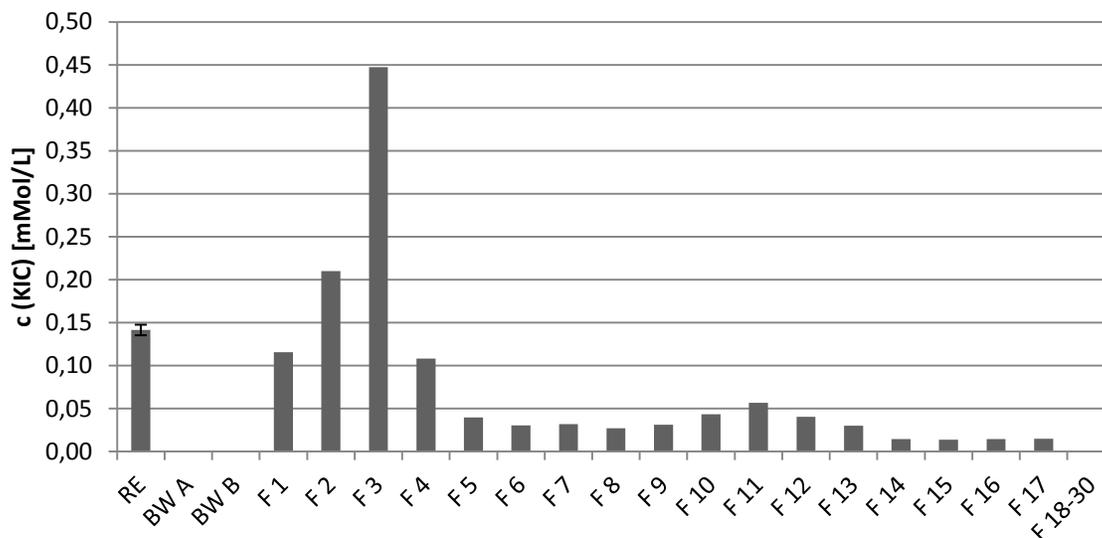


Abbildung 30: Graphische Darstellung der gemessenen Konzentrationen an α -Ketoisocapronsäure (KIC) [mMol/L] durch HPLC-UV zur Bestimmung der Transaminierungsaktivität nach ionenaustauschchromatographischer Fraktionierung und 24 h Inkubation bei 37 °C. RE = Rohproteinextrakt; BW A = Kontrolle ohne Zusatz von Protein; BW B = Kontrolle ohne Zusatz von Substrat; F 1 - F 30 = Fraktionen 1-30 der chromatographischen Fraktionierung.

Durch die Bestimmung der Konzentrationen an KIC konnte das Ergebnis der L-Glutaminsäure-Bestimmung bestätigt werden. Im Rohproteinextrakt wurde das Produkt aus der Transaminierungsreaktion in einer durchschnittlichen Konzentration von 0,14 mMol/L gebildet. In der Kontrolle Blindwert B war keine KIC nachzuweisen. Auch hier war ein deutlicher Anstieg der KIC-Konzentrationen ab Fraktion 1 (0,12 mMol/L) bis Fraktion 3 (0,45 mMol/L) messbar, ab Fraktion 4 (0,11 mMol/L) sank die Konzentration wieder. KIC konnte bis einschließlich Fraktion 17 nachgewiesen werden mit einer durchschnittlichen Konzentration von 0,03 mMol/L in den Fraktionen 5 bis 17.

Die Bestimmung des Proteingehalts durch die Methode nach Bradford (2.3.5.1) ergab die folgenden Konzentrationen [$\mu\text{g}/\mu\text{L}$]: F1: 3,07; F2: 4,08; F3: 3,43; F4: 0,81; F5: 0,14; F6: 0,06; F7: 0,08.

3.2.2 Gelfiltration

Vor dem zweiten Aufreinigungsschritt mittels Gelfiltration wurden die ersten sieben Fraktionen aus der ionenaustauschchromatographischen Trennung vereint, konzentriert

und der Salzgehalt dem Elutionspuffer angepasst (2.3.5.4). Anschließend wurden die konzentrierten aktiven Fraktionen durch Gelfiltration ihrer Größe nach fraktioniert. Hierfür diente die Sephadex™-Matrix einer Superdex 200 10/300 GL-Säule, bestehend aus quervernetzten Dextran/Agarose-Gelkügelchen (System Gelfiltration; 2.2.1). Die erhaltenen Fraktionen sowie die konzentrierten aktiven Fraktionen aus dem ersten Aufreinigungsschritt mit Kontrollen wurden anschließend direkt durch einen Enzymassay auf Transaminierungsaktivität überprüft (2.3.5.3). In den vereinten aktiven Fraktionen sowie den Fraktionen davor und danach wurde außerdem der Proteingehalt bestimmt (2.3.5.1) und ihre Reinheit durch SDS-PAGE und Silberfärbung überprüft (2.3.5.6).

Auch nach dem zweiten Aufreinigungsschritt wurde die Transaminierungsaktivität sowohl durch Messung der Konzentration an KIC, wie auch durch Bestimmung des Gehalts an L-Glutaminsäure bestimmt. Abbildung 31 stellt die gemessenen Konzentrationen an KIC durch HPLC-UV (2.3.2.6) in den vereinten aktiven und konzentrierten Fraktionen aus dem ersten Aufreinigungsschritt, dem Eluat der Konzentrierung, den Kontrollen und den Fraktionen aus der Trennung durch Gelfiltration graphisch dar.

Die vereinten aktiven und konzentrierten Fraktionen aus dem ersten Aufreinigungsschritt (REo) zeigten Transaminierungsaktivität, es konnten 0,05 mMol/L KIC nachgewiesen werden. Im Eluat der Konzentrierung (REu), wie auch in den Kontrollen BW A und BW B konnte keine KIC bestimmt werden. In den Fraktionen der Trennung durch Gelfiltration konnte durch diese Methode ab Fraktion 14 bis Fraktion 17 KIC gemessen werden. Es kam zu einem Konzentrationsanstieg bis Fraktion 16 (0,07 mMol/L), in den Fraktionen 14, 15 und 17 wurden durchschnittlich 0,02 mMol/L KIC nachgewiesen.

Abbildung 32 zeigt das Ergebnis der Bestimmung der Konzentrationen an L-Glutaminsäure mittels Enzymtest (2.3.2.7) in den vereinten aktiven und konzentrierten Fraktionen aus dem ersten Aufreinigungsschritt, dem Eluat der Konzentrierung, den Kontrollen und den Fraktionen 12 - 19 aus der Trennung durch Gelfiltration.

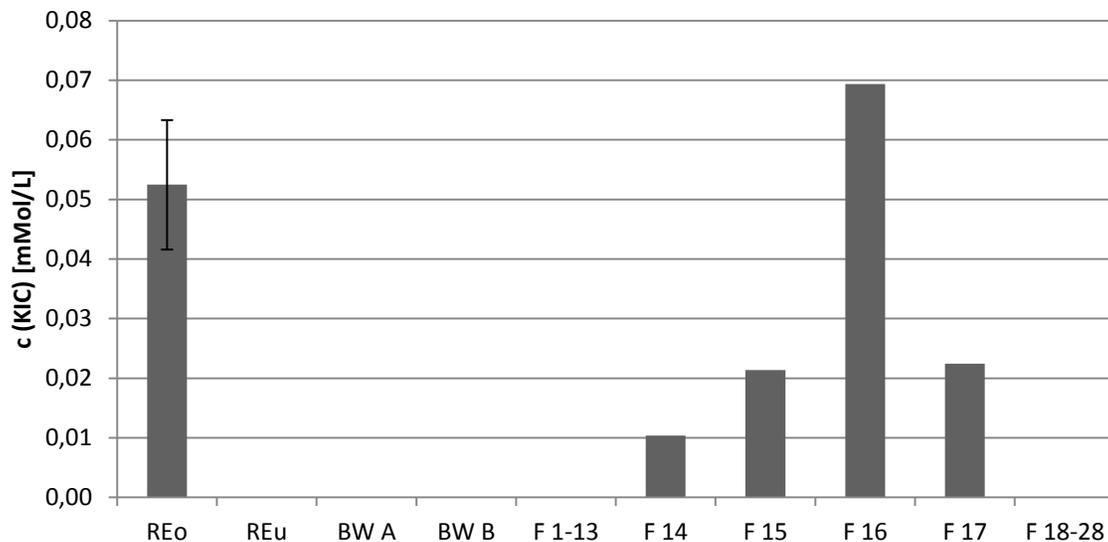


Abbildung 31: Graphische Darstellung der gemessenen Konzentrationen an α -Ketoisocapronsäure (KIC) [mMol/L] durch HPLC-UV zur Bestimmung der Transaminierungsaktivität nach Gelfiltration und 24 h Inkubation bei 37 °C. REo = vereinte aktive und konzentrierte Fraktionen aus dem ersten Aufreinigungsschritt; REu = Eluat der Konzentrierung; BW A = Kontrolle ohne Zusatz von Protein; BW B = Kontrolle ohne Zusatz von Substrat; F 1 - F 28 = Fraktionen 1-28 der Fraktionierung durch Gelfiltration.

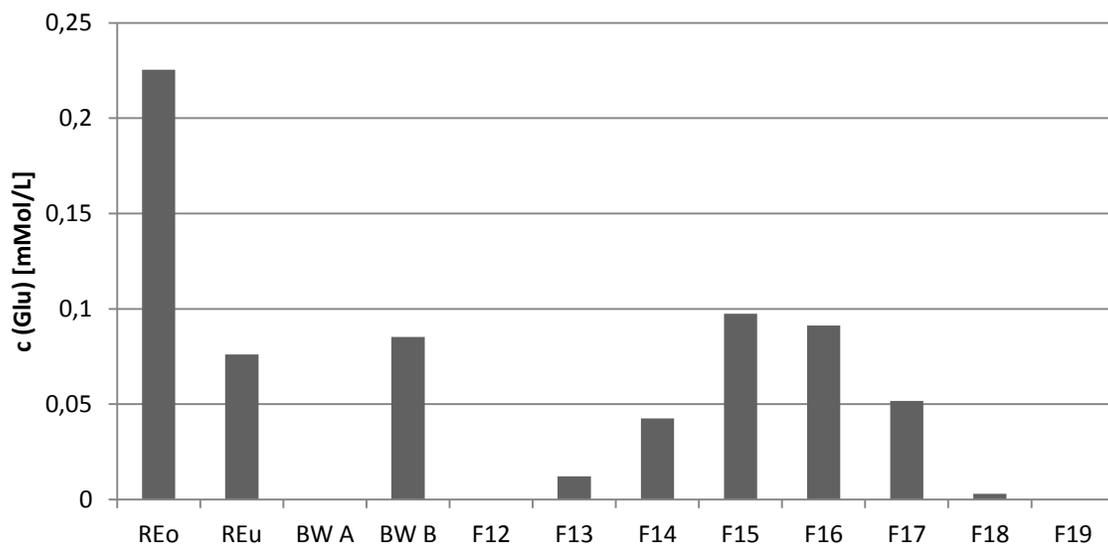


Abbildung 32: Graphische Darstellung der gemessenen Konzentrationen an L-Glutaminsäure (Glu) [mMol/L] mittels Enzymtest zur Bestimmung der Transaminierungsaktivität nach Gelfiltration und 24 h Inkubation bei 37 °C. REo = vereinte aktive und konzentrierte Fraktionen aus dem ersten Aufreinigungsschritt; REu = Eluat der Konzentrierung; BW A = Kontrolle ohne Zusatz von Protein; BW B = Kontrolle ohne Zusatz von Substrat; F 12 - F 19 = Fraktionen 12-19 der Fraktionierung durch Gelfiltration.

Durch die Bestimmung der Konzentrationen an L-Glutaminsäure konnte das Ergebnis der KIC-Bestimmung bestätigt werden. In den vereinten aktiven und konzentrierten Fraktionen aus dem ersten Aufreinigungsschritt (REo) wurde das Nebenprodukt aus der Transaminierungsreaktion in einer durchschnittlichen Konzentration von 0,23 mMol/L gebildet. Im Eluat der Konzentrierung (REu), wie auch in der Kontrolle BW B konnten hier L-Glutaminsäure in Konzentrationen von jeweils 0,08 mMol/L bestimmt werden, in der Kontrolle BW A hingegen konnte keine L-Glutaminsäure nachgewiesen werden. In den Fraktionen der Trennung mittels Gelfiltration waren auch hier in den Fraktionen 14 - 17 (durchschnittlich 0,07 mMol/L) der höchste L-Glutaminsäure-Gehalt messbar, zusätzlich konnten auch in Fraktion 13 (0,01 mMol/L) und Fraktion 18 (0,003 mMol/L) geringe Mengen nachgewiesen werden. Für alle weiteren Arbeitsschritte wurden die Fraktionen 14 bis 17 vereint und verwendet.

Die Analyse der vereinten aktiven Fraktionen durch LC-UV/ESI-MSⁿ ergab einen UV-Peak bei 280 nm und einer Retentionszeit von 10,8 min. Das Massenspektrum (positiver Mode) des Signals zeigte ein Pseudomolekülion bei m/z 664, welches im MS²-Spektrum zu m/z 542 und m/z 524 zerfällt. Der Datenbankabgleich (2.2.6) ergab als mögliche Substanz Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid (NAD), welche durch Injektion des käuflich erworbenen Standards identifiziert wurde (Abbildung 81, Anhang).

3.2.3 Entsalzung, Gefriertrocknung und SDS-PAGE

Vor der SDS-PAGE wurden die Fraktionen 14 bis 17 des zweiten Aufreinigungsschrittes mittels Gelfiltration (3.2.2) vereint, entsalzt und durch Gefriertrocknung konzentriert (2.3.5.5). Außerdem wurden die drei Fraktionen vor (F11-13) und die drei Fraktionen nach (F18-20) den aktiven Fraktionen vereint und die gleichen Arbeitsschritte durchgeführt. Nach der Entsalzung wurde ein Enzymtest auf Transaminierungsaktivität (2.3.5.5) durchgeführt und die gebildeten Konzentrationen an L-Glutaminsäure mittels Enzymtest bestimmt (2.3.2.7) (Abbildung 33).

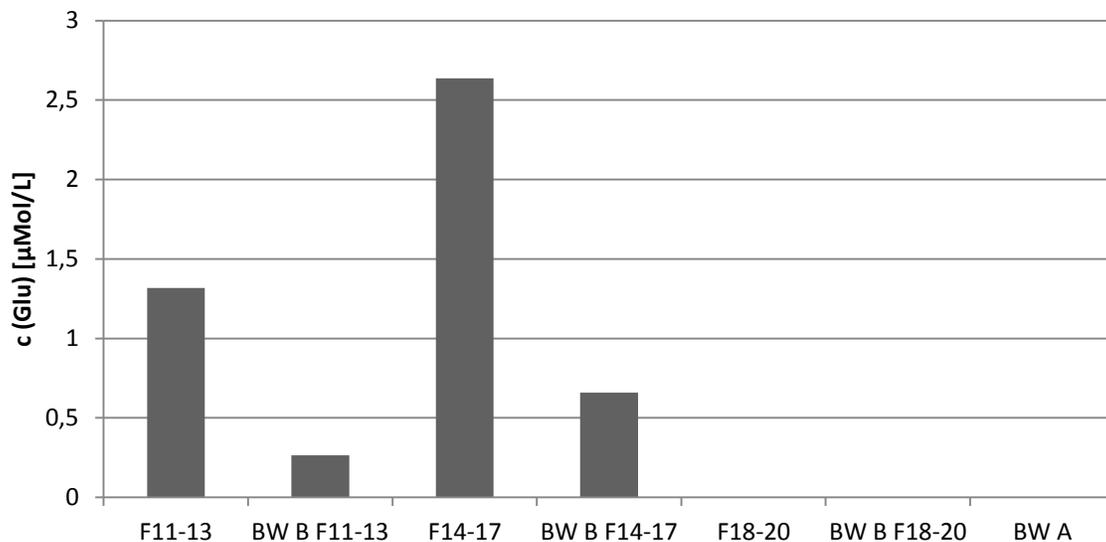


Abbildung 33: Graphische Darstellung der gemessenen Konzentrationen an L-Glutaminsäure (Glu) [$\mu\text{Mol/L}$] mittels Enzymtest zur Bestimmung der Transaminierungsaktivität der vereinten Fraktionen nach Proteinaufreinigung mittels Gelfiltration, Entsalzung und 24 h Inkubation bei 37 °C. F11-13 = vereinte Fraktionen 11 - 13; F14 - 17 = vereinte Fraktionen 14 - 17 (aktive Fraktionen); F18-20 = vereinte Fraktionen 18 - 20; BW A = Kontrolle ohne Zusatz von Protein; BW B = Kontrolle ohne Zusatz von Substrat.

Sowohl in den vereinten Fraktionen 11 - 13, wie auch in den vereinten Fraktionen 14 - 17 konnte nach der Entsalzung Transaminierungsaktivität durch Bestimmung der L-Glutaminsäurekonzentrationen in den Enzymassays nachgewiesen werden (1,32 $\mu\text{Mol/L}$ bzw. 2,64 $\mu\text{Mol/L}$). Die zugehörigen Kontrollen Blindwert B enthielten jeweils etwa ein Viertel der gefundenen Menge (0,26 $\mu\text{Mol/L}$ bzw. 0,66 $\mu\text{Mol/L}$), in den Fraktionen 18 - 20, dem zugehörigen BW B und auch der Kontrolle BW A konnte keine L-Glutaminsäure bestimmt werden.

Die Reinheit der Fraktionen nach der aktivitätsgeleiteten Aufreinigung mittels Ionenaustauschchromatographie und Gelfiltration (3.2.1 und 3.2.2) wurden durch eine SDS-PAGE und anschließender Silberfärbung überprüft (2.3.5.6). Die Proben wurden auf ein Tris-Glycin-Gradienten-Gel (4 - 20 % SDS) aufgetragen, um vor allem im niedrigen Molekulargewichtsbereich eine gute Trennung zu gewährleisten (Abbildung 34).

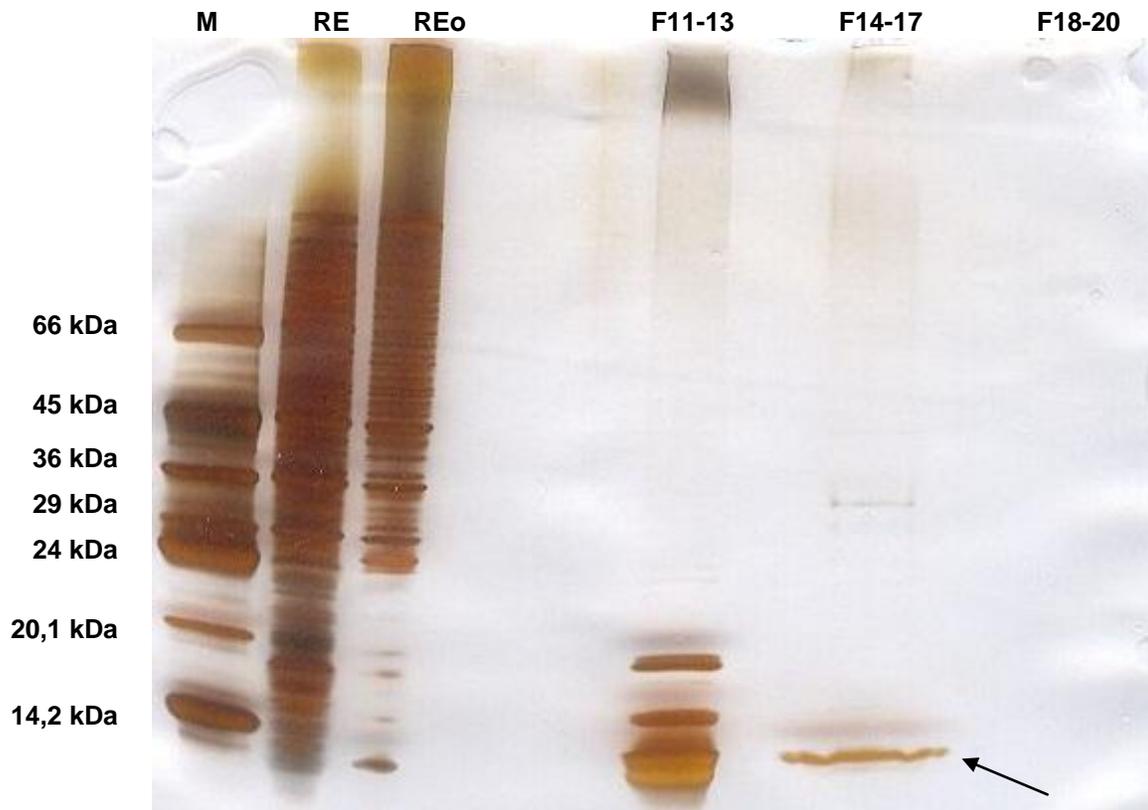


Abbildung 34: SDS-PAGE (Tris-Glycin-Gradienten-Gel, 4-20 % SDS) der Fraktionen nach der aktivitätsgeleiteten Aufreinigung mittels Ionenaustauschchromatographie und Gelfiltration. Dargestellt sind der Protein-Größenstandard (M), der für die Ionenaustauschchromatographie injizierte Rohproteinextrakt (RE); die für die Gelfiltration vereinten, aufgereinigten und konzentrierten Fraktionen (REo); die vereinten, entsalzten und konzentrierten Fraktionen der Gelfiltration (F11-13, F14-17 und F18-20).

Der für die Ionenaustauschchromatographie injizierte Rohproteinextrakt (RE) zeigte auf dem SDS-PAGE-Gel Proteinbanden in hoher Dichte über den gesamten Molekulargewichtsbereich hinweg. Bei den vereinten und konzentrierten aktiven Fraktionen nach dem ersten Aufreinigungsschritt (REo) hingegen war eine Abnahme der Konzentration an Proteinen bemerkbar, vor allem derer mit niedrigem Molekulargewicht. In den vereinten, entsalzten und konzentrierten drei Fraktionen vor den Transaminase-aktiven Fraktionen aus der Gelfiltration (F11-13) waren noch 5 Banden detektierbar mit Molekulargewichten zwischen ca. 10 und 20 kDa. Die drei Fraktionen nach den Transaminase-aktiven Fraktionen aus der Gelfiltration (F18-20) zeigten keine Proteinbanden. In den vier aktiven Fraktionen aus der Gelfiltration (F14-17) war hingegen eine stärker ausgeprägte Bande detektierbar (Pfeil, Abbildung 34). Sie wurde aus dem SDS-PAGE-Gel ausgeschnitten und sequenziert (2.3.5.7). Über den Proteingrößenstandard (M) ist ein Molekulargewicht des Proteins von ca. 10 - 12 kDa abschätzbar.

3.2.4 Sequenzierung der Proteinbande

Bei der extern durchgeführten Sequenzierung durch LC-MS/MS nach Verdau des durch die aktivitätsgeleitete Aufreinigung erhaltenen Enzyms mit Transaminierungsaktivität aus *L. sakei* TMW 1.1322 (3.2.1 bis 3.2.3), ergaben sich Peptidfragmente, welche durch Abgleich mit einer Datenbank (Mascot Search, Matrix Science Ltd., London, England) auf die Aminosäuresequenzen mehrerer Proteine aus *L. sakei* 23K (= *L. sakei* TMW 1.1322) zurückgeführt werden konnten. Das Programm führt hierfür im ersten Schritt einen Datenbankabgleich der nach Verdau und LC-MS/MS-Analyse ermittelten Peptidmassen mit experimentell ermittelten Peptidmassen durch und bestimmt so die sogenannten *Matches*. Außerdem nehmen empirisch, nach dem *Mowse scoring* Algorithmus (Pappin et al., 1993) ermittelte Faktoren Einfluss auf den *Match* und geben ihm hierdurch zusätzlich statistisches Gewicht. Hieraus errechnet das Programm einen *Ion Score*, durch den eine Aussage über die Wahrscheinlichkeit der Identifizierung im sogenannten *Protein Score* angegeben wird. *Protein Scores* werden von *Ion Scores* abgeleitet, um Protein-*Matches* nicht-wahrscheinlichkeitstheoretisch zu bewerten und geben den sogenannten *Best Match* an (2.2.6). In Abbildung 35 ist das Histogramm der hier durchgeführten Sequenzierung dargestellt. *Ion Scores* > 29 gaben Gleichheit oder erhebliche Homologie an (p-Wert < 0,05).

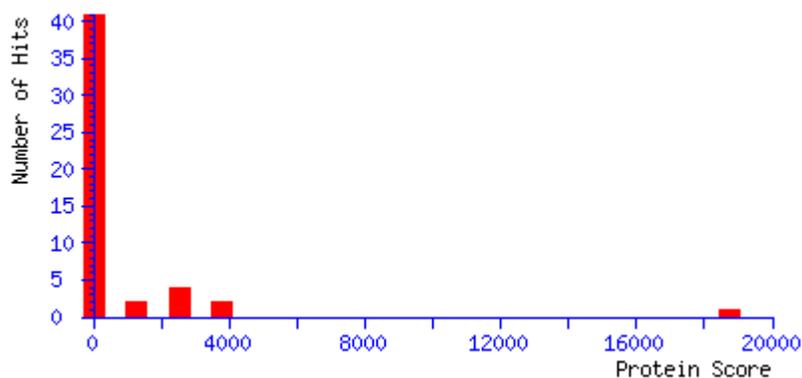


Abbildung 35: Durch das Programm *Mascot Search* erstelltes Histogramm der extern durchgeführten Sequenzierung des aktivitätsgeleitet aufgereinigten Proteins mit Transaminierungsaktivität aus *L. sakei* TMW 1.1322.

In Abbildung 36 bis Abbildung 41 sind die Aminosäuresequenzen der sechs wahrscheinlichsten Proteine abgebildet. Dargestellt ist die gesamte Aminosäuresequenz der Proteine, schwarz markiert sind die bei der Sequenzierung durch LC-MS/MS erhaltenen Peptidfragmente. Außerdem sind die Übereinstimmung, der *Protein Score* und das berechnete Molekulargewicht der Proteine angegeben.

MQKAVQLDVFGRVQGVGFRWTTKLVADRLGITGTVSNQPDGSKIIAMGPDAILEQFIGA
VKASPTPSGRVDRVVQTPLQDVSACHKFSVVG

Abbildung 36: Putative Acylphosphatase (NCBI Reference Sequence: YP_395991.1).
Übereinstimmung: 69,6 %. *Protein Score*: 18743. Berechnetes Molekulargewicht: 9,6 kDa.

MRVHITMECTECHERSYLSNKNKMNNPDRLELKKYCPREKVTLHRETK

Abbildung 37: 50S ribosomales Protein L33 (NCBI Reference Sequence: YP_395944.1).
Übereinstimmung: 89,8 %. *Protein Score*: 4110. Berechnetes Molekulargewicht: 5,9 kDa.

MTAQILNEANFNDEIKEGVTLVDFWATWCPPCKMQGPIVEQLADDYAGKAKIAKVDVDQN
QNLAQFGIQAIPTELLIMKDGQLQEQLVGLQRKEALATKLDATLA

Abbildung 38: Thioredoxin (NCBI Reference Sequence: YP_394828.1).
Übereinstimmung: 82,9 %. *Protein Score*: 2806. Berechnetes Molekulargewicht: 11,4 kDa.

MEKRDFHVVADTGIHARPATLLVQTASKFNSDVNLEYK GKSVNLKSIMGVMSLGVGQGA
DVTISAEGADEADAINAIEETMKKEGLSE

Abbildung 39: Phosphotransportprotein HPr (NCBI Reference Sequence: YP_396072.1).
Übereinstimmung: 38,6 %. *Protein Score*: 2233. Berechnetes Molekulargewicht: 9,2 kDa.

MANKAQLIENVASKTGLTKKDATAAVDAVFGSIQDTLKQGDKVQLIGFGTFEVRERAARK
GRNPQTGAIEIKIPASKVPAFKPGKALKDSVK

Abbildung 40: Histon-ähnliches, DNA-bindendes Protein HU (NCBI Reference Sequence: YP_395626.1).
Übereinstimmung: 71,4 %. *Protein Score*: 2019. Berechnetes Molekulargewicht: 9,5 kDa.

MENGTVKWFNAEKG YGFVTREDGSDV FVHFS AIQGE GYK TLEEGQS VSF DIEESDR GPQ
AVNVNKN

Abbildung 41: Kälteschock-Protein CspA (NCBI Reference Sequence: YP_396175.1).
Übereinstimmung: 65,2 %. *Protein Score*: 295. Berechnetes Molekulargewicht: 7,2 kDa.

Anhand der Übereinstimmung, der Häufigkeit des Auftretens der Peptidfragmente und statistischer Bewertungen wurde durch die oben genannte Datenbank ein sogenannter

Top Hit errechnet (siehe oben). Im Fall der sequenzierten Proteinbande handelte es sich hierbei um die putative Acylphosphatase (Abbildung 36).

Zusätzlich zu dem 50S ribosomalen Protein L33 (Abbildung 37) konnten durch die Datenbank weitere ribosomale Proteine mit einem geringeren *Protein Score* den Peptidfragmenten zugeordnet werden. So kamen außerdem die 30S ribosomalen Proteine S15, S16 und S21 und die 50S ribosomalen Proteine L29, L30 und L33 in Frage.

3.2.5 Lysozym

Wie in 2.3.5.2 erwähnt, wurde zu Beginn der Arbeiten zur aktivitätsgeleiteten Aufreinigung eines Enzyms mit Transaminierungsaktivität vor dem Zellaufschluss der Bakterien durch Ultraschall eine Lysozymbehandlung durchgeführt. Bei der anschließend durchgeführten Aufreinigung (2.3.5) konnte nach dem zweiten Aufreinigungsschritt mittels Gelfiltration Aktivität durch Messung der gebildeten Menge an KIC mittels HPLC-UV (2.3.2.6) in den Fraktionen 14 bis 17 festgestellt werden. Die SDS-PAGE zeigte durch Coomassie-Färbung lediglich eine Bande mit einem Molekulargewicht von ca. 14 kDa in der aktiven Fraktion 14 (Abbildung 43).

Die Bande wurde wie in 2.3.5.7 beschrieben ausgeschnitten und sequenziert. Hierbei konnte als *Top Hit* (3.2.4) mit einem *Protein Score* von 104 (p-Wert < 0,05 bei *Ions Scores* > 83) die in Abbildung 42 dargestellte Aminosäuresequenz identifiziert werden.

```
KVFGRCELAAAMKRHGLDNYRGYSLGNWVCAAKFESNFNTQATNRNTDGSTDYGILQIN  
SRWWCNDGRTPGSRNLCNIPCSALLSSDITASVNC AKKIVSDGDGMNAWVAWRNRCKG  
TDVQAWIRGCRL
```

Abbildung 42 Aminosäuresequenz des bei der Sequenzierung durch LC-MS/MS erhaltenen Proteins. Schwarz markiert sind die erhaltenen Peptidfragmente.

Die identifizierten Peptidfragmente entsprachen zu 63,6 % dem zum Zellaufschluss zugesetzten Lysozym. Auch das Molekulargewicht von Lysozym (14,4 kDa) stimmte gut mit dem der Proteinbande auf dem SDS-PAGE-Gel überein. Aus diesem Grund wurde die Transaminierungsaktivität von Lysozym aus Hühnereiweiß in unterschiedlichen Konzentrationen durch Enzymassays und Messung der gebildeten Menge an KIC mittels HPLC-UV in Doppelbestimmung untersucht (Abbildung 44).

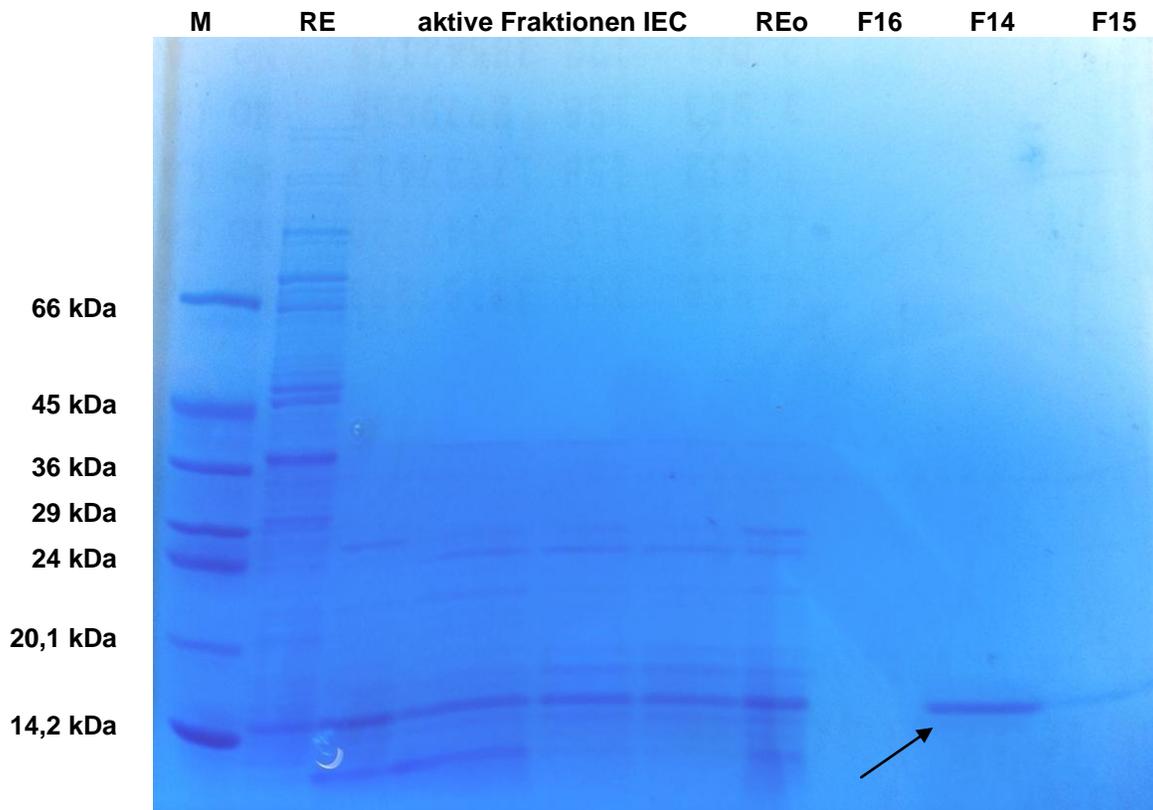


Abbildung 43: SDS-PAGE (Tris-Glycin-Gradienten-Gel, 4-20 % SDS) der Fraktionen nach der aktivitätsgeleiteten Aufreinigung mittels Ionenaustauschchromatographie und Gelfiltration. Dargestellt sind der Protein-Größenstandard (M), der für die Ionenaustauschchromatographie injizierte Rohproteinextrakt (RE); die aktiven Fraktionen nach der Ionenaustauschchromatographie (aktive Fraktionen IEC); die für die Gelfiltration vereinten, aufgereinigten und konzentrierten Fraktionen (REo); die aktiven Fraktionen der Gelfiltration (F16, F14 und F15).

Es konnte die enzymatisch katalysierte Bildung von KIC durch Lysozym aus Hühnereiweiß gezeigt werden (Abbildung 44). Die gebildeten Mengen an KIC lagen je nach Lysozymkonzentration zwischen 0,03 und 0,15 mMol/L, mit einem Maximum bei 1 mg/mL Lysozym im Assaypuffer. Die Kontrolle BW A enthielt das Reaktionsprodukt der Transaminierungsreaktion in einer Konzentration von 0,02 mMol/L, in BW B wurde keine KIC nachgewiesen. Bezogen auf die eingesetzte Proteinmenge konnte die höchste Aktivität mit 0,83 nMol KIC/ μ g Protein bei einer Lysozym-Konzentration von 0,1 mg/mL gemessen werden. Um auszuschließen, dass die in Rohproteinextrakten von *L. sakei* TMW 1.1322 gemessene Transaminierungsaktivität ausschließlich durch das zum Zellaufschluss zugesetzte Lysozym hervorgerufen wird, wurden in einem weiteren Versuch Zellen von *L. sakei* TMW 1.1322 kultiviert und geerntet (2.3.1.3) und zu gleichen Teilen aufgeteilt. Anschließend wurde je ein Rohproteinextrakt hergestellt, einmal ohne (RE) und einmal mit Lysozymbehandlung (RE Lys). Die Bildung von KIC wurde durch den

Enzymassay (2.3.5.3) und Messung der gebildeten Menge an KIC mittels HPLC-UV (2.3.2.6) in Dreifachbestimmung bestimmt. Zusätzlich wurde als Vergleich die Bildung von KIC durch Lysozym in den Konzentrationen 0,5 und 1 mg/mL in Dreifachbestimmung analysiert und als weitere Kontrolle das durch Hitze inaktivierte Lysozym (95 °C, 15 min; BW C) für den Enzymassay eingesetzt. (Abbildung 45).

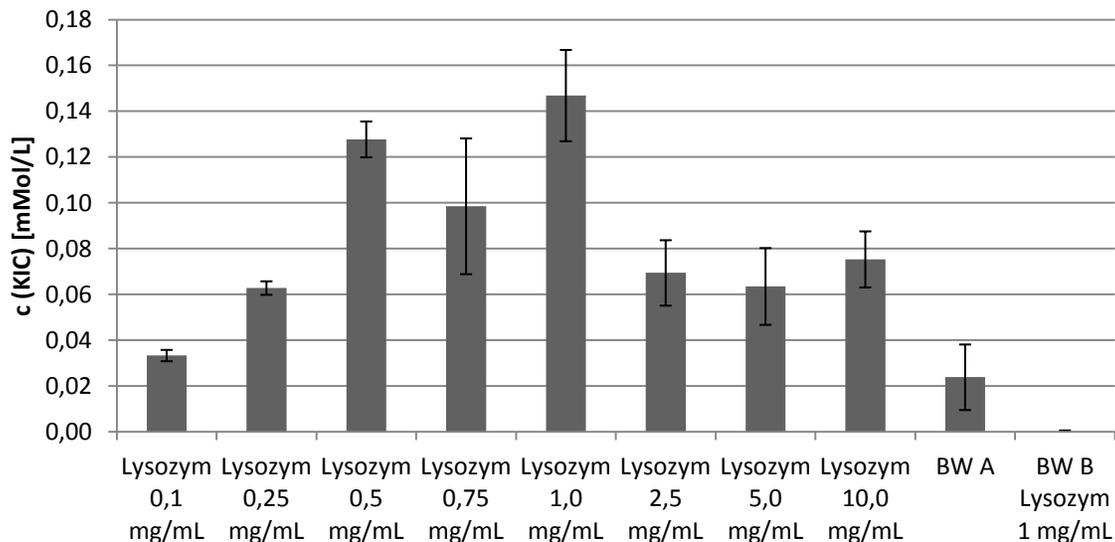


Abbildung 44: Graphische Darstellung der gemessenen Konzentrationen an α -Ketoisocapronsäure (KIC) [mMol/L] durch HPLC-UV zur Bestimmung der Transaminierungsaktivität von Lysozym nach 22 h Inkubation bei 37 °C. Lysozym 0,1-10,0 mg/mL = Assaypuffer mit Lysozym in den angegebenen Konzentrationen; BW A = Kontrolle ohne Zusatz von Lysozym; BW B = Kontrolle ohne Zusatz von Substrat, 1,0 mg/mL Lysozym.

Auch ohne Lysozymbehandlung zeigte der Rohproteinextrakt aus *L. sakei* TMW 1.1322 Transaminierungsaktivität (Abbildung 45). Es konnte hier eine höhere Konzentration an KIC im Assaypuffer gemessen werden als in den Ansätzen mit Lysozymbehandlung. Einen möglichen Grund hierfür könnte ein weiterer Waschschrift nach der Lysozymbehandlung darstellen, da hierbei die Proteine aus schon lysierten Zellen ausgewaschen werden. Auch die Proteinkonzentrationen der Rohproteinextrakte waren unterschiedlich: RE hatte einen Proteingehalt nach Bradford von 19,8 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, RE Lys hingegen von 16,0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. In den Enzymassays zur Bildung von KIC durch Lysozym konnten deutlich geringere Konzentrationen gemessen werden als bei den Rohproteinextrakten, bezogen auf die eingesetzte Proteinmenge konnte allerdings in etwa die sechsfache Aktivität [nMol KIC/ μg Protein] durch Lysozym festgestellt werden.

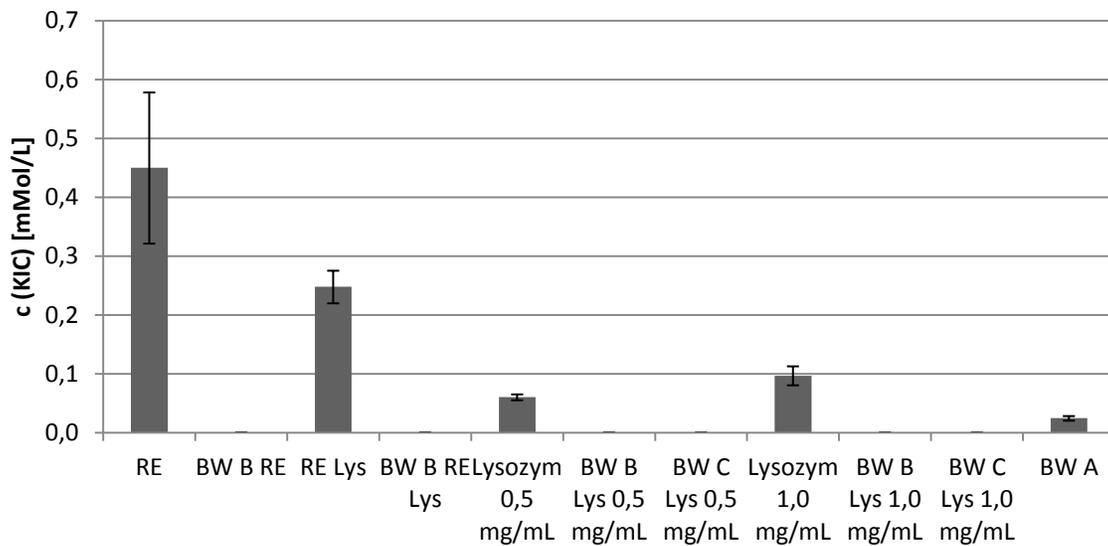


Abbildung 45: Graphische Darstellung der gemessenen Konzentrationen an α -Ketoisocapronsäure (KIC) [mMol/L] durch HPLC-UV zur Bestimmung der Transaminierungsaktivität von Lysozym nach 24 h Inkubation bei 37 °C. RE = Rohproteinextrakt ohne Lysozymbehandlung; RE Lys = Rohproteinextrakt mit Lysozymbehandlung; Lysozym 0,5 und 1,0 mg/mL = Assaypuffer mit Lysozym in den angegebenen Konzentrationen; BW A = Kontrolle ohne Zusatz von Protein; BW B = Kontrolle ohne Zusatz von Substrat; BW C = Kontrolle mit durch Hitze inaktiviertem Lysozym (95 °C, 15 min).

3.2.6 Diskussion

Die aktivitätsgeleitete Aufreinigung eines Enzyms mit Transaminierungsaktivität aus *L. sakei* TMW 1.1322 mittels Ionenaustauschchromatographie und Gelfiltration führte zu einer einzelnen Bande auf der SDS-PAGE mit einem Molekulargewicht von ca. 10 - 12 kDa (3.2.3). Während allen Stufen des Aufreinigungsprozesses konnte in den weiter verwendeten Fraktionen Aktivität gemessen werden. Außerdem wurde durch die aktivitätsgeleitete Aufreinigung Transaminierungsaktivität durch die Hydrolase Lysozym, welche anfangs zur Lysis der *L. sakei*-Zellen zugegeben wurde, festgestellt (3.2.5). Zusätzlich wurde erkannt, dass bei den aktiven Fraktionen der Aufreinigungsschritte NAD koeluierte (3.2.2).

Die Sequenzierung der Bande auf der SDS-PAGE mit einem Molekulargewicht von 10 - 12 kDa ergab mehrere mögliche Enzyme (3.2.4). Als *Top Hit* wurde durch die verwendete Datenbank eine putative Acylphosphatase identifiziert. Anhand der gemessenen Peptidfragmente kamen jedoch auch die folgenden Enzyme und Proteine nach Datenbankabgleich in Frage: 50S ribosomales Protein L33; Thioredoxin;

Phosphotransportprotein HPr; Histon-ähnliches, DNA-bindendes Protein HU und Kälteschock-Protein CspA.

Das 50S ribosomale Protein L33 besitzt ein berechnetes Molekulargewicht von 5,9 kDa und ist somit um etwa die Hälfte leichter als die Proteinbande auf dem Gel. Bei der Sequenzierung der Proteinbande konnten Peptidfragmente mit einer Übereinstimmung von 89,8 % gefunden werden. Unter weiteren ribosomalen Proteinen kam bei der Sequenzierung das 30S ribosomalen Proteine S21 (berechnetes Molekulargewicht: 6,8 kDa) mit einer geringeren Wahrscheinlichkeit in Frage (3.2.4). Dieses wurde durch de Carvalho et al. (2010) in einem anderen Stamm *L. sakei* als Protein mit bakterioziner Wirkung gegen Stämme von *L. monocytogenes* und *E. faecalis* identifiziert (1.5.4). Auch das DNA-bindende HU Protein wurde in der genannten Studie als Bakteriozin erkannt (1.5.7). Es besitzt ein berechnetes Molekulargewicht von 9,5 kDa und wurde mit einer Übereinstimmung von 71,4 % durch Sequenzierung der aufgereinigten Proteinbande identifiziert. Beide Proteine können somit ähnliche Funktionen ausüben und beteiligen sich an DNA-abhängigen Prozessen wie z.B. der DNA-Bindung. Sie nehmen weniger an katalytischen Reaktionen teil (Balandina et al., 2001; Berg et al., 2005; Grove, 2010; Munk, 2008; Wool, 1996). Diese Tatsache und das geringere Molekulargewicht der ribosomalen Proteine im Vergleich zur Proteinbande auf der SDS-PAGE, sowie die geringe Übereinstimmung der Peptidfragmente für das DNA-bindende HU Protein lässt es als unwahrscheinlich erscheinen, dass es sich bei diesen Proteinen um das gesuchte Enzym mit Transaminierungsaktivität handelt.

Sowohl Thioredoxin, als auch das Phosphotransportprotein HPr besitzen berechnete Molekulargewichte im Bereich der sequenzierten Proteinbande (11,4 kDa bzw. 9,2 kDa). Für Thioredoxin wurden bei der Sequenzierung der Proteinbande Peptidfragmente mit einer Übereinstimmung von 82,9 % gefunden, bei dem Phosphotransportprotein HPr lag die Übereinstimmung lediglich bei 38,6 %. Thioredoxin aktiviert viele Biosyntheseenzyme, indem es Disulfidbrücken reduziert, ebenso werden verschiedene Abbauenzyme auf gleiche Weise gehemmt. Außerdem nimmt es an Redoxreaktionen durch die reversible Oxidation seiner Thiolreste im aktiven Zentrum zu einem Disulfid teil und katalysiert Dithiol-Disulfid-Austausch-Reaktionen (Berg et al., 2005; Holmgren, 1985). Es gehört der Enzymklasse der Oxidoreduktasen an (1.5.5). Das Phosphotransportprotein HPr spielt eine wesentliche Rolle bei der Aufnahme von Kohlenhydraten in die Zelle und bei der Regulation des Kohlenhydrathaushaltes (Viana et al., 2000; 1.5.6). Eine Transaminierungsaktivität eines dieser Proteine ist nicht bekannt.

Das Kälteschock-Protein CspA besitzt ein berechnetes Molekulargewicht von 7,2 kDa. Kälteschock-Proteine (CSPs) werden während des Kälteschocks für die Stabilisierung des DNA-Supercoilings und die für die Anpassung der Zelle an die niedrigen Temperaturen benötigte Transkription und Translation verantwortlich gemacht (van de Guchte et al., 2002). Studien weisen darauf hin, dass CSPs nicht nur eine wichtige Rolle bei der Kälteschock Anpassung spielen, sondern auch während des aktiven Wachstums (Graumann et al., 1997). Das CspA Protein wird in *E. coli* nach dem Temperaturabfall 200-fach induziert und ist für die Regulierung anderer Kälteschock-Gene verantwortlich (Jones et al., 1992). Milchsäurebakterien können sich schnell an einen Kälteschock anpassen. Die Identifizierung von mehreren *L. lactis*-CSPs legt nahe, dass sie an einer großen Anzahl von zellulären Prozessen wie dem Aufbau von Chromosomen, Signalübertragungen und Stressadaption beteiligt sein könnten (Champomier-Vergès et al., 2002; van de Guchte et al., 2002; Kim und Dunn, 1997). Kälteschock-Proteine sind somit primär an regulatorischen und weniger an katalytischen Prozessen beteiligt, was eine durch dieses Protein katalysierte Transaminierungsreaktion unwahrscheinlich erscheinen lässt. Zudem ist das Molekulargewicht des Kälteschock-Proteins CspA im Vergleich zur Proteinbande auf der SDS-PAGE um ca. 3 - 5 kDa geringer und die Übereinstimmung der identifizierten Peptidfragmente lag lediglich bei 65,2 %.

Acylphosphatasen katalysieren die Hydrolyse von Acylphosphaten, Verbindungen die eine Carboxyl-Phosphat-Gruppe enthalten und spielt dadurch eine wichtige metabolische und physiologische Rolle (Harary, 1957; Hokin et al., 1967; Ramponi, 1975; 1.5.3). Sie wurde als *Top Hit* durch die nach der Sequenzierung verwendete Datenbank identifiziert, es konnten Peptidfragmente mit einer Übereinstimmung von 69,9 % bei der LC-MS/MS-Analyse gefunden werden. Der durch die Datenbank errechnete *Protein Score*, durch den eine Aussage über die Wahrscheinlichkeit der Identifizierung gemacht wird, lag für dieses Enzym um das ca. 8fache höher als der durchschnittliche *Protein Score* der anderen Proteine. Selbst der *Protein Score* des am zweitwahrscheinlichsten Proteins lag um das 4,5fache niedriger, es handelte sich dabei um das 50S ribosomale Protein L33 (3.2.4). Das bei der Sequenzierung am häufigsten auftretende Peptid hatte die Aminosäuresequenz Val-Gln-Gly-Val-Gly-Phe-Arg, welches die universell konservierte AcP-Signatur Val-Gln-Gly-Val-X-X-Arg darstellt. Der Argininrest am Ende dieser Signatur stellt in Acylphosphatasen die Substratbindungsstelle im aktiven Zentrum dar. Als weitere Bindungsstelle im aktiven Zentrum von Acylphosphatasen wurde im Abstand von 18 Aminosäuren ein Asparaginrest identifiziert (Corazza et al., 2006; Stefani et al., 1997). Auch die durch die Sequenzierung und Datenbankabgleich erhaltene Sequenz der

putativen Acylphosphatase besitzt im Abstand von 18 Aminosäuren zum Arg-19 am Ende der Signatur einen Asparaginrest (Asn-37). Somit ist die Acylphosphataseaktivität des als putativ annotierten Enzyms wahrscheinlich. Eine Transaminierungsaktivität einer Acylphosphatase ist nicht bekannt. In dieser Arbeit konnte jedoch die Transaminierungsaktivität der Hydrolase Lysozym nachgewiesen werden. Auch gelang es Imoto et al. (1987) durch chemische Modifikation unter Einführung von Pyridoxamin durch Lysozym Transaminierungsreaktionen zu katalysieren. Da es sich bei Acylphosphatase auch um eine Hydrolase handelt, wurde diese als die wahrscheinlichste unter den durch die Sequenzierung erhaltenen Proteinen angesehen. Die Tatsache, dass NAD in den aktiven Fraktionen koeluierte konnte nicht mit der Transaminierungsaktivität eines der genannten Enzyme in Verbindung gebracht werden.

Um die enzymatischen Aktivitäten der putativen Acylphosphatase zu überprüfen wurde dieses Protein heterolog exprimiert, aufgereinigt und biochemisch überprüft (2.3.6).

3.3 Klonierung, heterologe Expression und biochemische Überprüfung einer putativen Acylphosphatase aus *Lactobacillus sakei* TMW 1.1322 in *Escherichia coli* TOP10

Durch die aktivitätsgeleitete Aufreinigung eines Enzyms aus *L. sakei* TMW 1.1322 konnte ein Protein identifiziert werden, das für die Transaminierungsaktivität dieses Stammes verantwortlich gemacht wurde (3.2). Die anschließend durchgeführte Sequenzierung ergab die Aminosäuresequenz einer putativen Acylphosphatase (3.2.4), deren Sequenz der genomischen DNA in Abbildung 70 (Anhang) dargestellt ist. Um die Transaminierungsaktivität des aufgereinigten Proteins aus *L. sakei* TMW 1.1322 und die korrekte Sequenzierung der durch SDS-PAGE erhaltenen Proteinbande (3.2.3) zu bestätigen, wurde die Klonierung des Proteins in den Wirt *E. coli* TOP10 durchgeführt (2.3.6). Nach heterologer Expression konnte das Protein affinitätschromatographisch aufgereinigt werden (2.3.6.2). Mit dem annähernd rein vorliegenden Enzym wurde anschließend die Acylphosphataseaktivität und die vermutete Transaminierungsaktivität überprüft.

3.3.1 Klonierung

Mittels zweier Kolonie-PCR-Ansätze wurde die Insertion des putativen Acylphosphatasegens in das pBAD/Myc-His B Plasmid bestätigt (2.3.3.8). Mit dem Primerpaar Acylphosphatase-for/Acylphosphatase-rev wurden PCR-Produkte in der erwarteten Größe von 298 bp erhalten und mit dem Primerpaar pBAD-for/pBAD-rev

Amplifikate mit 524 bp (Abbildung 46). Für jedes Primerpaar wurde die Kolonie-PCR in 8fach-Bestimmung, sowie eine Negativkontrolle für das Primerpaar pBAD-for/pBAD-rev bzw. eine Positiv- und Negativkontrolle für das Primerpaar Acylphosphatase-for/Acylphosphatase-rev durchgeführt.

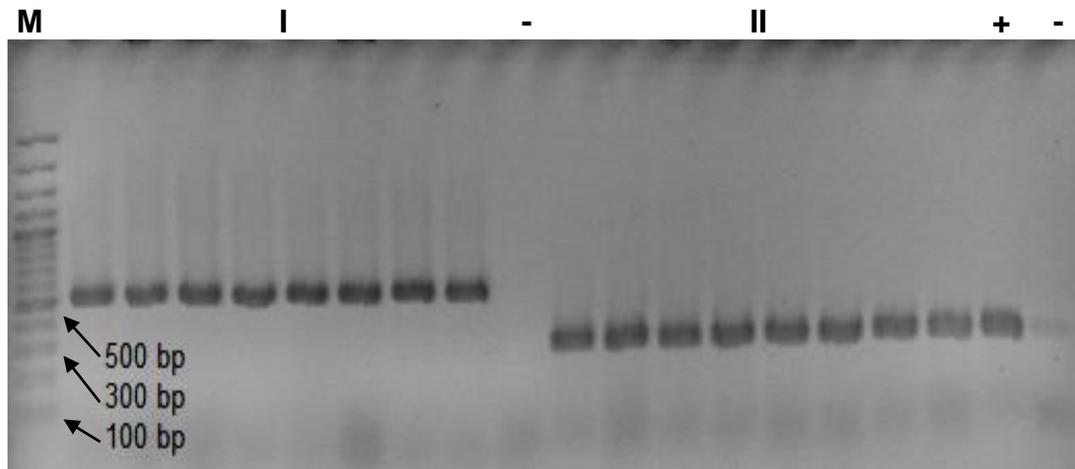


Abbildung 46: Ergebnis der Überprüfung der Kolonie-PCR über ein Agarosegel. Dargestellt sind der DNA-Längenstandard (M), das Ergebnis der Kolonie-PCR mit dem Primer-Paar pBAD (I, 524 bp) und das Ergebnis der Kolonie-PCR mit dem Primer-Paar Acylphosphatase (II, 298 bp), sowie die Positivkontrolle (+) und die Negativkontrollen (-).

Die Sequenzierung des klonierten Acylphosphatasesgens mit pBAD-for (2.3.3.9) ergab eine korrekte Nukleotidsequenz.

3.3.2 Heterologe Expression und Aufreinigung

Zur heterologen Expression der putativen Acylphosphatase wurde der Vektor pBAD/*Myc*-His B verwendet. Dieser Vektor enthält eine für einen His-Tag kodierende Sequenz. Bei der Expression entstand so ein Fusionsprotein aus der ursprünglichen Zielsequenz und dem His-Tag am C-terminalen Ende, wodurch eine Aufreinigung des Enzyms aus dem Rohextrakt mittels Affinitätschromatographie (IMAC) ermöglicht wurde, wobei der His-Tag mit matrixgebundenem Ni^{2+} chelatiert wird. Als Wirt diente der Stamm *E. coli* TOP10. Die Expression wurde bei einer Temperatur von 30 °C und 120 rpm durchgeführt, um durch die verlangsamte Proteinsynthese möglichst große Mengen an nativem funktionstüchtigem Protein zu erhalten. Das Fusionsprotein weist ein Molekulargewicht von 12,74 kDa (inklusive *Myc*- und His-Tag) auf. Die Zellen wurden anschließend durch Behandlung mit einer Ultraschall-Sonotrode aufgeschlossen und affinitätschromatographisch isoliert. Die erhaltene aufgereinigte Proteinfraction wurde für

die Versuche zur Überprüfung der Acylphosphatase- und Transaminierungsaktivität eingesetzt.

Die Größe und Reinheit des Zielproteins nach der heterologen Expression in *E. coli* TOP10 und der Aufreinigung mittels His-Tag-Affinitätschromatographie (2.3.6.2 und 2.3.6.3) wurden durch eine SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Färbung überprüft (2.3.5.6). Die Proben wurden auf ein homogenes Tris-Glycin-Gel (18 % SDS) aufgetragen (Abbildung 47).

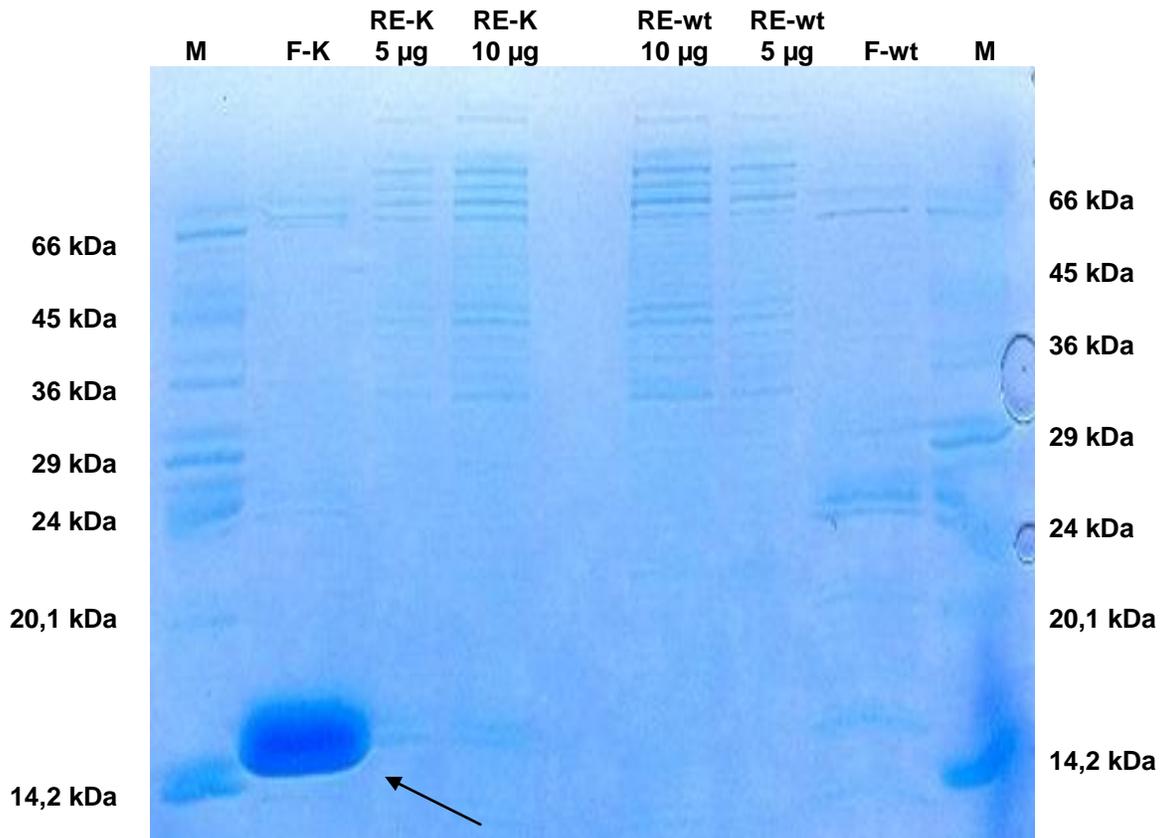


Abbildung 47: SDS-PAGE (homogenes Tris-Glycin-Gel, 18 % SDS) der heterologen Expression einer putativen Acylphosphatase in *E. coli* und anschließenden Aufreinigung mittels His-Tag-Affinitätschromatographie. Dargestellt sind der Protein-Größenstandard (M), die aufgereinigten und konzentrierten Fraktionen aus dem Klon (F-K), der Rohproteinextrakt des Klons (RE-K) in zwei unterschiedlichen Konzentrationen, der Rohproteinextrakt des Wildtyps des Stammes *E. coli* TOP10 (RE-wt) in zwei unterschiedlichen Konzentrationen und die aufgereinigten und konzentrierten Fraktionen des Wildtyps (F-wt).

Das Molekulargewicht der im SDS-PAGE-Gel deutlich zu erkennenden Bande (F-K; Pfeil) stimmt gut mit dem erwarteten Molekulargewicht des rekombinanten Enzyms überein. Die putative Acylphosphatase hat ein berechnetes Molekulargewicht von 9,75 kDa und der

Myc- und *His*-Tag ein berechnetes Molekulargewicht von 2,99 kDa. Zu erwarten war daher eine Bande bei einem Molekulargewicht von 12,74 kDa. Die Bande des rekombinanten Enzyms weist ein geringfügig höheres Molekulargewicht auf. Zeitgleich wurde als Kontrolle der Wildtyp des für die Klonierung als Wirt verwendeten Stammes *E. coli* TOP10 aufgearbeitet. Im SDS-PAGE-Gel war für diese Kontrolle (F-wt) keine stark ausgeprägte Bande auf der Höhe des rekombinanten Proteins zu sehen.

Auch die für die Aufreinigung verwendeten Rohproteinextrakte des Klons und des Wildtyps wurden in je zwei unterschiedlichen Konzentrationen auf die Gele aufgetragen. Auch hier zeigte sich im Rohproteinextrakt des Klons (RE-K) eine deutlich ausgeprägtere Bande auf Höhe des rekombinanten Proteins, als dies im Rohproteinextrakt des Wildtyps (RE-wt) der Fall war (Abbildung 47).

3.3.3 Biochemische Überprüfung

Vor den Untersuchungen zur Transaminierungsaktivität der putativen Acylphosphatase sollte zunächst geklärt werden, ob das rekombinante Enzym in aktiver Form vorlag und dieses die postulierte Acylphosphataseaktivität besitzt. Aus diesem Grund wurde die Hydrolyse von Acetylphosphat durch das Protein in einem Enzymassay wie in 2.3.6.4.1 beschrieben überprüft. Es wurde der enzymatische Abbau des als Substrat zugesetzten Acetylphosphat (4 mM) gemessen. Durchgeführt wurde der Enzymassay mit dem heterolog exprimiert und aufgereinigten Protein, den ebenso konzentrierten Fraktionen des Wildtyps des Stammes *E. coli* TOP10 und den Kontrollen Blindwert A (ohne Zusatz von Protein) und Blindwert B (ohne Zusatz von Substrat). In Abbildung 48 ist das Ergebnis graphisch dargestellt.

Im Ansatz mit dem heterolog exprimiert und aufgereinigten Protein kam es zu einem nahezu vollständigen Abbau des Substrats Acetylphosphat. Es kann also davon ausgegangen werden, dass es sich bei dem isolierten Protein um eine aktive Acylphosphatase handelt. Die konzentrierten Fraktionen des Wildtyps des Stammes *E. coli* TOP10 hingegen führten lediglich zu einem sehr geringfügigen Abbau des Substrates, es konnten 0,7 mMol/L weniger Acetylphosphat gemessen werden als vor der Inkubation. In den Kontrollen ohne Zusatz von Substrat (BW B) waren nach der Fermentation geringe Mengen an Acetylphosphat messbar, in der Kontrolle ohne Zusatz von Proteinlösung kam es zu keinem Abbau von Substrat.

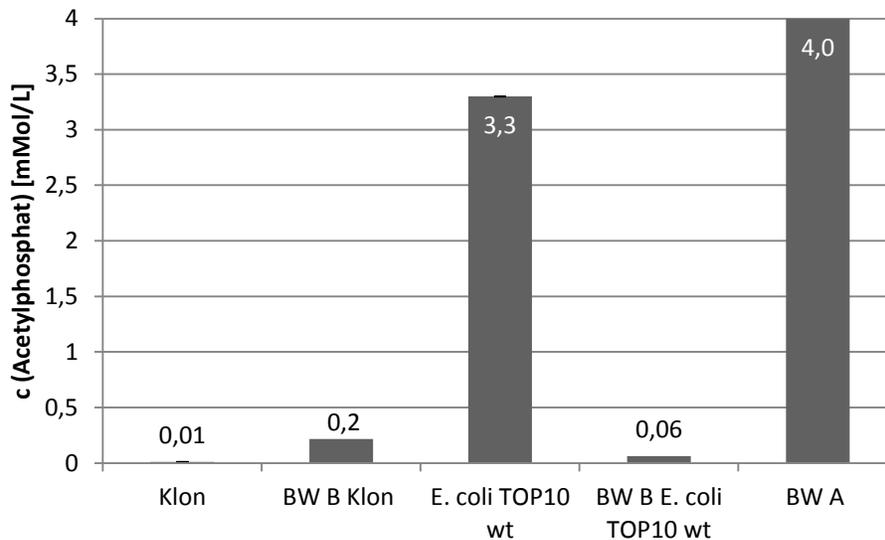


Abbildung 48: Graphische Darstellung der gemessenen Konzentrationen an Acetylphosphat [mMol/L] zur Bestimmung der Acylphosphataseaktivität nach 2 h Inkubation bei RT. Klon = heterolog exprimiertes und aufgereinigtes Protein; E. coli TOP10 wt = ebenso konzentrierte Fraktionen des Wildtyps des Stammes *E. coli* TOP10; BW A = Kontrolle ohne Zusatz von Protein; BW B = Kontrolle ohne Zusatz von Substrat.

Durch einen weiteren Enzymassay wurde getestet, ob die aufgereinigte, klonierte und heterolog exprimierte Acylphosphatase aus *L. sakei* TMW 1.1322 die vermutete Transaminierungsaktivität besitzt (2.3.6.4.2). Es wurde die enzymatisch katalysierte Bildung von α -Ketoisocapronsäure aus der Aminosäure Leucin bzw. von L-Glutaminsäure aus α -Ketoglutarsäure, welche als Cosubstrat für die Transaminierungsreaktion zugesetzt wurde, beobachtet. Durchgeführt wurde der Enzymassay mit dem heterolog exprimiert und aufgereinigten Protein, den ebenso konzentrierten Fraktionen des Wildtyps des Stammes *E. coli* TOP10 und den Kontrollen Blindwert A (ohne Zusatz von Protein) und Blindwert B (ohne Zusatz von Substrat).

Abbildung 49 zeigt das Ergebnis der Bestimmung der Transaminase-Reaktion durch Quantifizierung der KIC-Konzentration mittels HPLC-UV (2.3.2.6). In den Ansätzen mit Zusatz der Acylphosphatase (F-K) konnte nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden die Bildung von α -Ketoisocapronsäure in einer Konzentration von durchschnittlich 0,012 mMol/L durch HPLC-UV gemessen werden. In den Ansätzen mit Zusatz der konzentrierten Fraktionen des Wildtyps des Stammes *E. coli* TOP10 (F-wt) hingegen kam es lediglich zur Bildung von durchschnittlich 0,004 mMol/L KIC. In allen anderen Ansätzen konnte mit dieser Methode keine KIC-Bildung beobachtet werden.

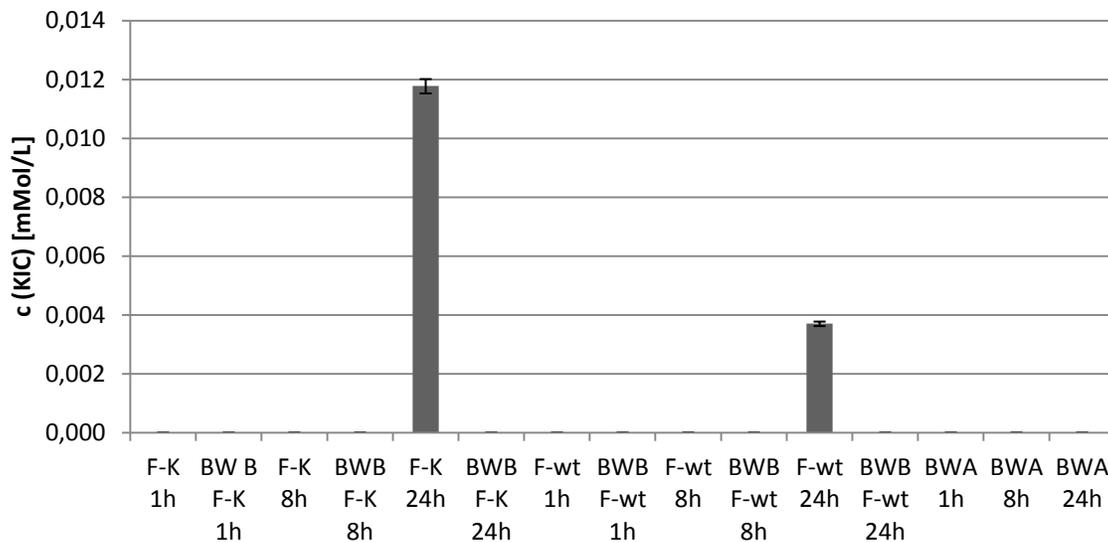


Abbildung 49: Graphische Darstellung der gemessenen Konzentrationen an α -Ketoisocaproinsäure (KIC) [mMol/L] durch HPLC-UV zur Bestimmung der Transaminierungsaktivität nach 1 h, 8 h und 24 h Inkubation bei 37 °C. F-K = Assaypuffer mit heterolog exprimiertem und aufgereinigtem Protein; F-wt = Assaypuffer mit den konzentrierten Fraktionen des Wildtyps des Stammes *E. coli* TOP10; BW A = Kontrolle ohne Zusatz von Protein; BW B = Kontrolle ohne Zusatz von Substrat.

Da die Bestimmung der Konzentration an gebildeter KIC durch LC-UV/ESI-MSⁿ und Integration der Massenspur des m/z 129 [M - H]⁻-Ions deutlich empfindlicher ist, wurden die identischen Proben auch mit dieser Methode auf KIC-Gehalt untersucht (2.3.6.4.2; Abbildung 50). Durch die Bestimmung der KIC-Konzentrationen in den Assaypuffern mittels LC-UV/ESI-MSⁿ konnte das Ergebnis aus der Bestimmung durch HPLC-UV bestätigt werden. Wieder wurde eine durchschnittliche Konzentration an KIC in den Ansätzen mit Zusatz der Acylphosphatase (F-K) nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden von ca. 0,012 mMol/L gemessen. In den Ansätzen mit Zusatz der konzentrierten Fraktionen des Wildtyps des Stammes *E. coli* TOP10 (F-wt) konnten mit dieser Methode durchschnittlich 0,007 mMol/L KIC bestimmt werden. Auch in den anderen Ansätzen konnte durch diese Methode KIC nachgewiesen werden. So waren schon nach einer Stunde Inkubation geringe Mengen vorhanden. Die Konzentration nahm mit der Länge der Inkubation zu. In den Kontrollen BW B der Acylphosphatase (BW B F-K) waren ebenso geringe Mengen KIC detektierbar. In den Kontrollen BW B der konzentrierten Fraktionen des Wildtyps des Stammes *E. coli* TOP10 (BW B F-wt) hingegen nicht. Zu beachten ist ein relativ hoher Gehalt an KIC in den Kontrollen BW A, nach 24 h Inkubationszeit konnten hier 0,003 mMol/L KIC gemessen werden.

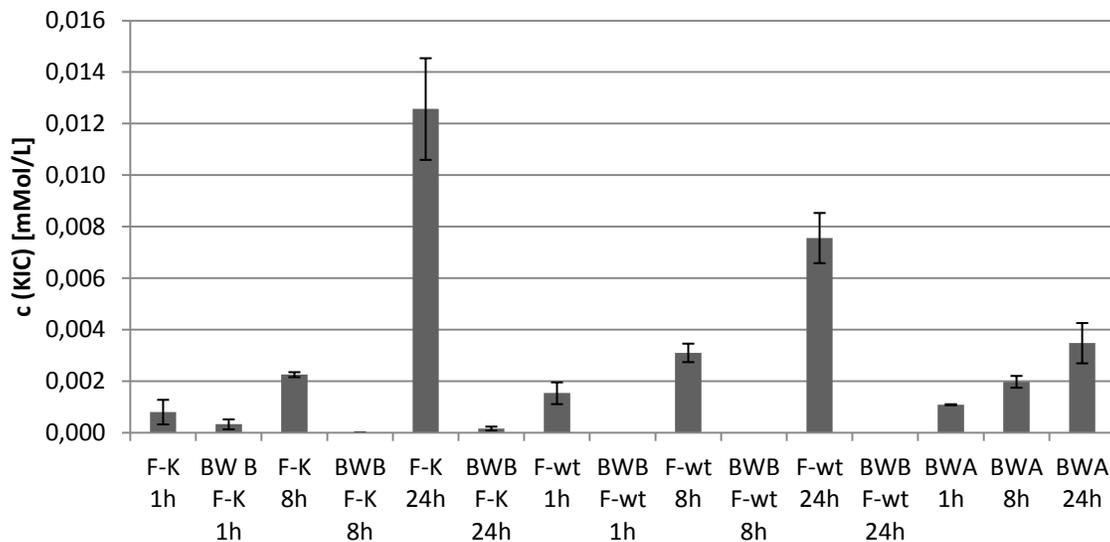


Abbildung 50: Graphische Darstellung der gemessenen Konzentrationen an α -Ketoisocapronsäure (KIC) [mMol/L] durch LC-UV/ESI-MSⁿ zur Bestimmung der Transaminierungsaktivität nach 1 h, 8 h und 24 h Inkubation bei 37 °C. F-K = Assaypuffer mit heterolog exprimiertem und aufgereinigtem Protein; F-wt = Assaypuffer mit den konzentrierten Fraktionen des Wildtyps des Stammes *E. coli* TOP10; BW A = Kontrolle ohne Zusatz von Protein; BW B = Kontrolle ohne Zusatz von Substrat.

Des Weiteren wurde die gebildete Menge an L-Glutaminsäure aus α -Ketoglutarat in den Enzymassays mit heterolog exprimierter Acylphosphatase (F-K) bestimmt (2.3.2.7; Abbildung 51). Auch durch diese Methode konnte indirekt die Bildung von α -Ketoisocapronsäure nachgewiesen werden. In den Ansätzen mit Zusatz der Acylphosphatase (F-K) konnte schon nach einer Stunde Inkubationszeit freie L-Glutaminsäure gemessen werden. Die Konzentration nahm während der 24-stündigen Inkubation bis zu einem Gehalt von 0,036 mMol/L zu. In den Kontrollen BW A ohne Zusatz von Protein konnte lediglich nach 8 Stunden Inkubation eine geringe Menge L-Glutaminsäure nachgewiesen werden. In den Kontrollen BW B ohne Zusatz von Leucin hingegen waren Konzentrationen von 0,011 - 0,014 mMol/L an Glutaminsäure messbar.

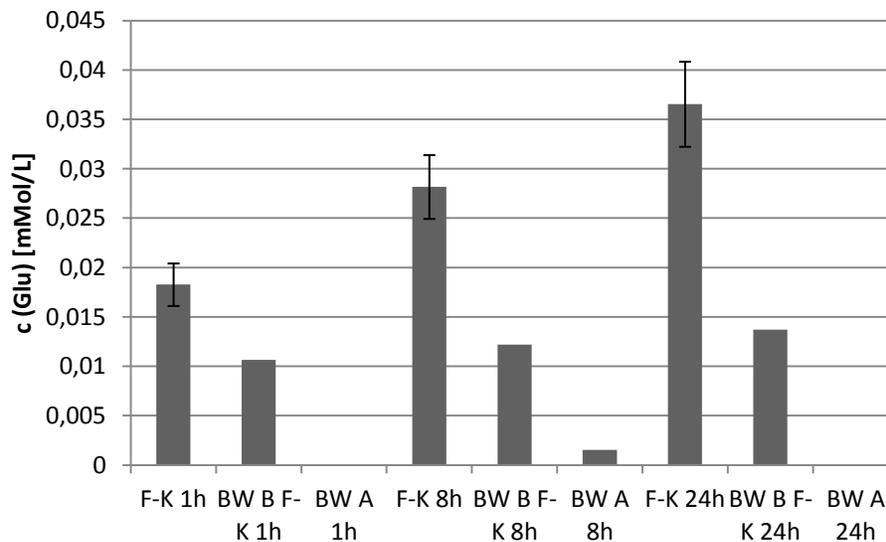


Abbildung 51: Graphische Darstellung der gemessenen Konzentrationen an L-Glutaminsäure (Glu) [mMol/L] mittels Enzymtest zur Bestimmung der Transaminierungsaktivität nach 1 h, 8 h und 24 h Inkubation bei 37 °C. F-K = Assaypuffer mit heterolog exprimiertem und aufgereinigtem Protein; BW A = Kontrolle ohne Zusatz von Protein; BW B = Kontrolle ohne Zusatz von Substrat.

3.3.4 Diskussion

Mittels Kolonie-PCR wurde die Insertion des putativen Acylphosphatasegens in das pBAD/*Myc*-His B Plasmid bestätigt und die Sequenzierung des klonierten Acylphosphatasegens ergab eine korrekte Nukleotidsequenz (3.3.1).

Die heterologe Expression im Wirt *E. coli* TOP10 wurde nach Aufschluss und Aufreinigung mittels His-Tag-Affinitätschromatographie (IMAC) durch SDS-PAGE und Coomassie-Färbung überprüft. Das Molekulargewicht der deutlich zu erkennenden Bande stimmte gut mit dem erwarteten Molekulargewicht des rekombinanten Enzyms überein. Der als Kontrolle verwendete Rohproteinextrakt des Wildtyps des für die Klonierung als Wirt verwendeten Stammes *E. coli* TOP10 zeigte im SDS-PAGE-Gel keine ausgeprägte Bande auf der Höhe des rekombinanten Proteins (3.3.2).

Acylphosphatasen katalysieren die Hydrolyse von Acylphosphaten, Verbindungen die eine Carboxyl-Phosphat-Gruppe enthalten (Harary, 1957; Hokin et al., 1967; Ramponi, 1975). Die biochemische Untersuchung der Acylphosphataseaktivität durch einen Enzymassay zeigte, dass das rekombinante Enzym in aktiver Form vorlag und die postulierte Aktivität besaß (3.3.3). Es kann also davon ausgegangen werden, dass es sich bei dem isolierten und heterolog exprimierten Protein um eine aktive Acylphosphatase handelt.

Um die vermutete Transaminierungsaktivität der Acylphosphatase zu überprüfen, wurde zum einen die im Enzymassay enzymatisch katalysierte Bildung von α -Ketoisocaproinsäure aus der Aminosäure Leucin durch HPLC-UV und LC-UV/ESI-MSⁿ gemessen. Zum anderen wurde die Bildung von L-Glutaminsäure aus α -Ketoglutarinsäure, welche als Cosubstrat für die Transaminierungsreaktion zugesetzt wurde, durch einen Enzymassay analysiert. Mit allen angewandten Methoden konnte die Transaminierungsaktivität, wenn auch in einem sehr geringen Ausmaß, nachgewiesen werden. Eine reine chemische Bildung der KIC konnte durch die verwendeten Blindwerte ausgeschlossen werden (3.3.3). Auch in der in gleicher Weise behandelten Kontrolle, dem Rohproteinextrakt des Wildtyps des für die Klonierung als Wirt verwendeten Stammes *E. coli* TOP10, konnte Transaminierungsaktivität gemessen werden. Diese war jedoch zum einen deutlich geringer. Zum anderen sind die mit der verwendeten Kontrolle erzielten Ergebnisse kritisch zu betrachten. Bei der Affinitätschromatographischen Aufreinigung mit His-Tag versehener Proteine chelatieren die Polyhistidinregionen mit den an der Ni-Sepharose™ High Performance-Matrix gebundenen Ni²⁺-Ionen in der HisTrap Affinitätssäule. Somit kommt es bei einem Mangel an freien Histidin-Resten in der Probe - und somit in der hier verwendeten Kontrolle - zu Verfälschungen, da in der Säule keine Chelatierung der Ni²⁺-Ionen erfolgte. Hierdurch können weitere Proteine und Substanzen eine Bindung mit der Matrix eingehen und anschließend eluieren. Durch Klonierung des verwendeten Vektors in den Wirt, oder besser durch Inaktivierung der klonierten Acylphosphatase durch Mutation, kann dies ausgeschlossen werden.

Zwar besteht immer noch die Möglichkeit die Assaybedingungen zu optimieren und hierdurch eventuell die geringe Transaminierungsaktivität zu erhöhen, es konnte jedoch die durch die Acylphosphatase aus *L. sakei* TWM 1.1322 katalysierte Umwandlung der Aminosäure Leucin in ihre komplementäre α -Ketosäure (α -Ketoisocaproinsäure) eindeutig nachgewiesen werden. Somit wurde ein Enzym identifiziert, das an der Transaminierung von Aminosäuren im Metabolismus von *Lactobacillus sakei* beteiligt sein kann. Nachdem bei der Untersuchung des genetischen Potentials von über 50 Stämmen *L. sakei* in keinem Stamm eine Gensequenz für in Milchsäurebakterien bekannte Transaminasen mit einer Spezifität für verzweigtkettige bzw. aromatische Aminosäuren gefunden werden konnte, ist dies ein wichtiges Ergebnis für das Verständnis der intrazellulären Stoffwechselwege von Aminosäuren in *Lactobacillus sakei*.

Mithilfe des Servers 3D-JIGSAW und dem Programm RasMol (2.2.6) wurde ein dreidimensionales Proteinmodell der identifizierten Acylphosphatase generiert. Hierbei wurde durch den Server die Aminosäuresequenz der Acylphosphatase aus *L. sakei* mit

bekannt, durch Kristallisation und Röntgenstrukturanalyse aufgeklärten Strukturen homologer Proteine verglichen und eine Struktur vorgeschlagen (Bates und Sternberg, 1999; Bates et al. 2001; Contreras-Moreira und Bates, 2002). Das Ergebnis ist in Abbildung 52 dargestellt.

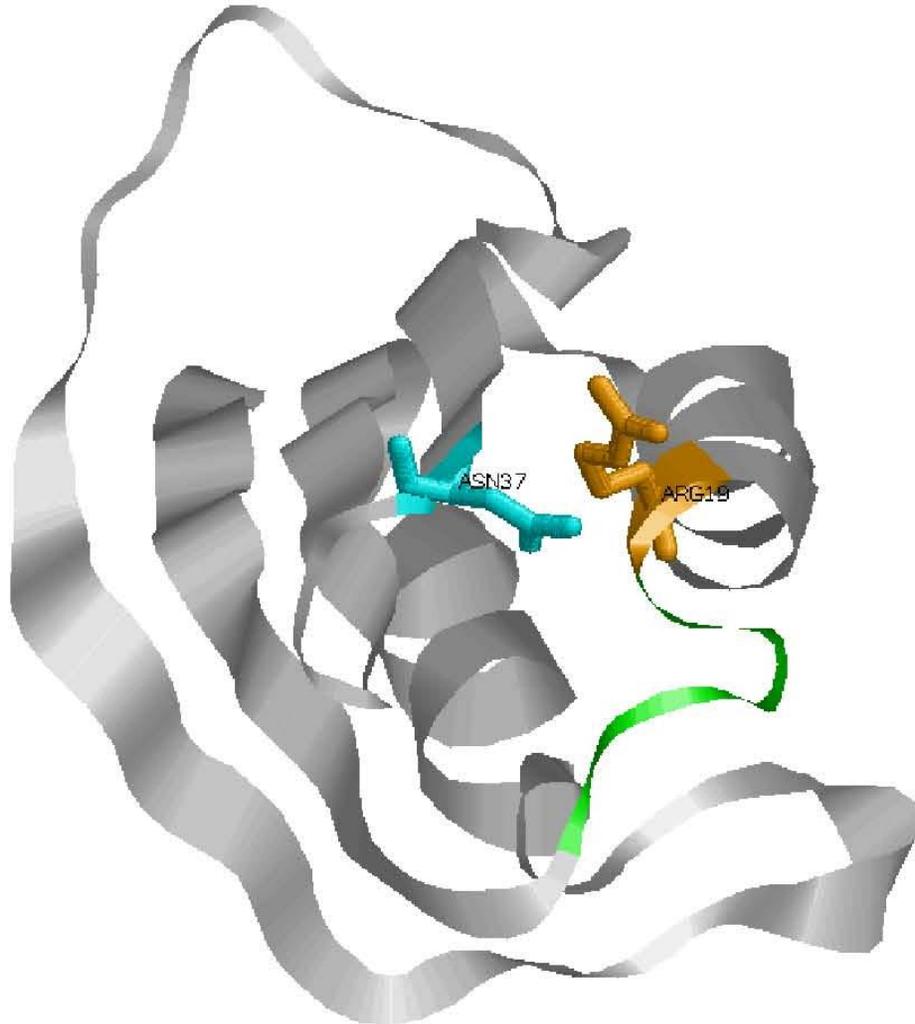


Abbildung 52: Modell der Tertiärstruktur der putativen Acylphosphatase aus *L. sakei* TMW 1.1322. Arg-19 (Orange) und Asn-37 (Cyan) stellen das aktive Zentrum dar. Die durch Corazza et al. (2006) identifizierte universell konservierte Signatur ist grün markiert.

Die durch den Server vorgeschlagene Struktur zeigt ein sehr kompaktes α/β -Protein. Es ist aus einer sechs-strängigen, antiparallel verdrehten β -Faltblattstruktur, welche drei antiparallelen α -Helices zugewandt ist, aufgebaut. Die Konformation gleicht den durch Kristallisation und Röntgenstrukturanalyse aufgeklärten Strukturen der Acylphosphatasen aus Wirbeltieren (Stefani et al., 1997) und *Sulfolobus solfataricus* (Corazza et al., 2006). Die universell konservierte AcP-Signatur definiert auch hier eine Wiegen-artige Struktur in

der Polypeptidkette und die Aminosäurereste im aktiven Zentrum (Arg-19 und Asn-37) zeigen eine einander zugewandte Konformation (Abbildung 52).

Die Transaminierungsaktivität einer Hydrolase ist bisher nicht bekannt. Pyridoxal-5-phosphat (PLP) wirkt in Transaminasen, u.a. durch eine Aldimin-Bindung mit einem Lysyl-Rest verknüpft, als prosthetische Gruppe. Des Weiteren bildet ein Carboxylat-Rest aus Asparaginsäure oder Glutaminsäure eine Wasserstoffbrückenbindung mit dem Pyridinstickstoff in PLP aus, was zur Stabilisierung der positiven Ladung führt. Im ersten Schritt der Katalyse verdrängt die Substrataminosäure den Lysyl-Rest des Enzyms aus der Aldimin-Bindung unter Bildung einer Schiffsbasis (Abbildung 4; 1.5.1). In Lebensmitteln konnten allerdings auch Folgeprodukten der Maillard-Reaktion identifiziert werden, in deren Vorstufen eine Schiffsbasis mit der Guanidinogruppe von Arginin vorhanden war (Belitz et al., 2001; Goldberg und Kirsch, 1996; Hayashi et al., 1998). In der identifizierten Acylphosphatase wäre somit eine Bindung von PLP mit Arg-19 im aktiven Zentrum über eine Aldimin-Bindung möglich und würde die Wirkung des PLP als prosthetische Gruppe und die damit verbundene Transaminierungsaktivität erklären. Es sind jedoch auch weitere Bindungsmöglichkeiten in der Acylphosphatase mit Lysyl- und Arginyl-Resten denkbar. Auch Asparaginsäure und Glutaminsäure sind in der Aminosäuresequenz der Acylphosphatase vorhanden (Asp-8, Asp27, Asp-40, Asp-51, Glu-55, Asp-72, Asp-81). Eine Aufklärung des Reaktionsmechanismus der durch die Acylphosphatase katalysierten Transaminierungsreaktion erfordert den Einsatz strukturaufklärender Methoden wie Röntgenstrukturanalyse oder NMR-Spektroskopie.

4. Literatur

- Albina, J.E., Mastrofrancesco, B., Reichner, J.S.** (1999) Acyl phosphatase activity of NO-inhibited glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH): a potential mechanism for uncoupling glycolysis from ATP generation in NO-producing cells. *The Biochemical Journal*, **341**, 5-9.
- D'Angelis, C.E.M., Polizello, A.C.M., Nonato, M.C., Spadaro, A.C.C., de Martinis, E.C.P.** (2009) Purification, characterization and N-terminal amino acid sequencing of sakacin 1, a bacteriocin produced by *Lactobacillus sakei* 1. *Journal of Food Safety*, **29**, 636-649.
- Ardö, Y.** (2006) Flavour formation by amino acid catabolism. *Biotechnology Advances*, **24**, 238-242.
- Aredes Fernández, P.A., Saguir, F.M., Mance de Nadra, M.C.** (2003) Effect of amino acids and peptides on growth of *Pediococcus pentosaceus* from wine. *Latin American Applied Research*, **33**, 225-229.
- Atilas, M.W., Dudley, E.G., Steele, J.L.** (2000) Gene cloning, sequencing, and inactivation of the branched-chain aminotransferase of *Lactococcus lactis* LM0230. *Applied and Environmental Microbiology*, **66**, 2325-2329.
- Aymerich, T., Martín, B., Garriga, M., Hugas, M.** (2003) Microbial Quality and Direct PCR Identification of Lactic Acid Bacteria and Nonpathogenic Staphylococci from Artisanal Low-Acid Sausages. *Applied and Environmental Microbiology*, **69**, 4583-4594.
- Balandina, A., Clare, L., Hengge-Aronis, R., Rouvière-Yaniv, J.** (2001) The *Escherichia coli* histone-like protein HU regulates *rpoS* translation. *Molecular Microbiology*, **39**, 1069-1079.
- Bates, P.A., Sternberg, M.J.E.** (1999) Model Building by Comparison at CASP3: Using Expert Knowledge and Computer Automation. *Proteins: Structure, Function and Genetics*, **3**, 47-54.
- Bates, P.A., Kelley, L.A., MacCallum, R.M., Sternberg, M.J.E.** (2001) Enhancement of Protein Modelling by Human Intervention in Applying the Automatic Programs 3D-JIGSAW and 3D-PSSM. *Proteins: Structure, Function and Genetics*, **5**, 39-46.
- Beaufils, S., Sauvageot, N., Mazé, A., Laplace, J.-M., Auffray, Y., Deutscher, J., Hartke, A.** (2007) The cold shock response of *Lactobacillus casei*: relation between HPr phosphorylation and resistance to freeze/thaw cycles. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, **13**, 65-75.
- Beck, H.C., Hansen, A.M., Lauritsen, F.R.** (2004) Catabolism of leucine to branched-chain fatty acids in *Staphylococcus xylosus*. *Journal of Applied Microbiology*, **96**, 1185-1193.
- Belitz, H.-D., Grosch, W., Schieberle, P.** (2001) Lehrbuch der Lebensmittelchemie, 5. vollständig überarbeitete Auflage, Berlin, Springer Verlag.

- Berg, J.M., Tymoczko, J.L., Stryer, L.** (2005) Biochemie, 5. Auflage, Heidelberg, Spektrum Akademischer Verlag.
- Blake, C.C.F., Koenig, D.F., Mair, G.A., North, A.C.T., Phillips, D.C., Sarma, V.R.** (1965) Structure of hen egg-white lysozyme: a three-dimensional Fourier synthesis at 2 Å resolution. *Nature*, **206**, 757-761.
- Blum, H., Beier, H., Gross, H.J.** (1987) Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis*, **8**, 93-99.
- Bradford, M.M.** (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, **72**, 248-254.
- Brandsma, J.B., Floris, E., Dijkstra, A.R.D., Rijnen, L., Wouters, J.A., Meijer, W.C.** (2008) Natural diversity of aminotransferases and dehydrogenase activity in a large collection of *Lactococcus lactis* strains. *International Dairy Journal*, **18**, 1103-1108.
- Bruna, J.M., Fernández, M., Ordóñez, J.A., de la Hoz, L.** (2002) Enhancement of the flavour development of dry fermented sausages by using a protease (Pronase E) and a cell-free extract of *Penicillium camemberti*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **82**, 526-533.
- Burns, P., Sánchez, B., Vinderola, G., Ruas-Madiedo, P., Ruiz, L., Margolles, A., Reinheimer, J., de los Reyes-Gavilán, C.G.** (2010) Inside the adaptation process of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* to bile. *International Journal of Food Microbiology*, **142**, 132-141.
- Candogan, K., Wardlaw, F.B., Acton, J.C.** (2009) Effect of starter culture on proteolytic changes during processing of fermented beef sausages. *Food Chemistry*, **116**, 731-737.
- de Carvalho K.G., Bambirra F.H., Kruger M.F., Barbosa M.S., Oliveira J.S., Santos A.M., Nicoli J.R., Bemquerer M.P., de Miranda A., Salvucci E.J., Sesma F.J., Franco B.D.** (2010) Antimicrobial compounds produced by *Lactobacillus sakei* subsp. *sakei* 2a, a bacteriocinogenic strain isolated from a Brazilian meat product. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, **37**, 381-390.
- Chaillou, S., Champomier-Vergès, M.-C., Cornet, M., Crutz-Le Coq, A.-M., Dudez, A.-M., Maritn, V., Beaufils, S., Darbon-Rongère, E., Bossy, R., Loux, V., Zagorec, M.** (2005) The complete genome sequence of the meat-borne lactic acid bacterium *Lactobacillus sakei* 23K. *Nature Biotechnology*, **23**, 1527-1533.
- Chaillou, S., Daty, M., Baraige, F., Dudez, A.-M., Anglade, P., Jones, R., Alpert, C.-A., Champomier-Vergès, M.-C., Zagorec, M.** (2009) Intraspecies Genomic Diversity and Natural Population Structure of the Meat-Borne Lactic Acid Bacterium *Lactobacillus sakei*. *Applied and Environmental Microbiology*, **75**, 970-980.
- Champomier, M.-C., Montel, M.-C., Grimont, F., Grimont, P.A.D.** (1987) Genomic Identification of Meat Lactobacilli as *Lactobacillus sakei*. *Annales de l'Institut Pasteur / Microbiologie*, **138**, 751-758.

- Champomier-Vergès, M.-C., Chailou, S., Cornet, M., Zagorec, M.,** (2001) *Lactobacillus sakei*: recent developments and future prospects. *Research in Microbiology*, **152**, 839-848.
- Champomier-Vergès, M.-C., Maguin, E., Mistou, M.-Y., Anglade, P., Chich, J.-F.** (2002) Lactic acid bacteria and proteomics: current knowledge and perspectives. *Journal of Chromatography B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, **771**, 329-342.
- Christensen, J.E., Dudley, E.G., Pederson, J.A., Steele, J.L.** (1999) Peptidases and amino acid catabolism in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, **76**, 217-246.
- Contreras-Moreira, B., Bates, P.A.** (2002) Domain Fishing: a first step in protein comparative modelling. *Bioinformatics*, **18**, 1141-1142.
- Corazza, A., Rosano, C., Pagano, K., Alverdi, V., Esposito, G., Capanni, C., Bemporad, F., Plakoutsi, G., Stefani, M., Chiti, F., Zuccotti, S., Bolognesi, M., Viglino, P.** (2006) Structure, conformational stability, and enzymatic properties of acylphosphatase from the hyperthermophile *Sulfolobus solfataricus*. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, **62**, 64-79.
- Coretti, K.** (1974) Rohwurst heute: Herstellung und Lagerung, *Fleischwirtschaft*, **2**, 170-178.
- Dainty, R., Blom, H.** (1995) Flavour chemistry of fermented sausages. In G. Campbell-Platt, & P. E. Cook (Eds.), *Fermented Meats* (pp. 176-193). London, Blackie Academic and Professional.
- De Man, J.C., Rogosa, M., Sharpe, M.E.** (1960) A medium for the cultivation of lactobacilli. *The Journal of Applied Bacteriology*, **23**, 130-135.
- Deutscher, J., Saier Jr., M.H.** (1983) ATP-dependent protein kinase-catalyzed phosphorylation of a seryl residue in HPr, a phosphate carrier protein of the phosphotransferase system in *Streptococcus pyogenes*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **80**, 6790-6794.
- Díaz-Muñiz I., Banavara, D.S., Budinich, M.F., Rankin, S.A., Dudley, E.G., Steele, J.L.** (2006) *Lactobacillus casei* metabolic potential to utilize citrate as an energy source in ripening cheese: a bioinformatics approach. *Journal of Applied Microbiology*, **101**, 872-882.
- Doeven, M.K., Kok, J., Poolman, B.** (2005) Specificity and selectivity determinants of peptide transport in *Lactococcus lactis* and other microorganisms. *Molecular Microbiology*, **57**, 640-649.
- Dossonnet, V., Monedero, V., Zagorec, M., Galinier, A., Pérez-Martínez, G., Deutscher, J.** (2000). Phosphorylation of HPr by the bifunctional HPr Kinase/P-Ser-HPr Phosphatase from *Lactobacillus casei* controls catabolite repression and inducer exclusion but not inducer expulsion. *Journal of Bacteriology*, **182**, 2582-2590.
- Fadda, F., Sanz, Y., Vignolo, G., Aristoy, M.-C., Oliver, G., Toldrá, F.** (1999) Hydrolysis of Pork Muscle Sarcoplasmic Proteins by *Lactobacillus curvatus* and *Lactobacillus sakei*. *Applied and Environmental Microbiology*, **65**, 578-584.

- Fleming, A.** (1922) On a Remarkable Bacteriolytic Element Found in Tissues and Secretions. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Containing Papers of a Biological Character*, **93**, 306-317.
- Flores, M., Durá, M.-A., Marco, A., Toldrá, F.** (2004) Effect of *Debaryomyces* spp. on aroma formation and sensory quality of dry-fermented sausages. *Meat Science*, **68**, 439-446.
- Flores, M., Toldrá, F.** (2011) Microbial enzymatic activities for improved fermented meats. *Trends in Food Science & Technology*, **22**, 81-90.
- Foucaud, C., Kunji, E.R.S., Hagting, A., Richard, J., Konings, W.N., Desmazeaud, M., Poolman, B.** (1995) Specificity of Peptide Transport Systems in *Lactococcus lactis*: Evidence for a Third System Which Transports Hydrophobic Di- and Tripeptides. *Journal of Bacteriology*, **177**, 4652-4657.
- Foucaud, C., Hemme, D., Desmazeaud, M.** (2001) Peptide utilization by *Lactococcus lactis* and *Leuconostoc mesenteroides*. *Letters in Applied Microbiology*, **32**, 20-25.
- Freiding, S., Gutsche, K.A., Ehrmann, M.A., Vogel, R.F.** (2011) Genetic screening of *L. sakei* and *L. curvatus* strains for their proteolytic system and amino-acid metabolism and comparison of their volatilomes in a model system. *Systematic and Applied Microbiology*, **34**, 311-320.
- Gandemer, G.** (2002) Lipids in muscles and adipose tissues, changes during processing and sensory properties of meat products. *Meat Science*, **62**, 309-321.
- Gao, S., Mooberry, E.S., Steele, J.L.** (1998) Use of ¹³C Nuclear Magnetic Resonance and Gas Chromatography To Examine Methionine Catabolism by Lactococci. *Applied and Environmental Microbiology*, **64**, 4670-4675.
- Garcia, M.L., Casas, C., Toledo, V.M., Selgas, M.D.** (2001) Effect of selected mould strains on the sensory properties of dry fermented sausages. *European Food Research and Technology*, **212**, 287-291.
- Ghalfi, H., Benkerroum, N., Ongena, M., Bensaid, M., Thonart, P.** (2010) Production of three anti-listerial peptides by *Lactobacillus curvatus* in MRS broth. *Food Research International*, **43**, 33-39.
- Goldberg, J.M., Kirsch, J.F.** (1996) The reaction catalyzed by *Escherichia coli* aspartate aminotransferase has multiple partially rate-determining steps, while that catalyzed by the Y225F mutant is dominated by ketimine hydrolysis. *Biochemistry*, **35**, 5280-5291.
- Graumann, P., Schröder, K., Schmid, R., Marahiel, M.A.** (1996) Cold shock stress-induced proteins in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, **178**, 4611-4619.
- Graumann, P., Wendrich, T.M., Weber, M.H.W., Schröder, K., Marahiel, M.A.** (1997) A family of cold shock proteins in *Bacillus subtilis* is essential for cellular growth and for efficient protein synthesis at optimal and low temperatures. *Molecular Microbiology*, **25**, 741-756.
- Grove, A.** (2010) Functional evolution of bacterial histone-like HU proteins. *Current Issues in Molecular Biology*, **13**, 1-12.

- van de Guchte, M., Serror, P., Chervaux, C., Smokvina, T., Ehrlich, S.D., Maguin, E. (2002) Stress response in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, **82**, 187-216.
- Hagting, A., Kunji, E.R.S., Leenhouts, K.J., Poolman, B., Konings, W.N. (1994) The Di- and Tripeptide Transport Protein of *Lactococcus lactis*: A new type of bacterial peptide transporter. *The Journal of Biological Chemistry*, **269**, 11391-11399.
- Hammes, W.P., Bantleon, A., Min, S. (1990) Lactic acid bacteria in meat fermentation. *FEMS Microbiology Reviews*, **87**, 165-174.
- Hammes, W.P., Hertel, C. (1998) New Developments in Meat Starter Cultures. *Meat Science*, **49**, 125-138.
- Harary, I. (1957) The hydrolysis of 1,3-diphosphoglyceric acid by acyl phosphatase. *Biochimica et Biophysica Acta*, **26**, 434-436.
- Hayashi, H., Mizuguchi, H., Kagamiyama, H. (1998) The imine-pyridine torsion of the pyridoxal 5'-phosphate Schiff base of aspartate aminotransferase lowers its pK_a in the unliganded enzyme and is crucial for the successive increase in the pK_a during catalysis. *Biochemistry*, **37**, 15076-15085.
- Herranz, B., de la Hoz, L., Hierro, E., Fernández, M., Ordóñez, J.A. (2005) Improvement of the sensory properties of dry-fermented sausages by the addition of free amino acids. *Food Chemistry*, **91**, 673-682.
- Hokin, L.E., Sastry, P.S., Galsworthy, P.R., Yoda, A. (1965) Evidence that a phosphorylated intermediate in a brain transport adenosine triphosphatase is an acyl phosphate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **54**, 177-184.
- Homgren, A. (1985) Thioredoxin. *Annual Review of Biochemistry*, **54**, 237-271.
- Hugas, M., Garriga, M., Aymerich, T., Monfort, J.M. (1993) Biochemical characterization of lactobacilli from dry fermented sausages. *International Journal of Food Microbiology*, **18**, 107-113.
- Hugas, M., Monfort, J.M. (1997) Bacterial starter cultures for meat fermentation. *Food Chemistry*, **59**, 547-554.
- Imoto, T., Yamada, H., Okazaki, K., Ueda, T., Kuroki, R., Yasukochi, T. (1987) Modifications of Stability and Function of Lysozyme. *Journal of Protein Chemistry*, **6**, 95-107.
- Jones, B.E., Dossonnet, V., Küster, E., Hillen, W., Deutscher, J., Klevit, R.E. (1997). Binding of the catabolite repressor protein CcpA to its DNA target is regulated by phosphorylation of its corepressor HPr. *The Journal of Biological Chemistry*, **272**, 26530-26535.
- Jones, P.G., van Bogelen, R.A., Neidhardt, F.C. (1987) Induction of proteins in response to low temperatures in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, **169**, 2092-2095.
- Jones, P.G., Cashel, M., Glaser, G., Neidhardt, F.C. (1992) Function of relaxed-like state following temperature downshifts in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, **174**, 3903-3914.

- Kim, W.S., Dunn, N.W.** (1997) Identification of a cold shock gene in lactic acid bacteria and the effect of cold shock on cryotolerance. *Current Microbiology*, **35**, 59-63.
- Kirby, A.J.** (2001) The lysozyme mechanism sorted - after 50 years. *Nature Structural Biology*, **8**, 737-739.
- Klein, G., Dicks, L.M.T., Pack, A., Hack, B., Zimmerman, K., Dellaglio, F., Reuter, G.** (1996) Emended description of *Lactobacillus sake* (Katagiri, Kitathara, and Fukami) and *Lactobacillus curvatus* (Abo-Elnaga and Kandler): Numerical classification revealed by protein fingerprinting and identification based on biochemical patterns and DNA-DNA hybridization. *International Journal of Systematic Bacteriology*, **46**, 367-376.
- Krämer, J.** (2002) Lebensmittel-Mikrobiologie, 4. Auflage, Stuttgart, Verlag Eugen Ulmer.
- van Kranenburg, R., Kleerebezem, M., van Hylckama Vlieg, J., Ursing, B.M., Boekhorst, J., Smit, B.A., Ayad, E.H.E., Smit, G., Siezen, R. J.** (2002) Flavour formation from amino acids by lactic acid bacteria: predictions from genome sequence analysis. *International Dairy Journal*, **12**, 111-121.
- Kravanja, M., Engelmann, R., Dossonnet, V., Blüggel, M., Meyer, H.E., Frank, R., Galinier, A., Deutscher, J., Schnell, N. Hengstenberg, W.** (1999) The *hprK* gene of *Enterococcus faecalis* encodes a novel bifunctional enzyme: the HPr kinase/phosphatase. *Molecular Microbiology*, **31**, 59-66.
- Kunji, E.R.S., Ubbink, T., Martin, A., Poolman, B., Konings, W.N.** (1993) Physiological responses of *Lactococcus lactis* ML3 to alternating conditions of growth and starvation. *Archives of Microbiology*, **159**, 372-379.
- Kunji, E.R.S., Mierau, I., Hagting, A., Poolman, B., Konings, W.N.** (1996) The proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, **70**, 187-221.
- Larrouture, C., Ardaillon, V., Pepin, M., Montel, M.-C.** (2000) Ability of meat starter cultures to catabolize leucine and evaluation of the degradation products by using an HPLC method. *Food Microbiology*, **17**, 563-570.
- Larrouture-Thiveyrat, C., Montel, M.-C.** (2003) Effects of environmental factors on leucine catabolism by *Carnobacterium piscicola*. *International Journal of Food Microbiology*, **81**, 177-184.
- Lee, S.J., Xie, A., Jiang, W., Etchegaray, J.-P., Jones, P.G. Inouye, M.** (1994) Family of the major cold-shock protein, CspA (CS7.4), of *Escherichia coli*, whose members show a high sequence similarity with the eukaryotic Y-box binding proteins. *Molecular Microbiology*, **11**, 833-839.
- Leistner, L.** (1986) Allgemeines über Rohwurst. *Fleischwirtschaft*, **66**, 290-300.
- Leitsätze für Fleisch und Fleischerzeugnisse (LMLFleisch)** (2010)
In: *Lebensmittelrecht Textsammlung*. Meyer, A.H. (Hrg), Verlag C.H. Beck, München.
- Leroy, F., Verluyten, J., De Vuyst, L.** (2006) Functional meat starter cultures for improved sausage fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, **106**, 270-285.
- Lipmann, F., Tuttle, L.C.** (1945) A specific micromethod for the determination of acyl phosphates. *The Journal of Biological Chemistry*. **159**, 21-28.

- Liu, M., Nauta, A., Francke, C., Siezen, R.J.** (2008) Comparative Genomics of Enzymes in Flavor-Forming Pathways from Amino Acids in Lactic Acid Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, **74**, 4590-4600.
- Liu, M., Bayjanov, J.R., Renckens, B., Nauta, A., Siezen, R.J.** (2010) The proteolytic system of lactic acid bacteria revisited: a genomic comparison. *BMC Genomics*, **11**, 1-15.
- Lücke, F.-K.** (1986) Mikrobiologische Vorgänge bei der Herstellung von Rohwurst und Rohschinken. *Fleischwirtschaft*, **66**, 302-309.
- Mandelstam, J.** (1958) Turnover of protein in growing and non-growing populations of *Escherichia coli*. *The Biochemical Journal*, **69**, 110-119.
- Marco, A., Navarro, J.L., Flores, M.** (2008) The sensory quality of dry fermented sausages as affected by fermentation stage and curing agents. *European Food Research and Technology*, **226**, 449-458.
- Masson, F., Hinrichsen, L., Talon, R., Montel, M.-C.** (1999) Factors influencing leucine catabolism by a strain of *Staphylococcus carnosus*. *International Journal of Food Microbiology*, **49**, 173-178.
- Mateo, J., Zumalacárregui, J.M.** (1996) Volatile Compounds in Chorizo and Their Changes During Ripening. *Meat Science*, **44**, 255-273.
- Meynier, A., Novelli, E., Chizzolini, R., Zanardi, E., Gandemer, G.** (1999) Volatile compounds of commercial Milano salami. *Meat Science*, **51**, 175-183.
- Montel, M.-C., Seronie, M.-P., Talon, R., Hébraud, M.** (1995) Purification and Characterization of a Dipeptidase from *Lactobacillus sake*. *Applied and Environmental Microbiology*, **61**, 837-839.
- Montel, M.-C., Reitz, J., Talon, R., Berdagué, J.-L., Rousset-Akrim, S.** (1996) Biochemical activities of Micrococcaceae and their effects on the aromatic profiles and odours of a dry sausage model. *Food Microbiology*, **13**, 489-499.
- Montel, M.-C., Masson, F., Talon, R.** (1998) Bacterial Role in Flavour Development. *Meat Science*, **49**, 111-123.
- Mülhardt, C.** (2006) Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics. Heidelberg, Spektrum Akademischer Verlag GmbH.
- Munk, K.** (2008) Taschenlehrbuch Biologie - Mikrobiologie. Stuttgart, Georg Thieme Verlag.
- Niinivaara, F.P., Pohja, M.S.** (1957) Die in der Rohwurst vorkommenden Bakterien und ihre Bedeutung beim Reifungsprozess. *Die Fleischwirtschaft*, **5**, 264-268.
- Ordóñez, J.A., Hierro, E.M., Bruna, J.M., de la Hoz, L.** (1999) Changes in the Components of Dry-Fermented Sausages during Ripening. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **39**, 329-367.
- Pappin, D.J., Hojrup, P., Bleasby, A.J.** (1993) Rapid identification of proteins by peptide-mass fingerprinting. *Current Biology*, **3**, 327-332.

- Partidário, A. M., Padilha, M., Roseiro, C., Silva, L., Santos, C.** (2006) Volatile compounds produced during ripening of Painho de Portalegre dry fermented sausage. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, **101**, 115-120.
- Pfeil, E., Liepe, H.-U.** (1974) Von großer Bedeutung für die Rohwurstherstellung: pH-Wert, isoelektrischer Punkt und Wasserabgabe. *Fleischwirtschaft*, **2**, 177-178.
- Pyrzcz, J., Pezacki, W.** (1981) Einfluss saurer Gärungsprodukte der Kohlenhydrate auf die sensorische Qualität von Rohwurst. *Fleischwirtschaft*, **61**, 446-454.
- Ramponi, G.** (1975) 1,3-Diphosphoglycerate phosphatase. *Methods in Enzymology*, **42**, 409-426.
- Reizer, J., Hoischen, C., Titgemeyer, F., Rivolta, C., Rabus, R., Stülke, J., Karamata, D., Saier Jr., M.H., Jr. Hillen, W.** (1998). A novel protein kinase that controls carbon catabolite repression in bacteria. *Molecular Microbiology*, **27**, 1157-1169.
- Rijnen, L., Bonneau, S., Yvon, M.** (1999) Genetic characterization of the major lactococcal aromatic aminotransferase and its involvement in conversion of amino acids to aroma compounds. *Applied and Environmental Microbiology*, **65**, 4873-4880.
- Roig-Sagués, A., Eerola, S.** (1997) Biogenic amines in meat inoculated with *Lactobacillus sakei* starter strains and an amine positive lactic acid bacterium. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung A*, **205**, 227-231.
- Rosano, C., Zuccotti, S., Bucciattini, M., Stefani, M., Ramponi, G., Bolognesi, M.** (2002) Crystal structure and anion binding in the prokaryotic hydrogenase maturation factor HypF acylphosphatase-like domain. *Journal of Molecular Biology*, **321**, 785-796.
- Ross, R.P., Morgan, S., Hill, C.** (2002) Preservation and fermentation: past, present and future. *International Journal of Food Microbiology*, **79**, 3-16.
- Rouvière-Yaniv, J., Gros, F.** (1975) Characterization of a novel, low-molecular-weight DNA-binding protein from *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **72**, 3428-3432.
- Rouvière-Yaniv, J., Yaniv, M., Germond, J.E.** (1979) *E. coli* DNA-binding protein HU forms nucleosome-like structure with circular double stranded DNA. *Cell*, **17**, 265-274.
- Russell, R.B., Márquez, J.A., Hengstenberg, W., Scheffzek, K.** (2002) Evolutionary relationship between the bacterial HPr kinase and the ubiquitous PEP-carboxykinase: expanding the P-loop nucleotidyl transferase superfamily. *FEBS Letters*, **517**, 1-6.
- Saguir, F.M., Loto Compos, I.E., Manca de Nadra, M.C.** (2008) Utilization of amino acids and dipeptides by *Lactobacillus plantarum* from orange in nutritionally stressed conditions. *Journal of Applied Microbiology*, **104**, 1597-1604.
- Sanz, Y., Toldrá, F.** (1997) Purification and Characterization of an Aminopeptidase from *Lactobacillus sake*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **45**, 1552-1558.
- Sanz, Y., Mulholland, F., Toldrá, F.** (1998) Purification and Characterization of a Tripeptidase from *Lactobacillus sake*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **46**, 349-353.

- Sanz, Y., Fadda, S., Vignolo, G., Aristoy, M.-C., Oliver, G., Toldrá, F.** (1999) Hydrolysis of muscle myofibrillar proteins by *Lactobacillus curvatus* and *Lactobacillus sakei*. *International Journal of Food Microbiology*, **53**, 115-125.
- Sanz, Y., Toldrá, F.** (2001) Purification and Characterization of an X-Prolyl-Dipeptidyl Peptidase from *Lactobacillus sakei*. *Applied and Environmental Microbiology*, **67**, 1815-1820.
- Sanz, Y., Toldrá, F.** (2002) Purification and Characterization of an Arginine Aminopeptidase from *Lactobacillus sakei*. *Applied and Environmental Microbiology*, **68**, 1980-1987.
- Sanz, Y., Toldrá, F., Renault, P., Poolman, B.** (2003) Specificity of the second binding protein of the peptide ABC-transporter (Dpp) of *Lactococcus lactis* IL1403. *FEMS Microbiology Letters*, **227**, 33-38.
- Savijoki, K., Ingmer, H., Varmanen, P.** (2006) Proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Applied Microbiology And Biotechnology*, **71**, 394-406.
- Schlegel, H.G.** (1992) Allgemeine Mikrobiologie, 7. überarbeitete Auflage, Stuttgart, Georg Thieme Verlag.
- Schönberg, A., Moubacher, R.** (1952) The Strecker Degradation of α -Amino Acids. *Chemical Reviews*, **50**: 261-277.
- Smit, B.A., Engels, W.J.M., Wouters, J.T.M., Smit, G.** (2004) Diversity of L-leucine catabolism in various microorganisms involved in dairy fermentations, and identification of the rate-controlling step in the formation of the potent flavour component 3-methylbutanal. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **64**, 396-402.
- Smit, B.A., Engels, W.J.M., Smit, G.** (2009) Branched chain aldehydes: production and breakdown pathways and relevance for flavour in foods. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **81**, 987-999.
- Smit, E.J., Konings, W.N.** (1990) Relationship between Utilization of Proline and Proline-Containing Peptides and Growth of *Lactococcus lactis*. *Journal of Bacteriology*, **172**, 5286-5292.
- Smit, G., Smit, B.A., Engels, W.J.M.** (2005) Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profiling of cheese products. *FEMS Microbiology Reviews*, **29**, 591-610.
- Söllner, K.** (2007) Charakterisierung entscheidender Aromastoffe in Rohwurst - Untersuchungen zum Einfluss der Rezeptur. Garching, Verlag Deutsche Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie (DFA).
- Söllner, K., Schieberle, P.** (2009) Decoding the Key Aroma Compounds of a Hungarian-Type Salami by Molecular Sensory Science Approaches. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **57**, 4319-4327.
- Sperow, J.W., Butler, L.G.** (1971) Hydrolysis of acyl phosphates by alkaline phosphatases. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **146**, 175-180.

- Stahnke, L.H.** (1999) Volatiles Produced by *Staphylococcus xylosus* and *Staphylococcus carnosus* during Growth in Sausage Minces Part II. The Influence of Growth Parameters. *Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie*, **32**, 365-371.
- Stefani, M., Taddei, N., Ramponi, G.** (1997) Insights into acylphosphatase structure and catalytic mechanism. *CMLS Cellular and Molecular Life Sciences*, **53**, 141-151.
- Stolz, P., Böcker, G., Hammes, W.P., Vogel, R.F.** (1995) Utilization of electron acceptors by lactobacilli isolated from sourdough: I. *Lactobacillus sanfrancisco*. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung*, **201**, 91-96.
- Stuart, M.R., Chou, L.S., Weimer, B.C.** (1999) Influence of carbohydrate starvation and arginine on culturability and amino acid utilization of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *Applied and Environmental Microbiology*, **65**, 665-673.
- Stülke, J., Hillen, W.** (1999) Carbon catabolite repression in bacteria. *Current Opinion in Microbiology*, **2**, 195-201.
- Sunesen, L.O., Stahnke, L.H.** (2003) Mould starter cultures for dry sausages - selection, application and effects. *Meat Science*, **65**, 935-948.
- Talon, R., Walter, D., Montel, M.C.** (2000) Growth and effect of staphylococci and lactic acid bacteria on unsaturated free fatty acids. *Meat Science*, **54**, 41-47.
- Taga, E.M., van Etten, R.L.** (1982) Human Liver Acid Phosphatases: Purification and Properties of a Low-Molecular-Weight Isoenzyme. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **214**, 505-515.
- Thage, B.V., Ratray, F.P., Laustsen, M.W., Ardö, Y., Barkholt, V., Houlberg, U.** (2004) Purification and characterization of a branched-chain amino acid aminotransferase from *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* CHCC 2115. *Journal of Applied Microbiology*, **96**, 593-602.
- Toldrá, F., Rico, E., Flores, J.** (1992) Activities of pork muscle proteases in model cured meat systems. *Biochimie*, **74**, 291-296.
- Tremonte, P., Reale, A., Di Renzo, T., Tipaldi, L., Di Luccia, A., Coppola, R., Sorrentino, E., Succi, M.** (2010) Interactions between *Lactobacillus sakei* and CNC (*Staphylococcus xylosus* and *Kocuria varians*) and their influence on proteolytic activity. *Letters in Applied Microbiology*, **51**, 586-594.
- Trüpler, H.G., De' Clari, L.** (1997) Taxonomic Note: Necessary Correction of Specific Epithets Formed as Substantives (Nouns) "in Apposition". *International Journal of Systematic Bacteriology*, **47**, 908-909.
- Vermeulen, N., Pavlovic, M., Ehrmann, M.A., Gänzle, M.G., Vogel, R.F.** (2005) Functional Characterization of the Proteolytic System of *Lactobacillus sanfranciscensis* DSM 20451^T during Growth in Sourdough. *Applied and Environmental Microbiology*, **71**, 6260-6266.
- Vermeulen, N., Gänzle, M., Vogel, R.F.** (2006) Influence of Peptide Supply and Cosubstrates on Phenylalanine Metabolism of *Lactobacillus sanfranciscensis* DSM20451^T and *Lactobacillus plantarum* TMW1.468. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **54**, 3832-3839.

- Viana, R., Monedero, V., Dossonnet, V., Vadeboncoeur, C., Pérez-Martínez, G., Deutscher, J. (2000) Enzyme I and HPr from *Lactobacillus casei*: their role in sugar transport, carbon catabolite repression and inducer exclusion. *Molecular Microbiology*, **36**, 570-584.
- Vaughan, A., Eijsink, V.G.H., van Sinderen, D. (2003) Functional characterization of a composite bacteriocin locus from malt isolate *Lactobacillus sakei* 5. *Applied and Environmental Microbiology*, **69**, 7194-7203.
- Vocadlo, D.J., Davies, G.J., Laine, R., Withers, S.G. (2001) Catalysis by hen egg-white lysozyme proceeds via a covalent intermediate. *Nature*, **412**, 835-838.
- Wang, N., Yamanaka, K., Inouye, M. (1999) CspI, the ninth member of the CspA family of *Escherichia coli*, is induced upon cold shock. *Journal of Bacteriology*, **181**, 1603-1609.
- Wool, I. (1996) Extraribosomal functions of ribosomal proteins. *Trends in Biochemical Sciences*, **21**, 164-165.
- Weber, H. (2003) Mikrobiologie der Lebensmittel Fleisch-Fisch-Feinkost, Hamburg, Behr Verlag.
- Wouters, J.A., Frenkiel, H., de Vos, W.M., Kuipers, O.P., Abee, T. (2001) Cold shock proteins of *Lactococcus lactis* MG1363 are involved in cryoprotection and in the production of coldinduced proteins. *Applied and Environmental Microbiology*, **67**, 5171-5178.
- Yamanaka, K., Fang, L., Inouye, M. (1998) The CspA family in *Escherichia coli*: multiple gene duplication for stress adaptation. *Molecular Microbiology*, **27**, 247-255.
- Yvon, M., Thirouin, S., Rijnen, L., Fromentier, D., Gripon, J.C. (1997) An aminotransferase from *Lactococcus lactis* initiates conversion of amino acids to cheese flavor compounds. *Applied and Environmental Microbiology*, **63**, 414-419.
- Yvon, M., Chambellon, E., Bolotin, A., Roudot-Algaron, F. (2000) Characterization and role of the branched-chain aminotransferase (BcaT) isolated from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* NCDO 763. *Applied and Environmental Microbiology*, **66**, 571-577.
- Yvon, M., Rijnen, L. (2001) Cheese flavour formation by amino acid catabolism. *International Dairy Journal*, **11**, 185-201.
- Zúñiga, M., Champomier-Vergès, M.-C., Zagorec, M., Pérez-Martínez, G. (1998) Structural and functional analysis of the gene cluster encoding the enzymes of the arginine deiminase pathway of *Lactobacillus sakei*. *Journal of Bacteriology*, **180**, 4154-4159.

5. Anhang

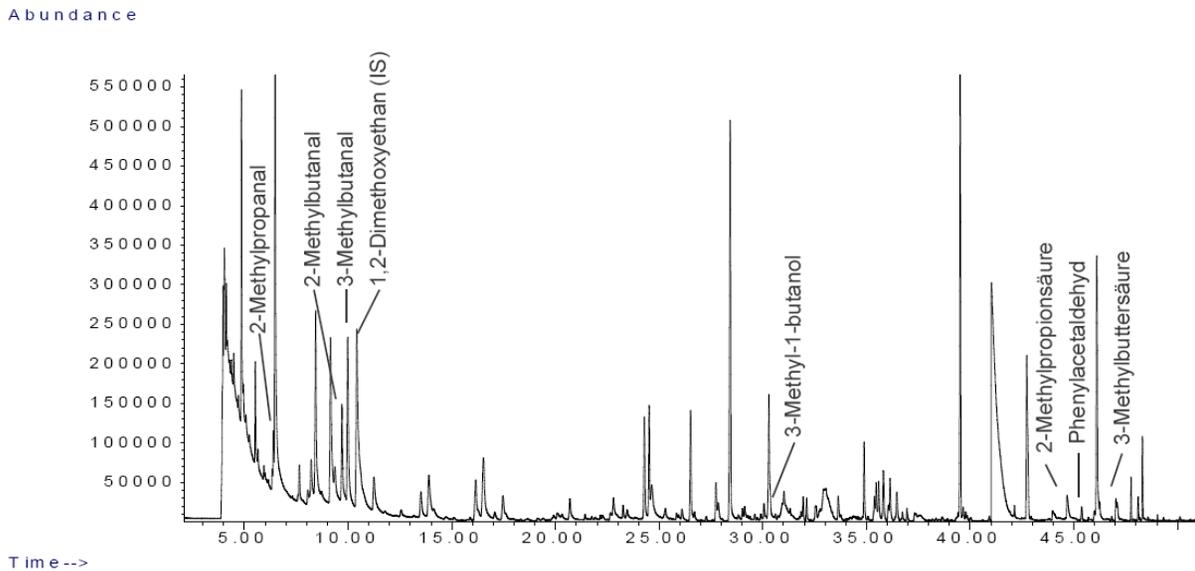


Abbildung 53: SPME-GC/MS Analyse der durch *L. sakei* TMW 1.1322 in mMRS-Medium gebildeten flüchtigen Substanzen. Markiert sind einige Metabolite der Aminosäuren Valin, Leucin, Isoleucin und Phenylalanin (Tabelle 5; 2.3.2.1), sowie der interne Standard 1,2-Dimethoxyethan.

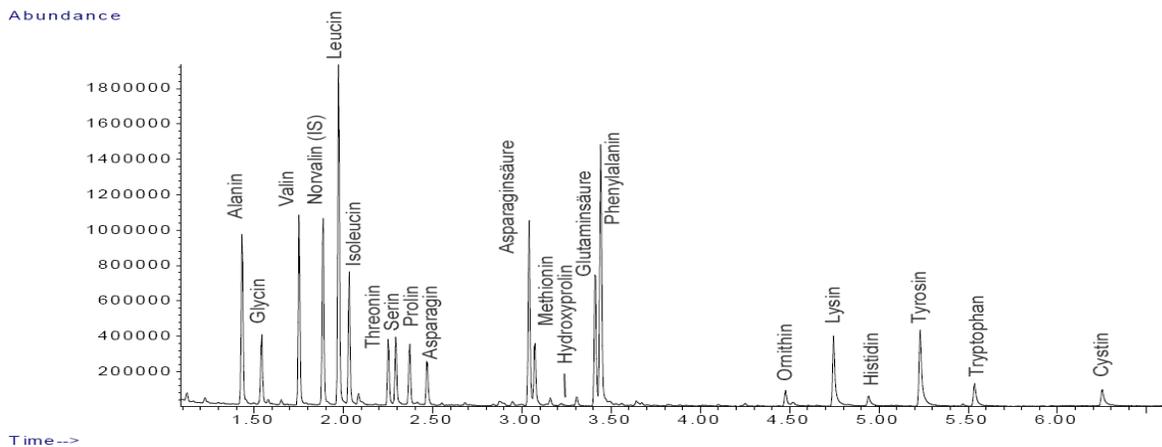


Abbildung 54: GC/MS Analyse der freien Aminosäuren in mMRS-Medium (2.3.2.3).

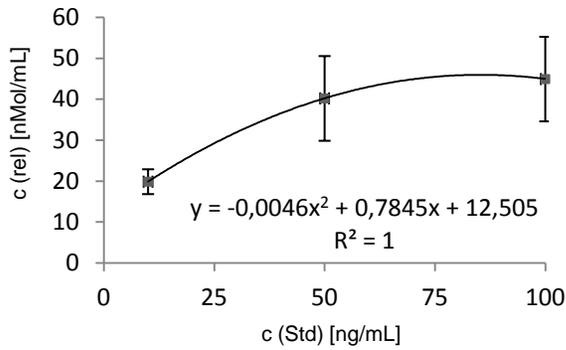


Abbildung 55: Kalibriergerade für die Quantifizierung von 2-Methylpropanal.

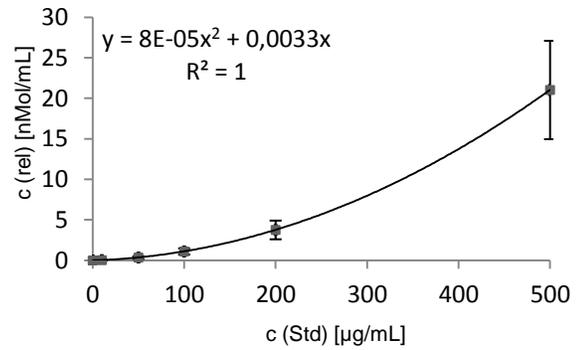


Abbildung 56: Kalibriergerade für die Quantifizierung von 2-Methylpropansäure.

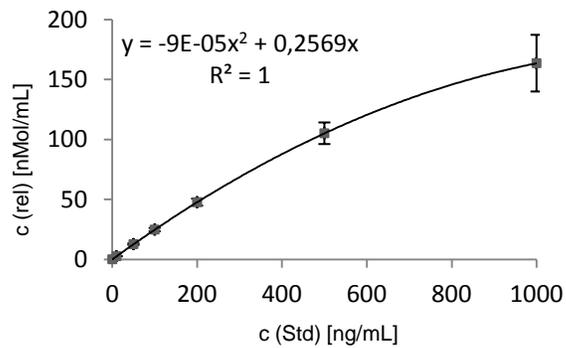


Abbildung 57: Kalibriergerade für die Quantifizierung von 3-Methylbutanal.

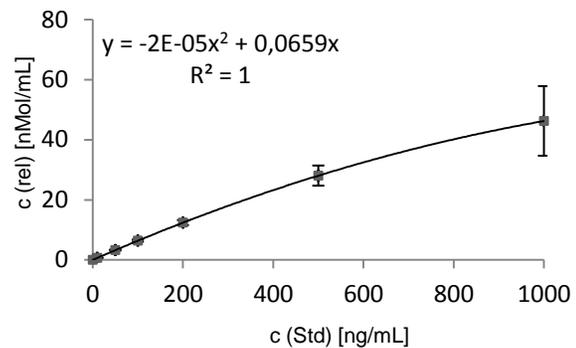


Abbildung 58: Kalibriergerade für die Quantifizierung von 3-Methyl-1-butanol.

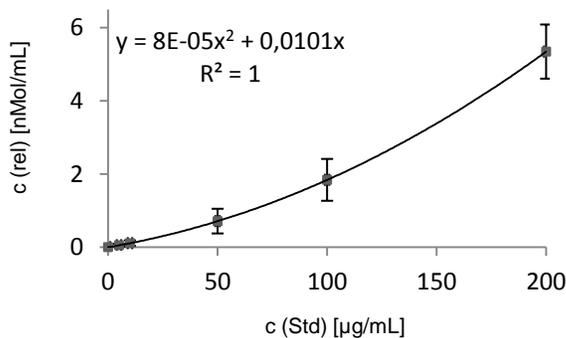


Abbildung 59: Kalibriergerade für die Quantifizierung von 3-Methylbuttersäure.

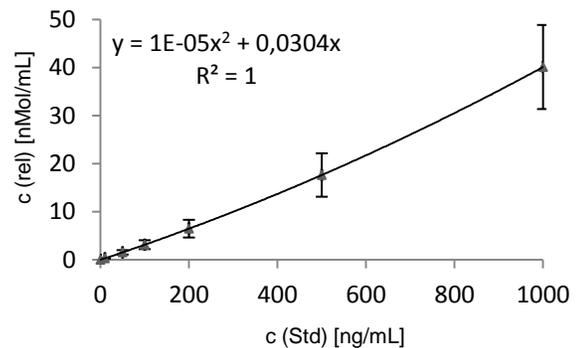


Abbildung 60: Kalibriergerade für die Quantifizierung von Phenylacetaldehyd.

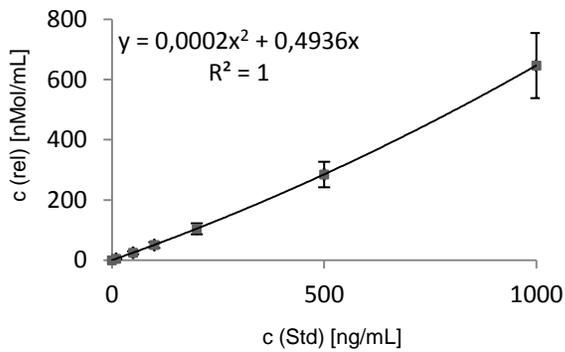


Abbildung 61: Kalibriergerade für die Quantifizierung von Benzaldehyd.

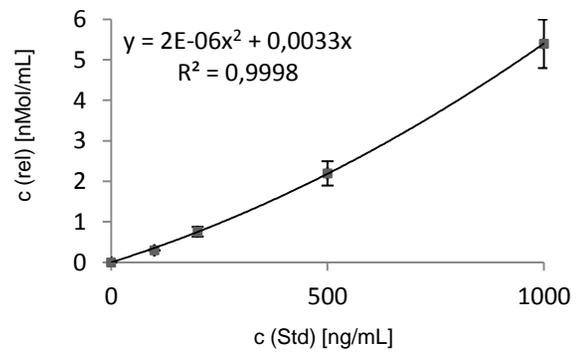


Abbildung 62: Kalibriergerade für die Quantifizierung von Methional.

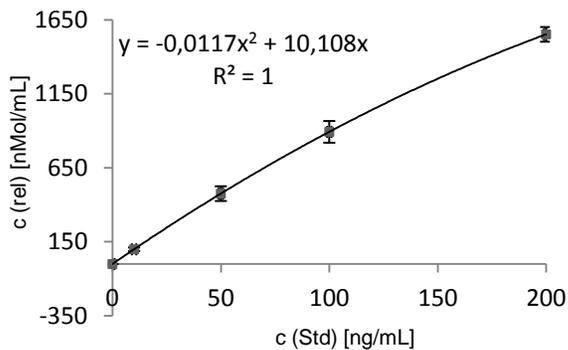


Abbildung 63: Kalibriergerade für die Quantifizierung von Dimethyldisulfid.

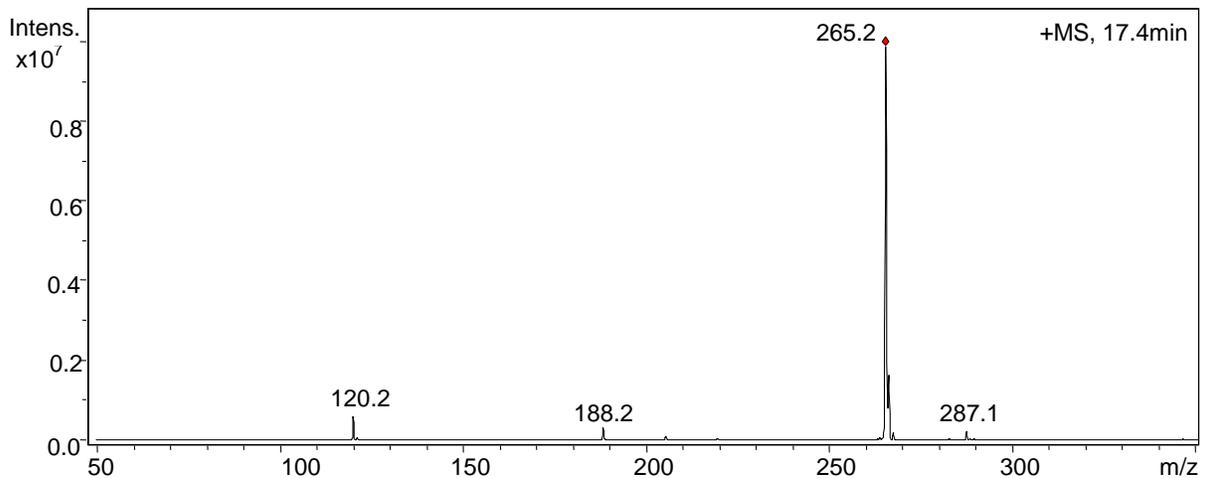


Abbildung 64: LC-UV/ESI-MSⁿ Analyse des Dipeptides Phe-Val. Massenspektrum (positiver Modus) des Signals mit der Retentionszeit 17,4 min. Das Pseudomolekülion $[M + H]^+$ mit m/z 265 entspricht dem Dipeptid Phe-Val ($M = 264,33$ g/mol).

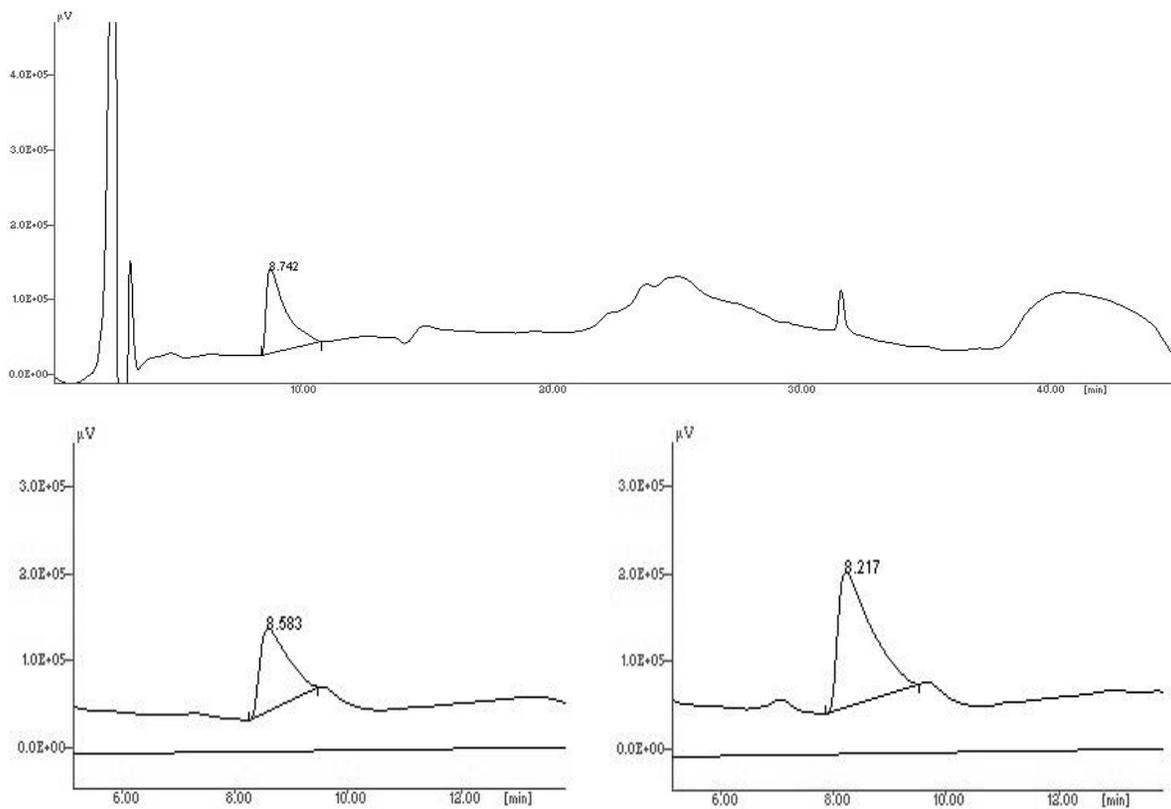


Abbildung 65: HPLC-UV Analyse der α -Ketoisocapronsäure (KIC) in Enzymassays. Peak des Kalibrierstandards (0,5 mg/mL; oben), gebildete Menge KIC durch *L. sakei* TMW 1.1322 nach 20 h (unten links) und 24 h (unten rechts).

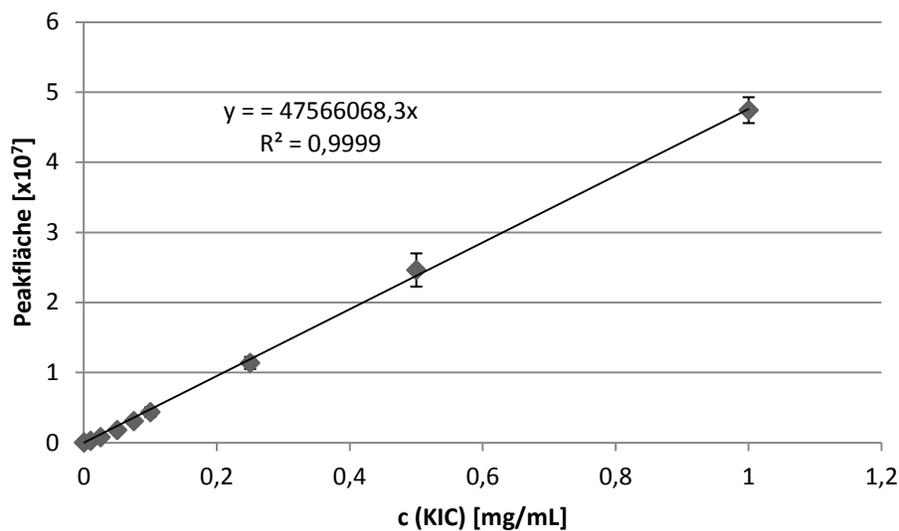


Abbildung 66: Kalibriergerade für die Quantifizierung von α -Ketoisocapronsäure (KIC) durch HPLC-UV.

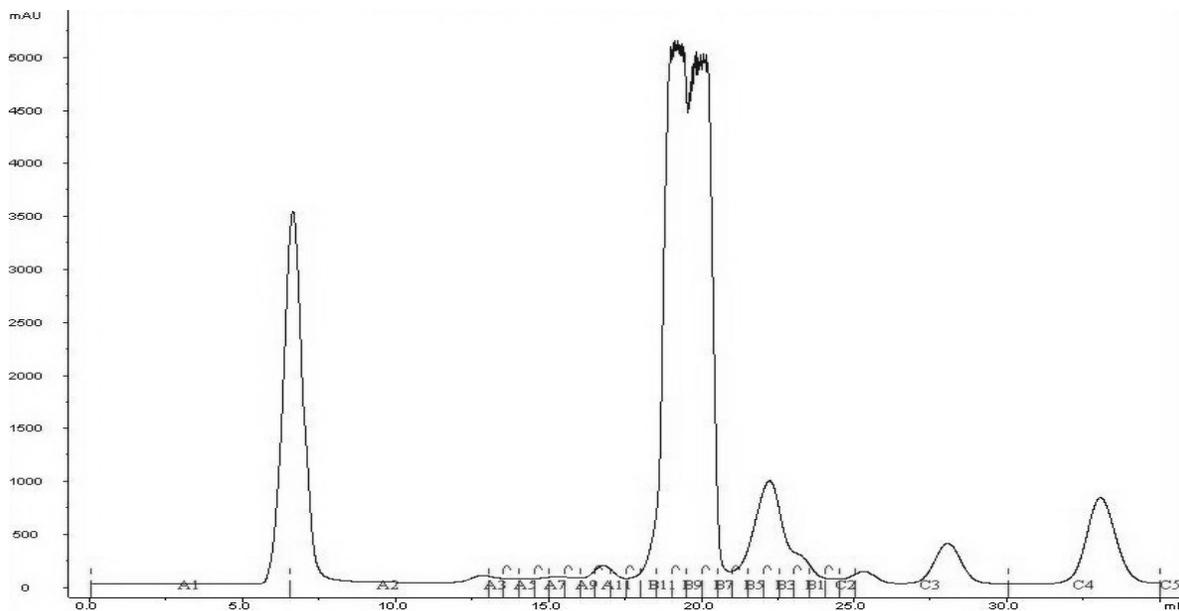


Abbildung 69: UV-Chromatogramm der Fraktionierung durch Gelfiltration der aktiven Fraktionen an einer Sephadex™-Matrix. Dargestellt sind der Verlauf der UV-Absorption bei 280 nm (schwarz) und die Fraktionierung (X-Achse).

ATGCAAAAAGCAGTCCAATTAGATGTATTTGGCCGAGTTCAAGGTGTCGGCTTCCGCT
 GGACAATAAGCTGGTGGCCGATCGATTAGGGATTACTGGCACCGTCTCTAACCAAC
 CCGATGGTTCTGTCAAATTATCGCAATGGGCCCGATGCCATTTTGAACAGTTCAT
 TGGCGCCGTTAAAGCGTCTCCGACCCCTAGTGGGCGCGTTGATCGTGTTGTTCAAAC
 ACCCTTGCAAGATGTGTCAGCGTGTCATAAATTTTCAGTTGTCGGTTGA

MQKAVQLDVFGRVQGVGFRWTTKLVADRLGITGTVSNQPDGSVKIIAMGPDAILEQFIGA
 VKASPTPSGRVDRVVQTPLQDVSACHKFSVVG

Abbildung 70: Sequenz der genomischen DNA der putativen Acylphosphatase aus *Lactobacillus sakei* subsp. *sakei* 23K sowie deren korrespondierende Aminosäuresequenz.

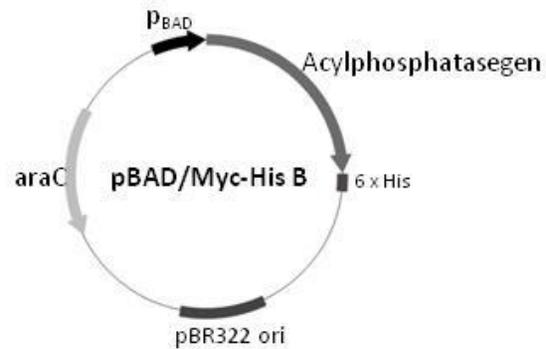


Abbildung 71: pBAD/Myc-His B Vektor mit Acylphosphatasegen.

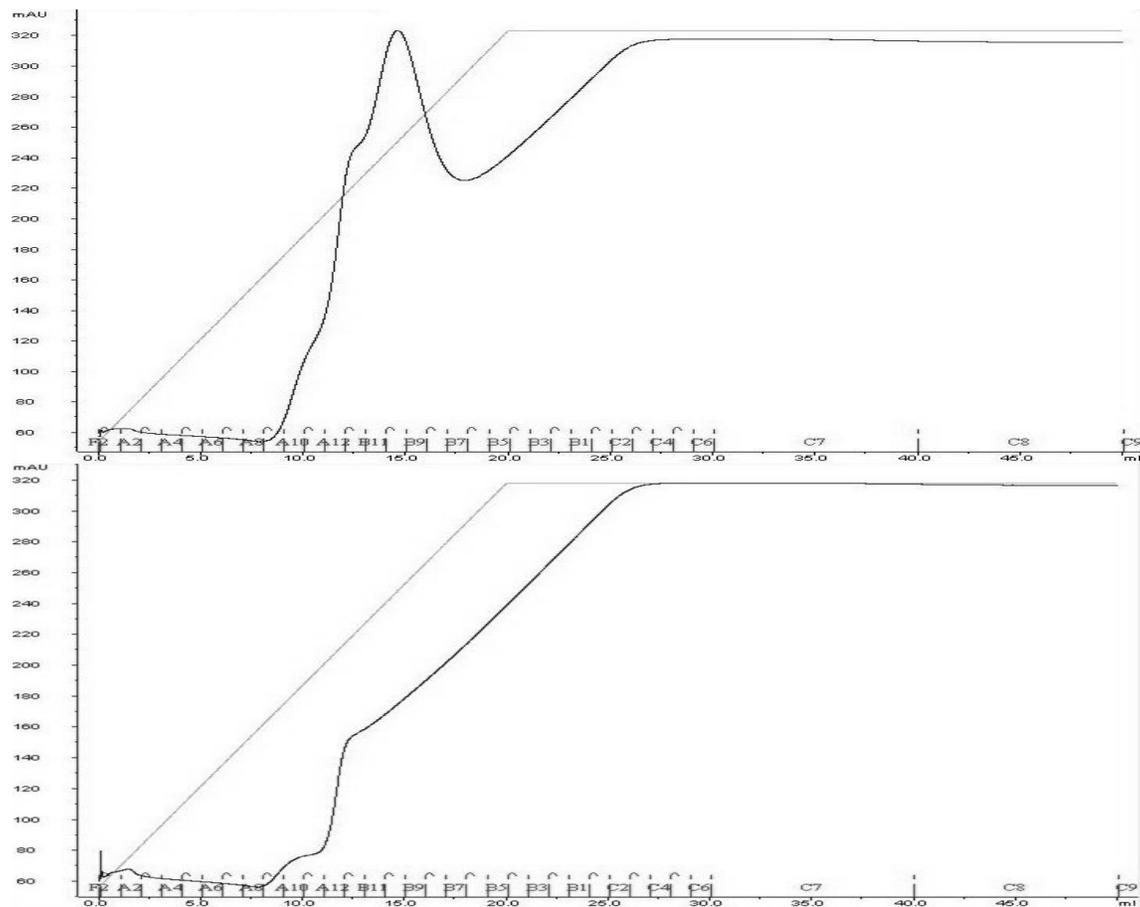


Abbildung 72: UV-Chromatogramme der affinitätschromatographischen Aufreinigung der heterolog exprimierten Acylphosphatase in einem *E. coli*-Klon (oben) und eines in gleicher Weise hergestellten Rohproteinextraktes des Wildtyps *E. coli* TOP10 (unten). Dargestellt sind der Verlauf der UV-Absorption bei 280 nm (schwarz), die Konzentration an Elutionspuffer (grau) und die Fraktionierung (X-Achse).

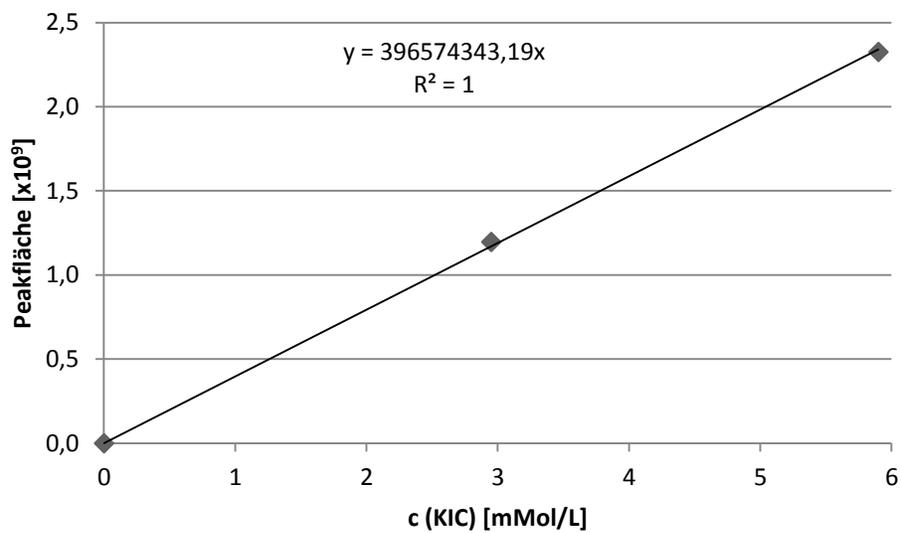


Abbildung 73: Kalibriergerade für die Quantifizierung von α -Ketoisocaprinsäure (KIC) durch LC-UV/ESI-MSⁿ.

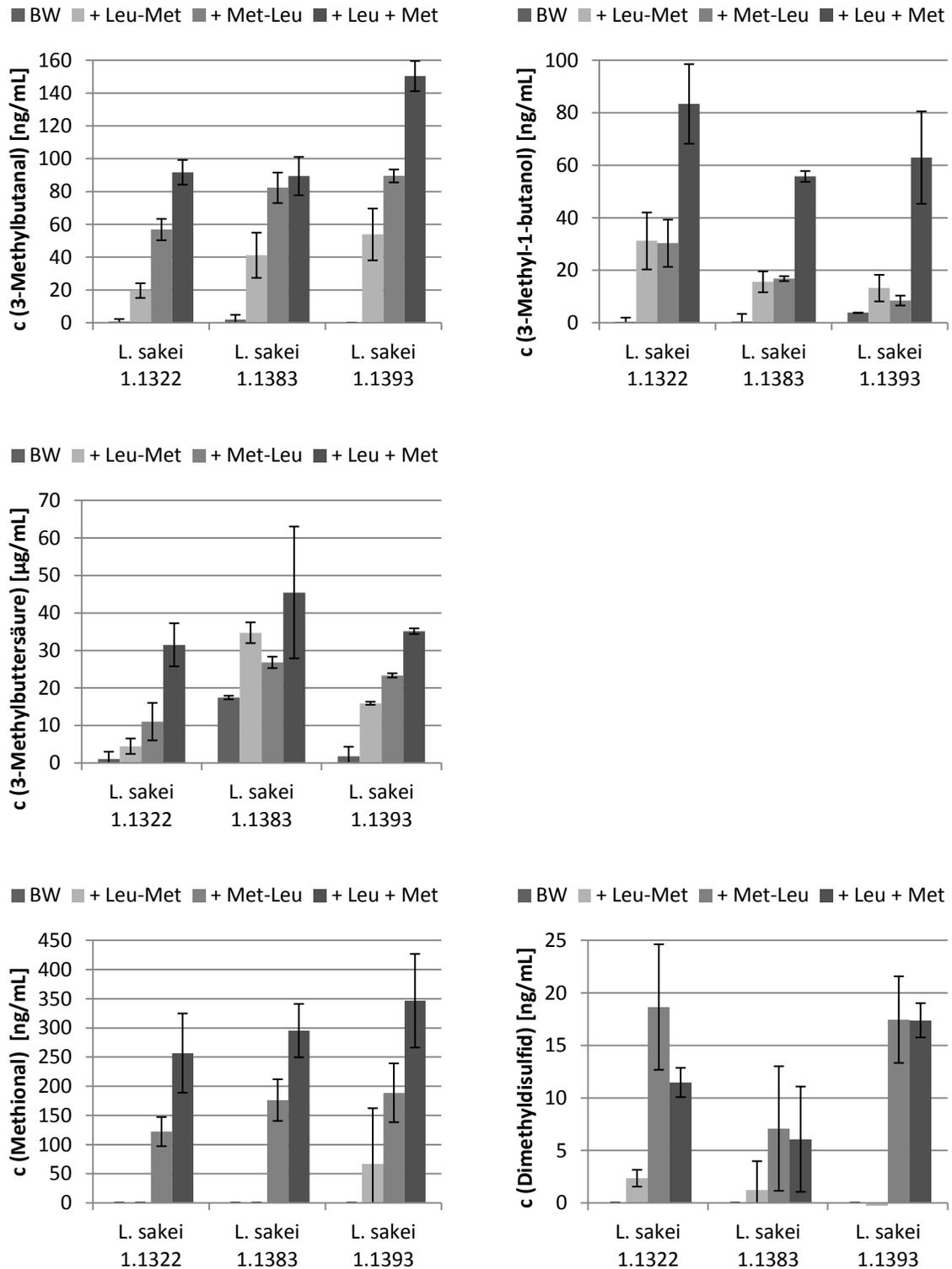


Abbildung 74: Vergleichende graphische Darstellung der gemessenen Konzentrationen der flüchtigen Metabolite aus Leucin (oben und Mitte) und Methionin (unten) im Versuch LEU_MET durch *L. sakei* TMW 1.1322, *L. sakei* TMW 1.1383 und *L. sakei* TMW 1.1393. Jeder Balken steht für einen Ansatz (Legende), die Blindwerte der Substrate in Natrium-Phosphat-Puffer (50 mM; pH 6,5) wurden subtrahiert (3.1.3.3.3).

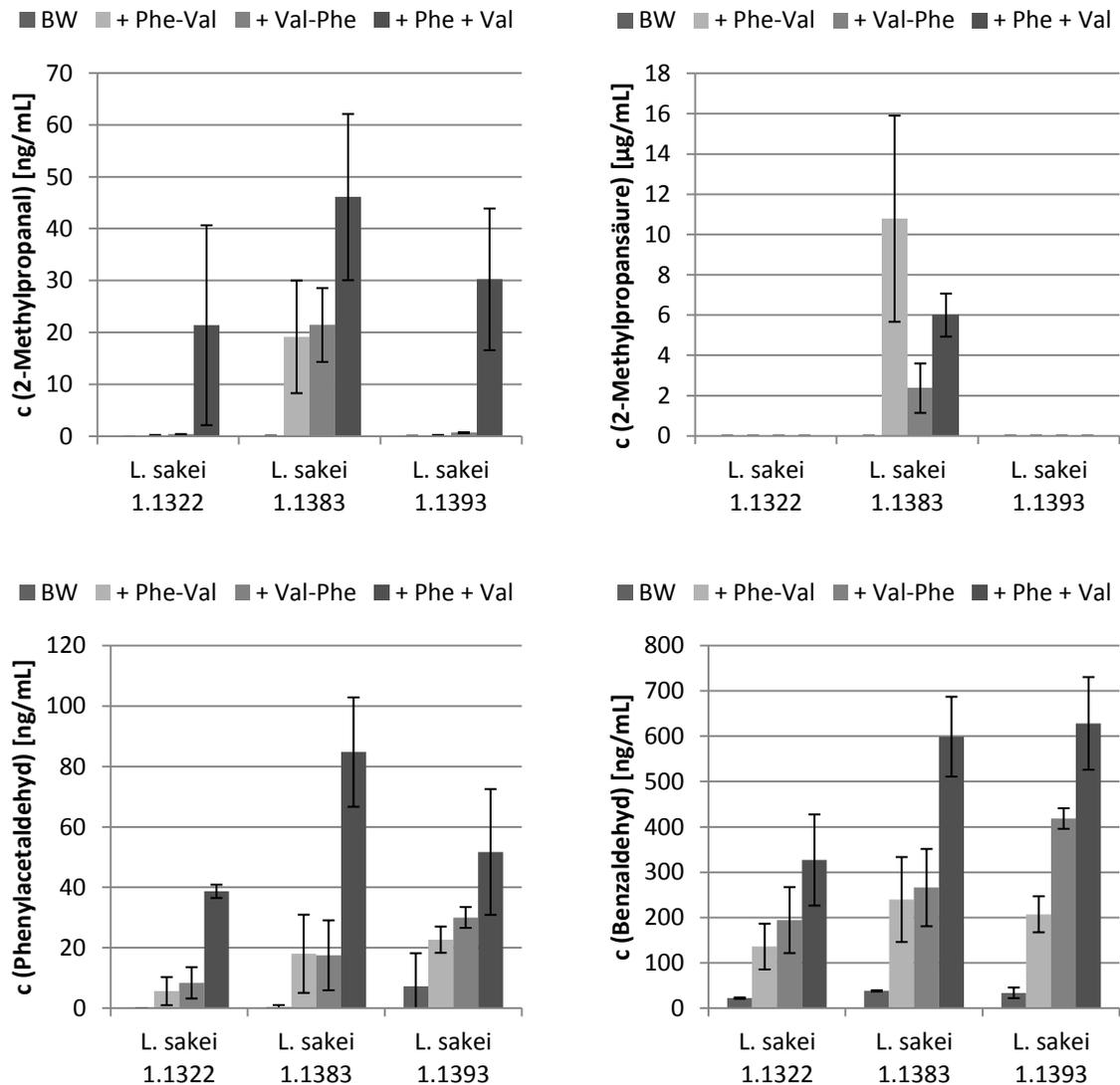


Abbildung 75: Vergleichende graphische Darstellung der gemessenen Konzentrationen der flüchtigen Metabolite aus Valin (oben) und Phenylalanin (unten) im Versuch PHE_VAL durch *L. sakei* TMW 1.1322, *L. sakei* TMW 1.1383 und *L. sakei* TMW 1.1393. Jeder Balken steht für einen Ansatz (Legende), die Blindwerte der Substrate in Natrium-Phosphat-Puffer (50 mM; pH 6,5) wurden subtrahiert (3.1.3.3.3).

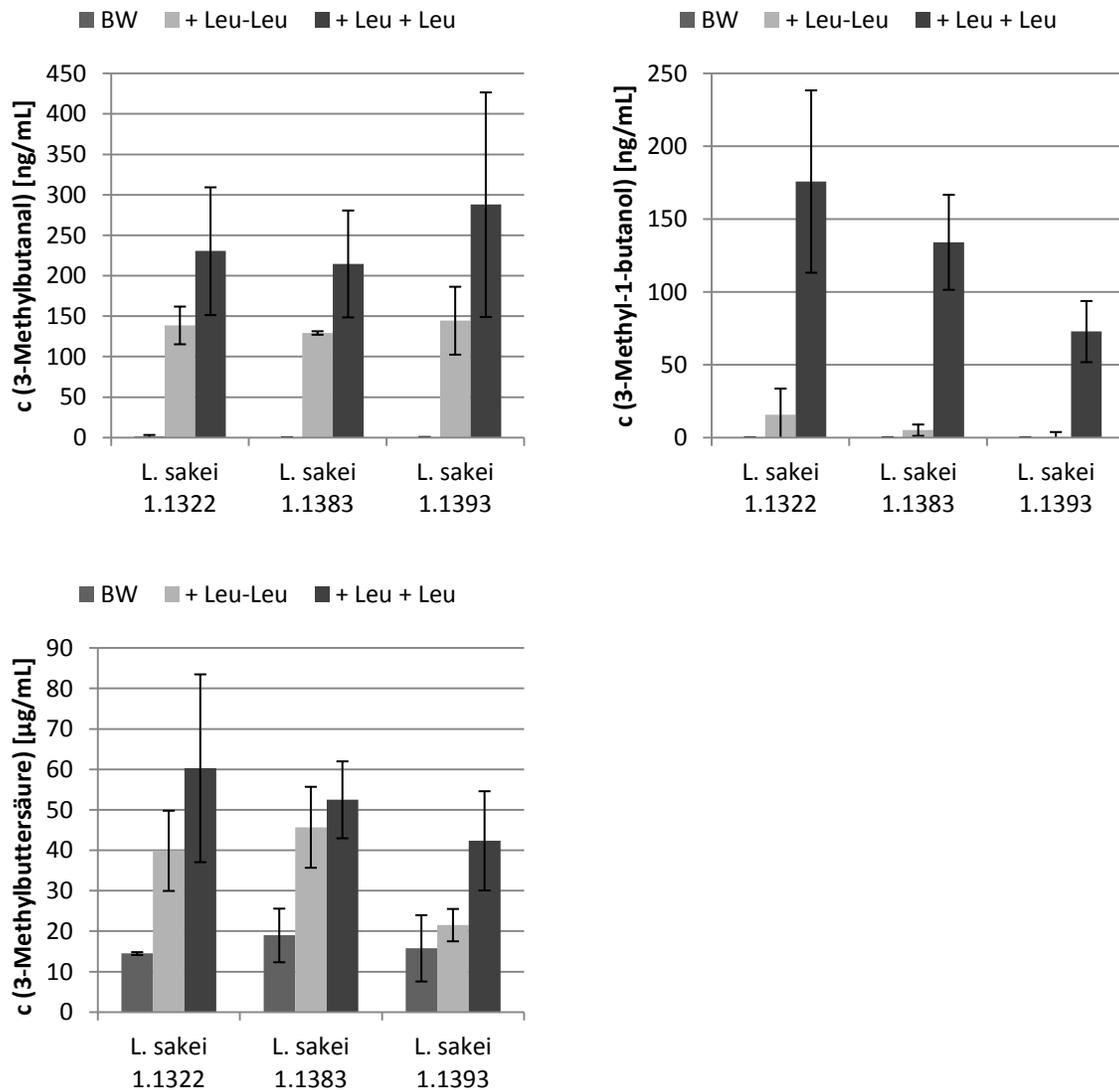


Abbildung 76: Vergleichende graphische Darstellung der gemessenen Konzentrationen der flüchtigen Metabolite aus Leucin im Versuch LEU_LEU durch *L. sakei* TMW 1.1322, *L. sakei* TMW 1.1383 und *L. sakei* TMW 1.1393. Jeder Balken steht für einen Ansatz (Legende), die Blindwerte der Substrate in Natrium-Phosphat-Puffer (50 mM; pH 6,5) wurden subtrahiert (3.1.3.3.3).

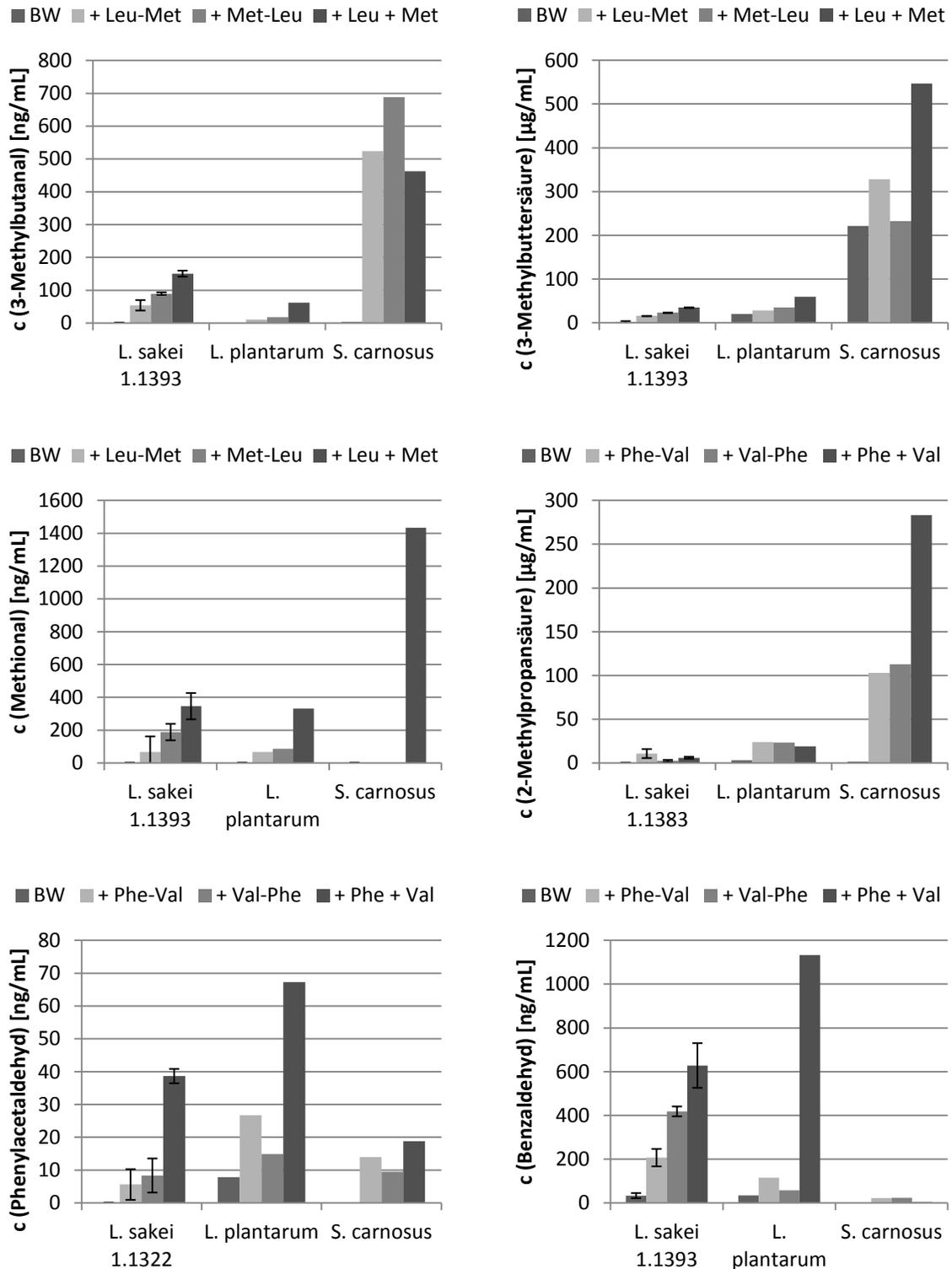


Abbildung 77: Vergleichende graphische Darstellung der gemessenen Konzentrationen einiger flüchtiger Metabolite aus Leucin und Methionin im Versuch LEU_MET bzw. aus Valin und Phenylalanin im Versuch PHE_VAL (siehe Achsenbeschriftung) durch einen Stamm *L. sakei* und *L. plantarum* TMW 1.708 bzw. *S. carnosus* TMW 2.801. Jeder Balken steht für einen Ansatz (Legende), die Blindwerte der Substrate in Natrium-Phosphat-Puffer (50 mM; pH 6,5) wurden subtrahiert (3.1.3.3.3).

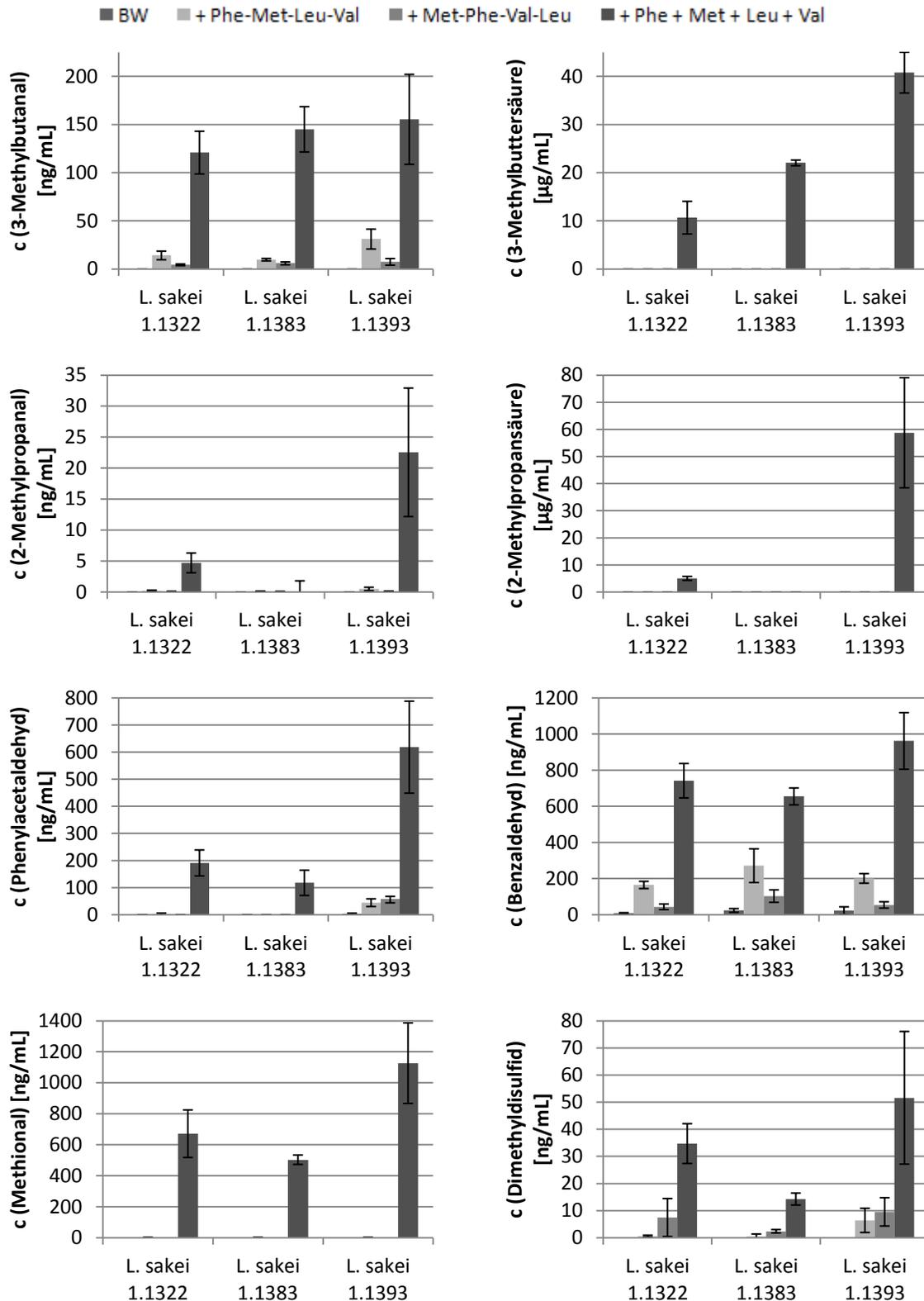


Abbildung 78: Vergleichende graphische Darstellung der gemessenen Konzentrationen einiger flüchtiger Metabolite aus Leucin, Valin, Phenylalanin und Methionin im Versuch PHE_MET_LEU_VAL durch *L. sakei* TMW 1.1322, *L. sakei* TMW 1.1383 und *L. sakei* TMW 1.1393. Jeder Balken steht für einen Ansatz (Legende), die Blindwerte der Substrate in Natrium-Phosphat-Puffer (50 mM; pH 6,5) wurden subtrahiert (3.1.3.4.3).

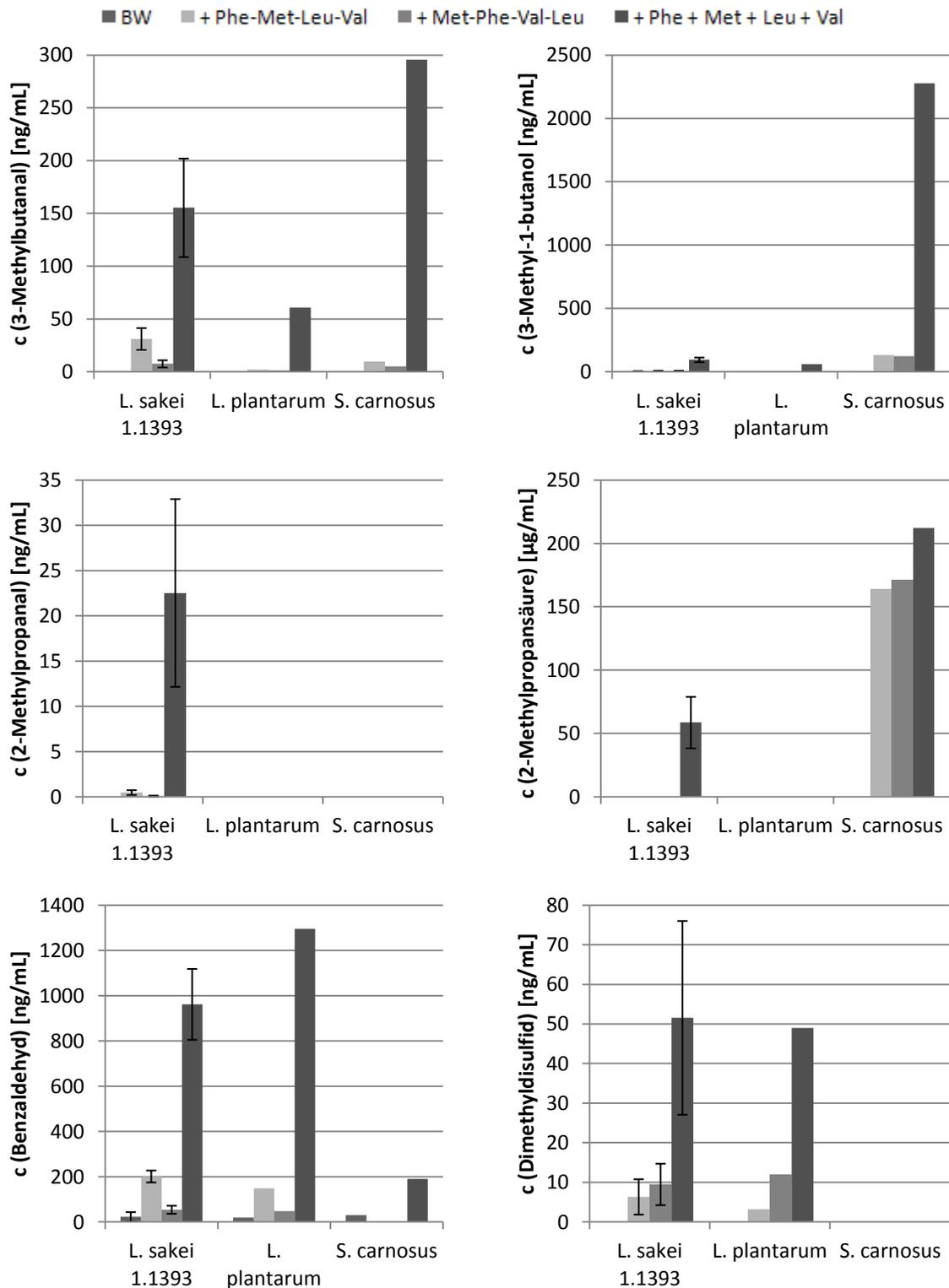


Abbildung 79: Vergleichende graphische Darstellung der gemessenen Konzentrationen einiger flüchtiger Metabolite aus Leucin, Valin, Phenylalanin und Methionin im Versuch PHE_MET_LEU_VAL (siehe Achsenbeschriftung) durch *L. sakei* TMW 1.1393, *L. plantarum* TMW 1.708 und *S. carnosus* TMW 2.801. Jeder Balken steht für einen Ansatz (Legende), die Blindwerte der Substrate in Natrium-Phosphat-Puffer (50 mM; pH 6,5) wurden subtrahiert (3.1.3.4.3).

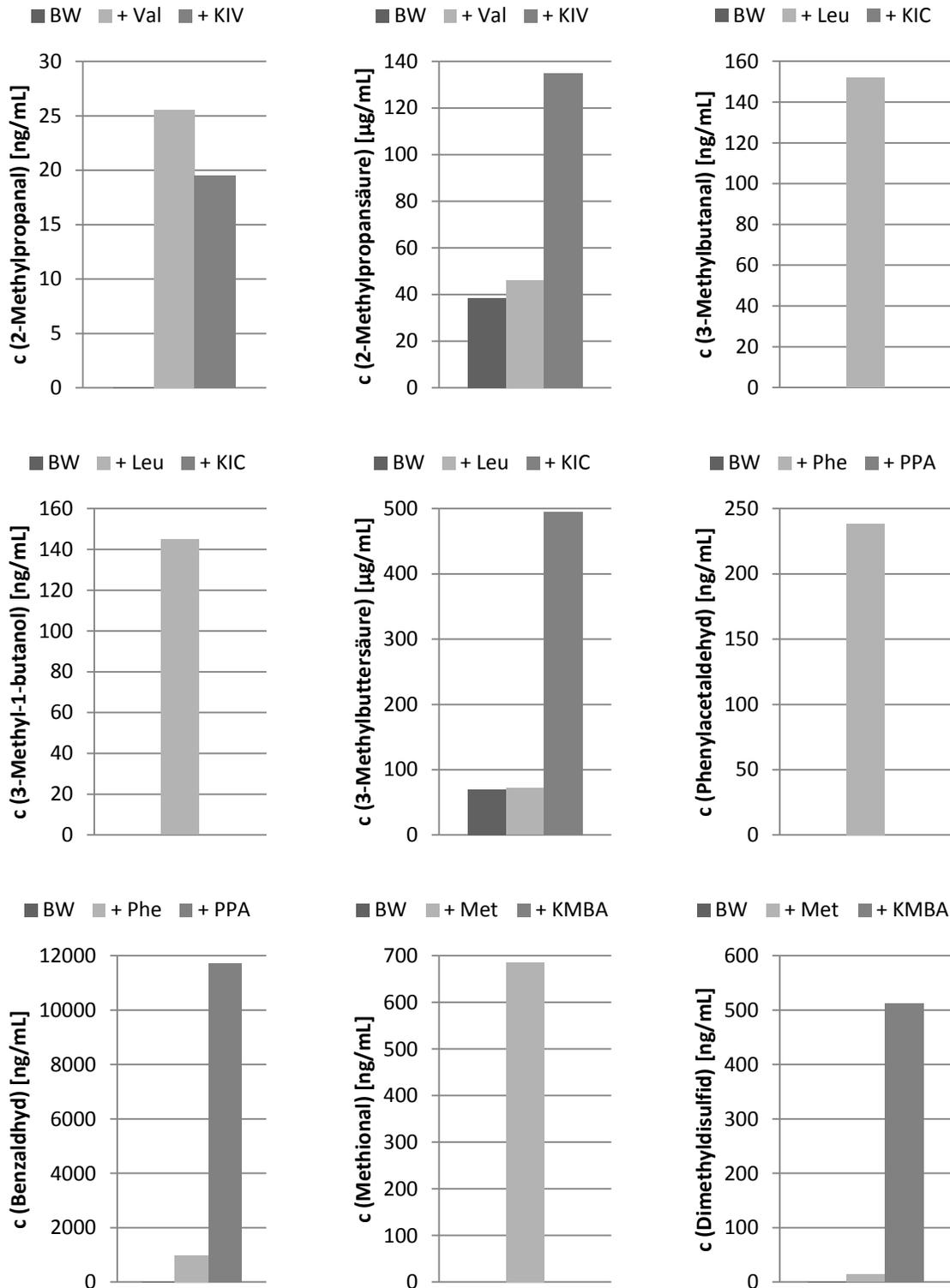


Abbildung 80: Vergleichende graphische Darstellung der gemessenen Konzentrationen der flüchtigen Metabolite aus Valin, Leucin, Phenylalanin und Methionin sowie deren komplementären α -Ketosäuren durch *L. sakei* TMW 1.1383. Jeder Balken steht für einen Ansatz (Legende), die Blindwerte der Substrate in Natrium-Phosphat-Puffer (50 mM; pH 6,5) wurden subtrahiert (3.1.3.5).

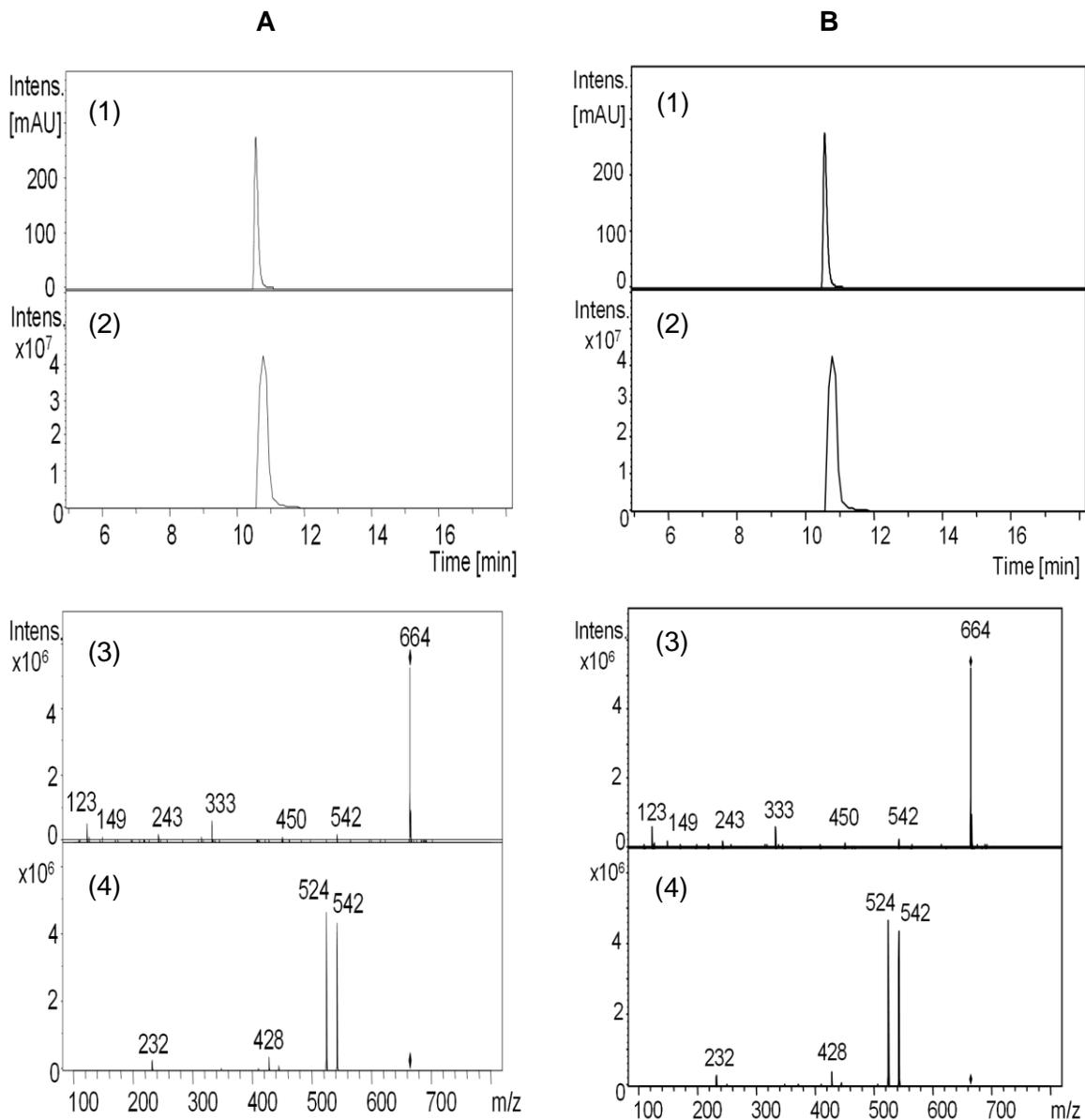


Abbildung 81: LC-UV/ESI-MSⁿ Analyse der vereinten aktiven Fraktionen aus der Gelfiltration (A) und des NAD-Standards (0,5 g/L; M = 663,43 g/mol) (B) (3.2.2). (1) = UV-Chromatogramm (280 nm); (2) = Massenspur m/z 664 (positiver Mode); (3) = Massenspektrum (positiver Mode) des Signals mit der Retentionszeit 10,8 min; (4) = MS²-Spektrum des Pseudomoleküls mit m/z 664.