

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München

**Nachweis amyloytischer Enzym-Aktivitäten in Lebensmitteln:
Entwicklung und Validierung eines innovativen, hochsensitiven
Immunoassays**

von Jonas Hofmayer
aus Altötting

München 2021

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München

Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch

Arbeit angefertigt unter der Leitung von:
Univ.-Prof. Dr. Dr. h. c. Erwin P. Märtlbauer

Mitbetreuung durch: Dr. Richard Dietrich

Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph.D.

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Dr. h. c. Erwin P. Märtlbauer

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Thomas W. Göbel

Tag der Promotion: 06. Februar 2021

Für Tori

INHALTSVERZEICHNIS

I	EINLEITUNG.....	1
II	LITERATURÜBERSICHT	3
1	Verflüssigung von Milchprodukten	3
2	Einsatzgebiete von modifizierter „Stärke“	4
3	Enzymatischer Stärkeabbau.....	6
4	Vorkommen und Gewinnung amyloytischer Enzyme.....	7
5	Industrieller Einsatz technischer Enzyme.....	10
6	Amylase-Nachweisverfahren	13
7	Detektion stärkeabbauender Enzyme in Lebensmitteln	15
III	MATERIAL UND METHODEN.....	17
1	Material und Geräte.....	17
1.1	Chemikalien, Biochemika und Immunreagenzien.....	17
1.2	Lösungen und Puffer.....	18
1.3	Amyloytische Enzyme.....	20
1.4	Geräte und Software	21
1.5	Weitere Materialien	21
2	Methodik.....	21
2.1	Überprüfung kommerzieller Amylase-Nachweisverfahren.....	21
2.2	Verflüssigung stärkehaltiger Milchprodukte	23
2.3	Herstellung von Hapten-Konjugaten	23
2.3.1	Markierung von Mehrfachzuckern	23
2.3.2	Markierung von Proteinen	24
2.4	Generierung von monoklonalen Antikörpern (mAk)	24
2.5	Herstellung von Antikörper-Enzym-Konjugaten	26
2.6	Indirekte Enzymimmuntests (EIAs) zur Charakterisierung der mAk	26
2.7	Sandwich-EIA.....	27
2.8	Nachweis amyloytischer Enzym-Aktivitäten	28
IV	ERGEBNISSE.....	29
1	Optimierung und Anwendbarkeit kommerzieller Amylase-Tests	29

2	Modellversuche zur Produktverflüssigung	34
3	Herstellung der Testreagenzien.....	37
3.1	Enzymsubstrate	37
3.2	Entwicklung und Charakterisierung von Hapten-spezifischen Antikörpern	39
4	Etablierung von Sandwich-EIAs	41
5	EIA-basierter Nachweis amyloytischer Enzym-Aktivitäten.....	43
5.1	Untersuchungen zur Substratstabilität	43
5.2	Überprüfung des Testprinzips.....	44
5.3	Optimierung der Testparameter	47
5.4	Nachweisbarkeit amyloytischer Enzyme.....	49
6	Anwendbarkeit des neuentwickelten Testsystems.....	53
6.1	Implementierung von Kontrollansätzen	53
6.2	Überprüfung der Probenmatrix-Kompatibilität	54
6.3	Untersuchung von Realproben	61
V	DISKUSSION.....	65
1	Testentwicklung	65
2	Überprüfung der Anwendbarkeit	72
VI	ZUSAMMENFASSUNG.....	79
VII	SUMMARY	81
VIII	LITERATURVERZEICHNIS	83
IX	ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	93
X	TABELLENVERZEICHNIS	95
XI	DANKSAGUNG	97

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

(l)-Mdx	langketiges Maltodextrin
(s)-Mdx	kurzkettiges Maltodextrin
A.	<i>Aspergillus</i>
Aq. deion.	deionisiertes Wasser (zusätzlich sterilfiltriert)
B.	<i>Bacillus</i>
BSA	bovines Serumalbumin
CGTase	Cyclomaltodextrin-Glucanotransferase
DNS	3,5-Dinitrosalicylsäure
EC₅₀	Enzym-Konzentration, die im EIA zu einer relativen Absorption von 50 % führt
EC-Nr.	Enzyme Commission Number
EDTA	Ethyldiamintetraessigsäure
EIA	Enzymimmuntest (enzyme immunoassay)
Glc	Glukose
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (high performance liquid chromatography)
HRP	Meerrettich-Peroxidase (horseradish peroxidase)
I.F.A.	inkomplettes Freundsches Adjuvans
i.p.	intraperitoneal
IC₅₀	mittlere inhibitorische Konzentration (half maximal inhibitory concentration)
Ig	Immunglobulin
KLH	Hämocyanin der Schlüsselloch-Schnecke (keyhole limpet hemocyanin)
mAk	monoklonale Antikörper
MHD	Mindesthaltbarkeitsdatum
MWCO	molekulare Ausschlussgrenze (molecular weight cut-off)
NS	Nelson-Somogyi
NWG	Nachweisgrenze
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (phosphate buffered saline)
RBB	Remazol-Brilliantblau
s.c.	subkutan
Temp.	Temperatur
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin

I EINLEITUNG

Produktfehler bei stärkehaltigen Milchprodukten treten regelmäßig auf, erste Berichte hierzu wurden bereits in den 1980er Jahren in den USA veröffentlicht (Barefoot and Adams, 1980). Die betroffenen Produkte, ultrahocherhitzte Puddings, wiesen eine deutlich reduzierte Viskosität auf, die auf einen Stärkeabbau durch hitzestabile Amylasen zurückgeführt wurde (Deeth and Lewis, 2017). Die Kontaminationsquelle konnte allerdings damals nicht eindeutig identifiziert werden.

Diese Problematik ist nach wie vor aktuell und betrifft auch deutsche Hersteller, wie eine 2016 durchgeführte, vertrauliche Umfrage zeigte (persönliche Mitteilung, Hammelele). Betroffene Betriebe berichten, dass z.T. ein- bis zweimal pro Jahr eine Verflüssigung bei hitzebehandelten, stärkehaltigen Milcherzeugnissen auftritt. Besonders betroffen sind Produktgruppen, die in erster Linie für den Export gedacht sind und selbst ungekühlt meist eine Haltbarkeit von mehreren Monaten aufweisen. Typisch für diesen Verderb ist zudem, dass nach der Herstellung oftmals Monate bis zum Eintritt der Verflüssigung vergehen, sodass sich die Produkte zu diesem Zeitpunkt i.d.R. bereits im Handel befinden. Der erforderliche Rückruf verursacht dem Hersteller immense Kosten (Velthuis et al., 2009). Von Vorteil wäre deshalb eine möglichst frühzeitige Erkennung von eventuellen Amylasen-Kontaminationen.

Als Kontaminationsweg ist sowohl eine Amylasen-Bildung durch Mikroorganismen in den End- bzw. Rohprodukten als auch der Eintrag technischer Enzyme durch verunreinigte Ausgangsstoffe denkbar. Da die Produkte zur Haltbarmachung meist einem Erhitzungsprozess, oftmals sogar einer UHT-Behandlung, unterzogen werden, muss von einer ausgesprochenen Hitzestabilität der Kontaminanten ausgegangen werden (Teh et al., 2014). Im Falle mikrobiell bedingter Amylasen-Bildung kommen daher, im Hinblick auf die Thermostabilität, v.a. Sporenbildner, wie z.B. Keime der Genera *Alicyclobacillus*, *Bacillus* und *Geobacillus*, in Betracht. Eine Verunreinigung mit technischen Enzymen ist in erster Linie durch Rohwaren, wie z.B. Erzeugnisse der Zuckerindustrie, möglich, bei deren Herstellung hitzestabile, amylolytische Enzyme zum Einsatz kommen (Eggleston et al., 2013). Auch eine Kontamination über amylasehaltige Reinigungsmittel, die zur Reinigung der Produktionsanlagen verwendet werden, ist nicht auszuschließen (Tran et al., 2003).

Im Hinblick auf diese Problematik war das Ziel der vorliegenden Arbeit die Entwicklung und Optimierung eines Nachweissystems, mit dem auch minimale Aktivitäten stärkeabbauender Enzyme in Ausgangs- bzw. Endprodukten nachweisbar sind. Dies ist mit

den derzeit verfügbaren, kommerziell erhältlichen, enzymatischen Tests nicht möglich. Daher sollte ein alternatives, innovatives Testprinzip realisiert werden, bei dem der Abbau eines Enzymsubstrats durch amyloytische Enzyme in einem hochsensitiven Sandwich-EIA nachgewiesen wird. Die als Enzymsubstrat verwendeten Mehrfachzucker (Stärke bzw. Stärkederivate) werden dazu chemisch mit einer niedermolekularen Substanz mehrfach markiert. Werden diese markierten Kohlenhydrate in einen Sandwich-EIA eingesetzt, bei dem spezifische Antikörper gegen die niedermolekulare Substanz sowohl als Fang- als auch als Detektionsantikörper dienen, werden hohe Signalintensitäten erreicht. Bei Kontakt der markierten Stärke(derivate) mit amylasehaltigem Probenmaterial kommt es zur Hydrolyse der Mehrfachzucker. An die entstandenen Spaltfragmente können dann im Sandwich-EIA nur noch wenige oder keine Detektionsantikörper mehr binden und das gemessene Testsignal nimmt deutlich ab. Mit diesem innovativen Ansatz lässt sich potentiell ein Testsystem erstellen, das den hochsensitiven Nachweis amyloytischer Enzym-Aktivitäten auch in komplexen Lebensmittelmatrices ermöglicht.

II LITERATURÜBERSICHT

1 Verflüssigung von Milchprodukten

Enzymbedingter Verderb von UHT-Milchprodukten, der sich als bitterer Geschmack (sog. Off-Flavor) äußert, wurde schon in den 1970er Jahren beobachtet. Bei diesen Fällen ging man davon aus, dass in den Rohwaren durch Bakterien Proteasen gebildet werden, die die Wärmebehandlung aufgrund ihrer Hitzestabilität überstehen, und während der Lagerung zu abweichenden Produkteigenschaften führen (West et al., 1978, Richter et al., 1979, McKellar, 1981).

Barefoot und Adams beschrieben 1980 Produktveränderungen bei UHT-Puddings, für die gewöhnlich lange Haltbarkeiten von bis zu 10 Monaten angegeben werden. Hierbei trat im Extremfall bereits 2 Wochen nach Herstellung, bei anderen Chargen aber auch erst nach 6 Monaten eine vollständige Verflüssigung der Produkte auf. Nach aufwändiger Probenextraktion und unter Verwendung langwieriger Analyseverfahren waren im betroffenen Produkt Aktivitäten stärkeabbauender Enzyme nachweisbar. Die Reduktion der Aktivität nach Zugabe von EDTA bzw. nach Vorbehandlung mit proteolytischen Enzymen führte zu der Annahme, dass ursächlich Metalloenzyme an diesem Verderb beteiligt sind. Nach Zusatz von bakterieller Amylase wurde innerhalb von 6 Tagen eine Verflüssigung von bisher unauffälligem, stärkehaltigem Pudding beobachtet. Diese Ergebnisse sprachen für eine Verflüssigung durch Amylasen, die Eintragsquelle konnte jedoch nicht ermittelt werden (Barefoot and Adams, 1980).

In anschließenden Modellversuchen, bei denen Pudding mit hitzestabiler, bakterieller Amylase künstlich kontaminiert wurde, konnte gezeigt werden, dass derartige Enzyme den Erhitzungsprozess während der Herstellung von UHT-Pudding überstehen (Anderson et al., 1983). Die Restaktivität betrug nach UHT-Behandlung (143 °C für 85 sec) ca. 26 % verglichen mit der Amylase-Aktivität vor der Erhitzung. Detaillierte Untersuchungen zeigten zudem, dass Kombinationen verschiedener Puddingbestandteile, wie z.B. Stärke oder Proteine, die Thermostabilität der Amylase deutlich erhöhen (Anderson et al., 1983). Ein möglicher Eintrag hitzestabiler Amylasen über kontaminierte Rohstoffe ist nach wie vor im Bereich der Lebensmittelindustrie nicht auszuschließen, wobei vor allem extrem thermoresistente, sog. technische Enzyme eine Herausforderung darstellen (Eggleston et al., 2013).

2 Einsatzgebiete von modifizierter „Stärke“

Grundsätzlich ist Stärke ein Polysaccharid pflanzlichen Ursprungs, das für gewöhnlich zu ca. 25 % aus Amylose und ca. 75 % aus Amylopektin besteht. Je nach Stärkequelle wurden allerdings unterschiedliche Amylose- bzw. Amylopektin-Gehalte gefunden (Grant et al., 2002). Während bei Amylose die Glukosemonomere $\alpha 1 \rightarrow 4$ -glykosidisch verbunden sind, besitzt Amylopektin auch Verzweigungen, die durch $\alpha 1 \rightarrow 6$ -glykosidische Bindungen entstehen (Zobel, 1988). Stärke ist ein natürlicher Bestandteil vieler Lebensmittel, findet aber auch in modifizierter Form in vielen Industriebereichen Verwendung (Ačkar et al., 2015).

Stärkederivate können beispielsweise als Adhäsive (Nwokocha, 2011), bei der Beschichtung von Papier (Autio et al., 1992) oder auch als Hilfsstoff in der Textilindustrie eingesetzt werden, um das Garn vor dem Weben zu umhüllen und somit die Stabilität zu erhöhen (Djordjevic et al., 2019). Methylacrylat-modifizierte Stärke ist die Grundlage für die Herstellung biologisch abbaubarer Kunststoffe, die z.B. in der Landwirtschaft zur Abdeckung von Feldern genutzt werden (Dennenberg et al., 1978, Luckachan and Pillai, 2011). Auch im Medizinbereich werden modifizierte Stärken eingesetzt, über die beispielsweise die Freisetzung von Arzneistoffen reguliert (Mauricio et al., 2015), oder bei Einsatz von Hydroxyethylstärke-haltigen Infusionslösungen eine Erhöhung des Blutplasmavolumens erreicht werden kann (Kulicke and Heinze, 2005).

Tabelle 1: Laut Anlage 4 (zu § 5 Abs. 1 und § 7) Teil A der Zusatzstoff-Zulassungsverordnung als Zusatzstoff zugelassene modifizierte Stärken

E-Nummer	Zusatzstoff
E 1404	Oxidierte Stärke
E 1410	Monostärkephosphat
E 1412	Distärkephosphat
E 1413	Phosphatiertes Distärkephosphat
E 1414	Acetyliertes Distärkephosphat
E 1420	Acetylierte Stärke
E 1422	Acetyliertes Distärkeadipat
E 1440	Hydroxypropylstärke
E 1442	Hydroxypropyldistärkephosphat
E 1450	Stärkenatrium-octenylsuccinat
E 1451	Acetylierte oxidierte Stärke

Für die vorliegende Arbeit von besonderem Interesse ist jedoch die Verwendung von Stärke und deren Derivaten in Lebensmitteln, wobei neben dem Nährwert auch die Optimierung der Produkteigenschaften eine zentrale Rolle spielt. Laut Anlage 7 (zu § 5 Abs. 1) der Zusatzstoff-Zulassungsverordnung vom 29. Januar 1998 (zuletzt geändert am 5. Juli 2017) werden modifizierte Stärken durch ein- oder mehrmalige chemische Behandlung aus essbaren Stärken gewonnen. Diese essbaren Stärken können physikalisch oder enzymatisch behandelt und unter Einfluss von Säuren bzw. Laugen dünnkochend gemacht oder gebleicht worden sein. In Anlage 4 (zu § 5 Abs. 1 und § 7) Teil A der gleichen Verordnung sind zahlreiche veränderte Stärken aufgelistet, die *quantum satis* als Zusatzstoffe in vielen Lebensmitteln eingesetzt werden dürfen (Tab. 1).

Zwar kann modifizierte Stärke in diversen Lebensmitteln genutzt werden, beispielsweise als Gelatineersatz in veganen und vegetarischen Nahrungsmitteln (van der Maarel et al., 2005), oder in Form von abbauresistenter Stärke in Toastbrot oder Nudeln, um den Ballaststoff-Gehalt zu erhöhen (Wepner et al., 1999). Wichtig hinsichtlich der Thematik der vorliegenden Arbeit ist aber, wie in zahlreichen Publikationen dargestellt, ihre Verwendung als Verdickungsmittel in Milchprodukten.

Rheologische Untersuchungen von Berski et al. (2011) zeigten, dass durch Acetylierung bzw. Phosphorylierung modifizierte Stärken in Wasser eine höhere Viskosität infolge von Gelbildung aufweisen als oxidierte bzw. native Stärke. Zur Verdickung von Joghurt mit niedrigem Fett-Gehalt kann, wie von Alting et al. (2009) beschrieben, enzymatisch behandelte Stärke verwendet werden, die ebenfalls durch Gelbildung die Viskosität erhöht. Ein cremiges Mundgefühl soll dabei unter anderem aus der Stärkehydrolyse durch im Speichel vorliegende Amylase resultieren. Auch physikalisch modifizierte Stärke führt, den Ergebnissen von Morell et al. (2015) zufolge, zu einer dichteren und cremigeren Joghurtstruktur im Vergleich zu Proben ohne modifizierte Stärke. Dabei konnte mittels elektronenmikroskopischer Untersuchungen deutlich die Einbettung von Stärkegranula in die Proteinmatrix des Joghurts gezeigt werden, wodurch die Textur des Milchprodukts womöglich zusätzlich stabilisiert wird (Morell et al., 2015). Wechselwirkungen mit Proteinen und verdickende Eigenschaften wurden auch bei Zugabe von quervernetzter, acetylierter Stärke zum Joghurt festgestellt. Die optimale Stärke-Konzentration lag im getesteten Joghurtsystem den Autoren zufolge zwischen 0,5 % und 1,5 % (Cui et al., 2014). Auch in zahlreichen, im Handel erhältlichen Milchprodukten werden mittlerweile modifizierte Stärken als Stabilisator eingesetzt. Die Hersteller verwenden dabei häufig Maisstärke-Derivate, deren optimale Konzentration im Rahmen der Produktentwicklung i.d.R. durch Pilotversuche ermittelt wird (Deeth and Lewis, 2017). Nach den Angaben

verschiedener Herstellern werden stärkehaltigen Milchprodukten, wie z.B. Fruchtjoghurts, typischerweise etwa 2,5 – 3 % modifizierte Stärke als Verdickungsmittel zugesetzt (persönliche Mitteilung).

3 Enzymatischer Stärkeabbau

Enzymbedingter Stärkeabbau ist ein komplexes Geschehen, bei dem zahlreiche Enzymgruppen beteiligt sind. Der Enzymdatenbank BRENDA zufolge (Jeske et al., 2018), nehmen dabei α -Amylasen (EC 3.2.1.1), die spezifisch $\alpha 1 \rightarrow 4$ -glykosidische Bindungen innerhalb eines Polysaccharids spalten, eine zentrale Stellung ein. Wie in Abb. 1 schematisch dargestellt, entstehen so verschiedene Spaltprodukte, die durch weitere Enzyme letztendlich zu α - bzw. β -D-Glukose abgebaut werden können.

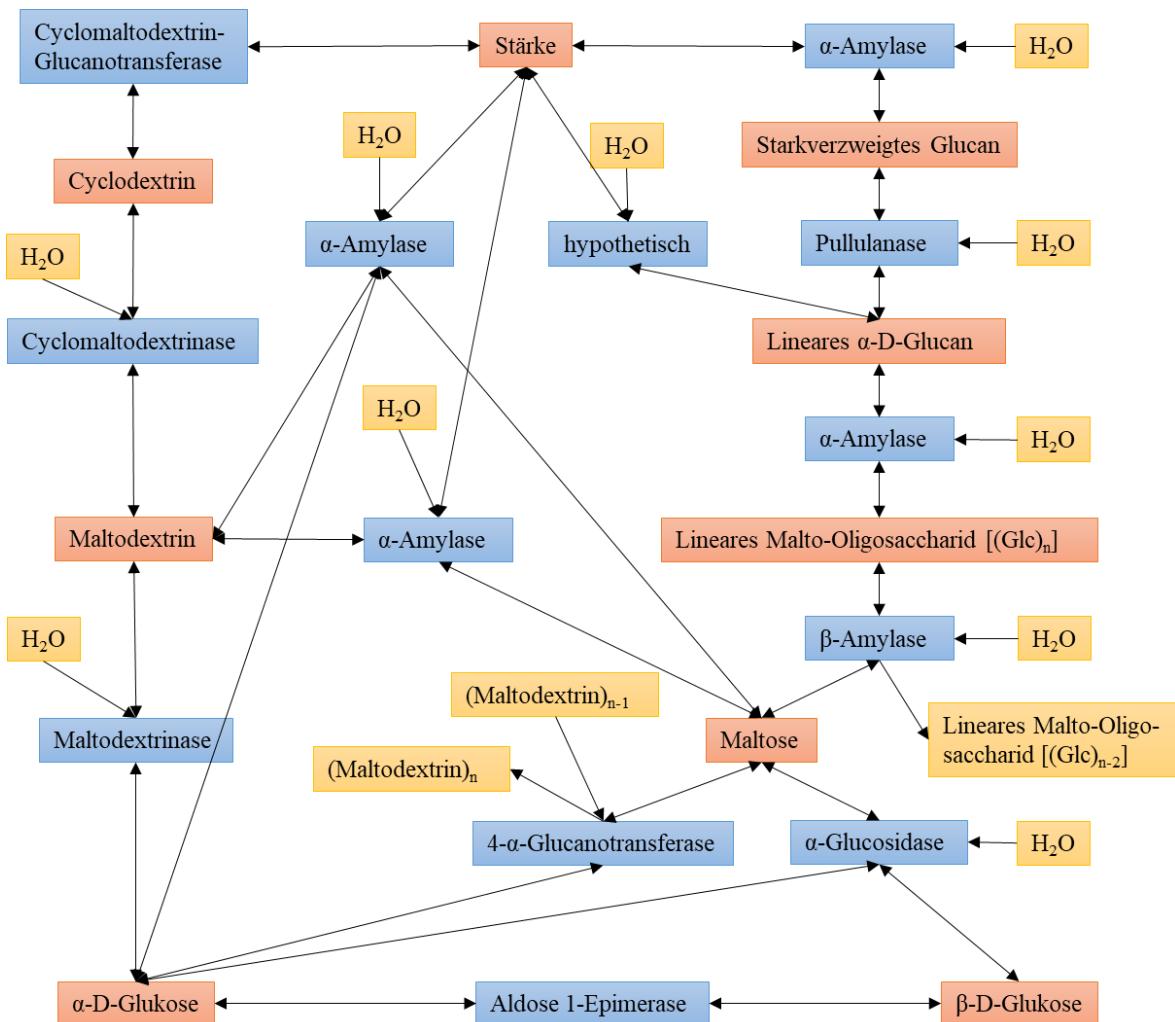


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Stärke-Abbauwege nach den Informationen der Enzymdatenbank BRENDA (Jeske et al., 2018).

Beispielsweise werden starkverzweigte Polysaccharide durch Pullulanasen in lineare Verbindungen umgesetzt, die dann mittels α - und β -Amylase zu Maltose und schließlich mit Hilfe von α -Glucosidase zu Glukose hydrolysiert werden. Die Bildung und der anschließende Abbau von zyklischen Dextrinen stellt außerdem einen alternativen Stärke-Abbauweg dar, wobei Cyclomaltodextrin-Glucanotransferasen (CGTasen) den ersten, entscheidenden Schritt der Stärkehydrolyse übernehmen (Abb. 1). Neben den in Abb. 1 aufgeführten Enzymen existieren weitere Enzymgruppen, die ebenfalls Stärke bzw. Derivate davon als Substrat nutzen. Zu dieser Kategorie zählt z.B. Glucoamylase, auch bekannt als Amyloglucosidase, die vom nicht-reduzierenden Ende ausgehend stärkeähnliche Poly- und Oligosaccharide nahezu komplett in Glukose umsetzen kann (Xiao et al., 2006, Shin et al., 2008). Auch maltogene Amylase ist in der Lage Stärke abzubauen, wobei als Reaktionsprodukt in erster Linie Maltose gebildet wird (Christophersen et al., 1998).

4 Vorkommen und Gewinnung amyloytischer Enzyme

Stärkeabbauende Enzyme sind nahezu ubiquitäre Verbindungen. So werden α -Amylasen bspw. von Speicheldrüsen und Pankreasgewebe gebildet und dienen dem Aufschluss der in der Nahrung enthaltenen Stärke (Santos et al., 2012). Auch im Honig lassen sich natürlicherweise Amylase-Aktivitäten (Diastase) nachweisen und stellen für dieses Lebensmittel ein Qualitätsmerkmal dar. Laut Anlage 2 (zu den §§ 2 und 4) Abschnitt II der Honigverordnung vom 16. Januar 2004 (zuletzt geändert am 5. Juli 2017) muss Honig für gewöhnlich nach Behandlung und Mischung eine Diastase-Zahl nach Schade von mind. 8 aufweisen. Ausgenommen davon sind neben Backhonig auch Honigsorten, die einen geringen natürlichen Enzym-Gehalt besitzen, wie z.B. Zitrushonig. Bei der Keimung von Getreide spielen Amylasen ebenfalls eine entscheidende Rolle, so wurde beispielsweise bei Untersuchungen von Maiskörnern ein drastischer Anstieg des Amylase-Gehalts während der ersten Tage der Keimung festgestellt (Helland et al., 2002).

Aber auch Mikroorganismen sind in der Lage ein breites Repertoire an stärkeabbauenden Enzymen zu bilden. Eine große Vielfalt dieser Enzyme wird, wie eingangs erwähnt, in verschiedensten industriellen Bereichen eingesetzt (Kula, 1980, Mehta and Satyanarayana, 2016). Die Anzucht der Keime erfolgt im Großmaßstab, wobei ausgereifte Kultivierungsverfahren und Bioreaktoren eine massenhafte Produktion der Enzyme ermöglichen (Falch, 1991). Einige Amylasen der in Tabelle 2 aufgeführten Gattungen *Alicyclobacillus*, *Bacillus*, *Geobacillus* sowie *Micrococcus* weisen eine hohe Thermostabilität auf, überstehen also – mit gewissen Aktivitätseinbußen – diverse Erhitzungsprozesse und sind deshalb als mögliche Kontaminanten von thermisierten,

stärkehaltigen Milchprodukten besonders problematisch. So zeigen manche Enzyme selbst nach mehrstündiger Hitzebehandlung bei Temperaturen von 70 – 90 °C nach wie vor eine hohe Restaktivität (Tab. 2). Zudem kann die Robustheit einiger Amylasen durch Zusatz von Calcium-Ionen noch gesteigert werden (Madsen et al., 1973, Hmidet et al., 2008). Neben Bakterien sind auch verschiedene Pilzarten, wie *Aspergillus oryzae* (Masuda et al., 2009) oder *Aspergillus niger* (Rosés and Guerra, 2009), in der Lage, stärkeabbauende Enzyme zu synthetisieren. Je nach Organismus werden verschiedene, z.T. aufwändige Kultivierungsbedingungen beschrieben, wobei unter anderem der pH-Wert des Mediums bzw. die Anzuchttemperatur angepasst werden (Tab. 2). Die Enzymausbeute wird außerdem durch die Inkubationsdauer und bestimmte Bestandteile des Nährsubstrats, wie z.B. Stärke, maßgeblich beeinflusst (Bozic et al., 2011).

Bei Keimen mit hohen Anforderungen oder geringer Amylase-Produktion besteht zudem die Möglichkeit die gewünschte Gen-Sequenz mittels geeigneter Plasmidvektoren in einen Wirtsorganismus, z.B. *B. subtilis*, zu übertragen, um die Wirtschaftlichkeit der Enzymproduktion zu steigern (Outtrup and Norman, 1984, Chen et al., 2015). Des Weiteren werden oft moderne, in der Lebensmittelindustrie als Hilfsstoffe eingesetzte Enzyme durch genetische Verfahren für den jeweiligen Anwendungsbereich zweckoptimiert, wobei insbesondere die Calcium-unabhängige Thermostabilität bzw. die Stabilität gegenüber oxidativem Stress von besonderem Interesse sind (Bisgaard-Frantzen et al., 1999). Dadurch hat sich der potenzielle Einsatzbereich solcher Enzyme enorm vergrößert.

Tabelle 2: Beispielhafte Aufstellung verschiedener hitzestabiler, bakterieller α -Amylasen

Spezies	Anreicherung der Keime		Eigenschaften der gebildeten, amylolytischen Enzyme			Referenz
	pH	Temp. (° C)	pH- Optimum	Temp.- Optimum (° C)	Thermostabilität (relative Restaktivität nach Hitzestress)	
<i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i>	3,5	57	3,0	75	-	Schwermann et al., 1994
<i>Alicyclobacillus</i> sp.	3,0	60	4,2	75	95 % bei 75 °C für 1 h	Bai et al., 2012
<i>Bacillus acidicola</i>	4,5	37	4,0	60	50 % bei 80 °C für 53 min	Sharma and Satyanarayana, 2010
<i>B. amyloliquefaciens</i>	7,0	60	7,0	70	50 % bei 90 °C für 6 h	Kikani and Singh, 2011
<i>B. cereus</i>	7,5	35	8	65	-	Annamalai et al., 2011
<i>B. licheniformis</i>	7,0	37	5,0 – 10,0	90	50 % bei 90 °C für 3 min (50 % bei 90 °C für 15 min mit 5 mM Ca ²⁺)	Hmidet et al., 2008
<i>B. licheniformis</i>	6,5	37	6,5	90	55 % bei 90 °C für 20 min (85 % bei 90 °C für 20 min mit CaCl ₂)	Bozic et al., 2011
<i>B. subtilis</i>	7,0	30	5,6	80	-	Uguru et al., 1997
<i>Bacillus</i> sp.	7,2 – 7,5	60	5,5	90	50 % bei 90 °C für 30 min	Zhang et al., 1994
<i>Bacillus</i> sp.	-	65	5,5	75 – 80	50 % bei 80 °C für 4 h	Mamo and Gessesse, 1999
<i>Micrococcus</i> sp.	-	85	3,5	85	95 % bei 85 °C für 24 h	Samie et al., 2012
<i>Geobacillus stearo- thermophilus</i>	7	55	7,0	70	50 % bei 70 °C für 2 h	Fincan and Enez, 2014

5 Industrieller Einsatz technischer Enzyme

Die Anwendung technischer Enzyme bei industriellen Prozessen ist weit verbreitet und hat zahlreiche Vorteile. So werden die Herstellungskosten reduziert, die Produktqualität verbessert und in vielen Fällen auch schädliche Umwelteinflüsse vermieden (Falch, 1991). Eine der wichtigsten Verwendungen von technischen Enzymen ist ihr Einsatz in Wasch- und Reinigungsmittel (Donlon, 2007). Daneben existieren aber noch zahlreiche weitere Einsatzmöglichkeiten bei industriellen Prozessen, wie z.B. bei der Herstellung von Leder, Papier oder Textilien (Tab. 3).

Besonders interessant für die vorliegende Arbeit ist jedoch die Nutzung von amylolytischen Enzymen als technischer Hilfsstoff in diversen Bereichen der Lebensmittelindustrie. Für diesen Zweck werden von verschiedenen Firmen, wie z.B. Biocon India Ltd., Biozyme GmbH oder Genencor International Inc., eine breite Palette an unterschiedlichen Enzymen angeboten. Einige Präparationen amylolytischer Enzyme des weltweit größten Produzenten (Novozymes A/S) sind in Tab. 4 aufgeführt. Ein prominenter Vertreter ist die α -Amylase Termamyl[®], die von genetisch modifizierten *Bacillus licheniformis*-Stämmen synthetisiert wird (Hashida and Bisgaard-Frantzen, 2000). Sie besitzt ein hohes Temperatur-Optimum (ca. 90 °C), zeigt bei pH 6 – 7 die höchste Aktivität und zeichnet sich durch eine ausgesprochene Thermostabilität aus. Zwar waren ohne zusätzliche Calcium-Supplementierung nach 2 h bei 70 °C nur noch ca. 10 % Restaktivität nachweisbar, bei Zugabe von Calcium (3,4 ppm) jedoch wurde selbst nach 6 h bei der gleichen Temperatur kein Aktivitätsverlust verzeichnet (Madsen et al., 1973). Darüber hinaus konnte durch genetische Modifikation eine Variante von Termamyl[®] generiert werden, bei der die Stabilität weniger stark vom Calcium-Gehalt abhängig ist (Hashida and Bisgaard-Frantzen, 2000).

Derartige Enzym-Präparationen finden beispielweise bei Herstellung von Fructose-, Glukose- bzw. Maltose-Sirup aus Stärke Verwendung, wobei das Polysaccharid mittels hitzestabiler α -Amylase, β -Amylase oder Pullulanase hydrolysiert wird (Tab. 3). Dabei sind die Anforderungen an die Enzyme hoch. Gewünscht ist eine Calcium-unabhängige, ausgeprägte Aktivität, selbst bei niedrigem pH-Werten von ca. 4,5 und bei Temperaturen von bis zu 95 °C (Bisgaard-Frantzen et al., 1999). Ein möglicher Eintrag solcher in der Zuckerindustrie verwendeten Enzyme in verschiedene Lebensmittel, wie Pudding oder Joghurt, wird in der Literatur beschrieben (Eggleston et al., 2013).

Tabelle 3: Zusammenstellung üblicher Einsatzbereiche von technischen Enzymen

Einsatzbereich	Enzym	Funktion	Referenz
Backwarenherstellung	Maltogene Amylasen	Verzögerung von Alterungsprozessen	Morgan et al., 1997; Christophersen et al., 1998; Reichenberger et al., 2020
Brauindustrie	α -/ β -Amylasen	Bildung von Kohlenhydraten für die weitere Verstoffwechslung	Józef, 2007
Fruchtsaftzeugung	Pektinasen	Saftklärung	Demir et al., 2001
Glukose-/Sirupherstellung	α -Amylasen		Nielsen and Borchert, 2000; de Souza and de Oliveira Magalhaes, 2010
	β -Amylasen	Stärkehydrolyse	Novozymes A/S, 2015
	Pullulanasen		Nisha and Satyanarayana, 2016
Käseproduktion	Peptidasen	Milchgerinnung	Rawlings et al., 2007
Lederindustrie	Peptidasen	Haarentfernung, Ledergeschmeidigkeit	Rawlings et al., 2007
Milchindustrie	Lipasen	Aromabildung	Jaeger and Reetz, 1998
Papierherstellung	Xylanasen	Verbesserung des Bleichprozesses	Roncero et al., 2005
Textilindustrie	α -Amylasen	Stärke-Entfernung von beschichtetem Garn	Saravanan et al., 2012
Wasch- und Reinigungsmittel	α -Amylasen	Zersetzung von Stärke sowie Fett- und Lipasen	Sundaram and Murthy, 2014
	Lipasen	Proteinrückständen	Jaeger and Reetz, 1998
	Peptidasen		Donlon, 2007

In der Backindustrie werden hingegen stärkeabbauende Enzyme genutzt, um dem Alterungsprozess von Backwaren entgegen zu wirken. So weist beispielsweise mit Amylase behandeltes Weißbrot nach mehrtägiger Lagerung eine deutlich weichere Konsistenz auf als die unbehandelte Kontrolle (Morgan et al., 1997). Außerdem führt der Zusatz von Amylase zum Teig neben einer optimierten Krustenbildung, auch zur Vergrößerung des Brotvolumens und damit zu einer Verbesserung der Brotqualität (Sahnoun et al., 2013).

Bei der Mälzung von Getreide für die Brauindustrie werden im Zuge der Keimung α - und β -Amylasen gebildet, um die Stärke des Getreidekorns umzusetzen. Die entstehenden Kohlenhydrate mit geringerem Molekulargewicht werden dann von den Hefen zu Ethanol verstoffwechselt. Dieser variable, natürliche Enzym-Gehalt im Malz kann durch Zusatz kommerzieller, amylolytischer Enzym-Präparationen ausgeglichen werden, wodurch eine bessere Kontrolle über den Herstellungsprozess erlangt wird (Jøzef, 2007).

Auch andere stärkeabbauende Enzyme werden industriell eingesetzt, wie z.B. CGTasen, die in der Lage sind, Stärke in zyklische Dextrine umzuwandeln (Norman and Jørgensen, 1992). Diese Dextrine werden als Trägerstoffe in Aroma-Präparationen verwendet, um die Freisetzung des Duftstoffs zu regulieren (Ciobanu et al., 2013). Außerdem können Cyclodextrine genutzt werden, um z.B. bittere Bestandteile in Zitrusäften zu neutralisieren (Konno et al., 1981) oder – im medizinischen Bereich – um die Aufnahme von Cholesterin durch Komplexbildung zu reduzieren (Somogyi et al., 2006).

Ferner sind amylolytische Enzyme auch in Wasch- und Reinigungsmitteln zu finden. Dieser Einsatzbereich setzt eine hohe Stabilität der verwendeten Enzyme gegenüber Oxidation und alkalischem pH (ca. 10,5) voraus. Ebenso muss die verwendete Amylase unabhängig vom Calcium-Gehalt stabil sein und sollte hohe Aktivitäten im Temperaturbereich von 25 bis 60 °C aufweisen (Bisgaard-Frantzen et al., 1999). Prinzipiell ist auch durch den Einsatz derartiger Reinigungsmittel bei der Säuberung von Anlagen der Lebensmittelindustrie ein Eintrag von amylolytischen Enzymen in Milchprodukte denkbar. (Tran et al., 2003).

Tabelle 4: Einsatzbereiche ausgewählter, kommerzieller Enzym-Präparationen des Herstellers Novozymes A/S in der Lebensmittelindustrie

Präparation	Enzym	Einsatzbereich	Referenz
AMG®	Amylo-glucosidase	Sirupherstellung	Govindasamy et al., 1997; Novozymes A/S, 2002a
BAN®	α -Amylase	Sirupherstellung	Madsen et al., 1973; Novozymes A/S, 2002b
Novamyl®	Maltogene Amylase	Backwarenherstellung	Morgan et al., 1997; Christoffersen et al., 1998
Promozyme®	Pullulanase	Sirupherstellung	Norman, 1983; Stavnsbjerg et al., 1986
Secura®	β -Amylase	Sirupherstellung	Novozymes A/S, 2015
Termamyl®	α -Amylase	Sirupherstellung	Madsen et al., 1973; Bisgaard-Frantzen et al., 1999

6 Amylase-Nachweisverfahren

Aufgrund der oben dargestellten vielseitigen Anwendung stärkeabbauender Enzyme wurden im Laufe der Zeit zahlreiche Methoden entwickelt, um deren Aktivität feststellen zu können. Schon früh erkannte man, dass sich die Amylase-Aktivität mittels Stärkenachweis ermitteln lässt. Sofern Amylase in der untersuchten Probe vorhanden ist, ist im probenhaltigen Testansatz, nach Inkubation, eine geringere Stärke-Konzentration zu erwarten als im amylasefreien Kontrollansatz. Die Detektion der Stärke kann dabei über die photometrische Messung von farbigen Stärke-Iod-Komplexen nach Zugabe von Iod-haltiger Lösung erfolgen (Fuwa, 1954). Auf Basis dieses Testprinzips entwickelte bspw. Schade et al. (1958) ein Verfahren, um Diastase (α -Amylase) in Honig nachweisen zu können. Die Bestimmung des Amylase-Gehaltes von gemahlenem Getreide erfolgt hingegen anhand der sogenannten Fallzahl. *De facto* wird dabei die Viskosität einer Mehlsuspension bestimmt. Gemessen wird die Zeit, die ein standardisierter Stab benötigt, um vertikal eine definierte Distanz in dieser Mehlsuspension zurückzulegen (Hagberg, 1960, Hagberg, 1961). Je geringer die Viskosität, umso mehr wurde die enthaltene Stärke bereits durch Amylasen abgebaut (Hagberg, 1960). Abgesehen von derartigen Produkt-spezifischen Methoden erfolgt der Nachweis stärkeabbauender Enzyme üblicherweise anhand der gebildeten Reaktionsprodukte. Häufig verwendete Verfahren, wie der Nelson-Somogyi (NS) Test oder der 3,5-Dinitrosalicylsäure (DNS) Test, basieren auf der Detektion von reduzierenden Zuckern, die bei der enzymatischen Spaltung von Polysacchariden entstehen (Gusakov et al., 2011). Die

reduzierenden Eigenschaften der Spaltprodukte führen bei beiden Nachweismethoden zu einer Farbreaktion, die photometrisch bestimmt wird. Aufgrund dieses Testprinzips ist der Einsatz dieser Verfahren bei zuckerhaltigen Probenmatrices verständlicherweise nicht möglich. Die Farbentwicklung im NS-Test ist auf die Reduktion eines Kupfer-haltigen Farbreagenzes zurückzuführen (Shaffer and Somogyi, 1933, Nelson, 1944). Zwar können mit diesem Verfahren reduzierende Zucker akkurat bestimmt werden, allerdings ist der Einsatz hochtoxischer Chemikalien erforderlich (McCleary and McGeough, 2015). Das Nachweisprinzip des DNS-Assays, der schon 1921 von Sumner und Graham beschrieben und später von Bernfeld (1955) weiterentwickelt wurde, beruht hingegen auf einer Reduktion von 3,5-Dinitrosalicylsäure zu 3-Amino-5-nitrosalicylsäure (Hostettler et al., 1951). Nachteilig ist jedoch, dass die Farbentwicklung nicht nur von der Menge, sondern auch von der Art des Spaltproduktes (Mono-, Oligosaccharid) abhängig ist (McCleary and McGeough, 2015).

Bei anderen Enzym-Tests werden Farbstoff-markierte Substrate eingesetzt. Die Menge des beim enzymatischen Verdau freigesetzten Farbstoffs ist von der Enzym-Aktivität abhängig und wird mit Hilfe eines Photometers bestimmt. Von Rinderknecht et al. (1967) wurde erstmals ein Verfahren beschrieben, bei dem mit Remazol-Brilliantblau (RBB) kovalent markierte Stärke als Substrat eingesetzt wurde. Die Aktivität stärkeabbauender Enzyme konnte dabei über die Messung der Farbintensität des Filtrats ermittelt werden. Der kommerzielle Phadebas® Amylase Test beruht auf dem gleichen Testprinzip: α -Amylase-Aktivität bedingt die Hydrolyse eines gefärbten, wasserunlöslichen Stärkepolymers. Die entstehenden farbigen, wasserlöslichen Fragmente werden anschließend im Überstand oder Filtrat detektiert und lassen eine quantitative Beurteilung der Enzym-Aktivität zu (Barnes and Blakeney, 1974, Phadebas AB, 2018). Auch beim Amylase SD Test der Firma Megazyme findet ein markiertes Substrat Verwendung. Es handelt sich dabei um ein mit para-Nitrophenol markiertes Heptasaccharid, das aufgrund einer chemischen Modifikation durch Exoamylasen, wie z.B. β -Amylase, Amyloglucosidase oder α -Glucosidase, nicht abgebaut werden kann (McCleary and Sheehan, 1987, Cornaggia et al., 2016). α -Amylasen hingegen sind in der Lage, das Substrat zu spalten. Die entstehenden Fragmente werden letztlich durch Zugabe einer hitzestabilen α -Glucosidase in Glukose und dem chromogenen para-Nitrophenol gespalten. Nach Zugabe einer Natriumphosphat-Lösung (0,06 M; pH 11,0), mit der einerseits die Enzymreaktion gestoppt und andererseits die Farbentwicklung intensiviert wird, kann anhand der messbaren Absorption bei 400 bzw. 405 nm die Amylase-Aktivität quantitativ bestimmt werden (McKie and McCleary, 2015, Cornaggia et al., 2016, Megazyme, 2019).

Häufig werden Amylase-Nachweisverfahren zur Bestimmung von amylolytischen Enzym-Aktivitäten in diversen Lebensmittelbereichen eingesetzt. Darüber hinaus finden sie aber auch im diagnostischen Bereich Verwendung, um bspw. erhöhte Amylase-Werte im Blut, die auf eine akute Pankreatitis bzw. eine schwere Nierenerkrankung hinweisen können, festzustellen (Schönebeck and Söderberg, 1971, Ismail and Bhayana, 2017).

7 Detektion stärkeabbauender Enzyme in Lebensmitteln

Der Bedarf an sensitiven Amylase-Tests ist, wie aktuelle Publikationen zeigen, nach wie vor sehr hoch. Beispielsweise war das Ziel der Arbeit von Eggleston et al. (2013), ein einfaches, industriell einsetzbares Verfahren zu entwickeln, mit dem mögliche Amylasen-Kontaminationen in rohem und raffiniertem Zucker sensitiv nachweisbar sind. Als Basis wurde der oben erwähnte Phadebas® Amylase Test verwendet, zur Adaption des Verfahrens an die Probenmatrix „Rohrzucker“ wurden verschiedene Testparameter variiert und optimiert. Die letztendlich optimierte Methode beinhaltet eine Verdünnung des Zuckers in Calcium-haltigem Puffer (pH 6,0) und eine Inkubation für 45 min bei 37 °C. Auf diese Weise konnte bei der Untersuchung von Zuckerproben eine untere Nachweisgrenze von ca. 25 COU (carry over units)/L ermittelt werden. Nach Angaben der Autoren ist dieses Testverfahren hochspezifisch für den Nachweis von α -Amylasen (Eggleston et al., 2013).

Eine weitere Forschungsgruppe beschäftigte sich mit dem Nachweis von maltogener Amylase in Brotproben. Im Focus des Interesses stand hier die Frage, ob aufgrund der Hitzestabilität der Amylase nach dem Backen eine Restaktivität im Produkt nachweisbar ist. Zur Klärung dieser Fragestellung wurde ein extrem aufwändiges und langwieriges Analyseprotokoll entwickelt, bei dem die Probe zunächst gefriergetrocknet, anschließend im Maltodextrin-haltigem Extraktionspuffer für 3 h inkubiert und nach Zentrifugation schließlich mittels PD-10 Säulen gereinigt wurde. Der Extrakt wurde dann in ein Nachweisverfahren der Firma Megazyme, bei dem ein speziell für den Nachweis von Exoamylasen entwickeltes Substrat verwendet wird, eingesetzt. Zur Erhöhung der Testempfindlichkeit erfolgte außerdem eine Verlängerung der Inkubationszeit auf 24 h. Bei der Analyse von Brot wurde eine Detektionsgrenze von ca. 2,4 pkat/g (entspricht ca. 0,1 mU/g) Probe angegeben (Reichenberger et al., 2020).

Das Problem der Verflüssigung von stärkehaltigen Lebensmitteln durch Amylase-Rückstände im Spurenbereich wurde auch von Koyama et al. (2013) thematisiert. Das von ihnen vorgestellte, arbeitsintensive Analyseverfahren mit hohem technischem Aufwand beinhaltet zunächst eine Probenextraktion für 30 min bei 40 °C, eine anschließende Aufreinigung durch Entsalzung und letztlich Isolierung der Amylasen mit Anionen-

Austauschchromatographie. Der gewonnene Extrakt wurde dann für 30 min bei Raumtemperatur mit Fluoreszenz-markierter Stärke inkubiert und die Spaltung des Substrats letztendlich mittels HPLC nachgewiesen. Als Modell-Lebensmittel wurde Stärkelösung mit 3 % Stärke und eine kommerzielle, stärkehaltige Curry-Präparation verwendet. Ein Nachweis bis zu 3 mU/ml (entspricht etwa 50 pkat/ml) Probenansatz war mit diesem Testverfahren möglich (Koyama et al., 2013).

III MATERIAL UND METHODEN

1 Material und Geräte

1.1 Chemikalien, Biochemika und Immunreagenzien

Aktivierte Meerrettich-Peroxidase (HRP)	Roche, 11 428 861 001
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich, A7030
Brilliantblau FCF (E133)	grebitex, Lebensmittelfarbe Hellblau
Briliantschwarz BN (E151)	grebitex, Lebensmittelfarbe Schwarz
Casein	Sigma-Aldrich, C8654
Cochenillerot A (E124)	grebitex, Lebensmittelfarbe Pink
Freundsches Adjuvans, inkomplett	Sigma-Aldrich, F5506
Gelborange S (E110)	grebitex, Lebensmittelfarbe Orange
Imject® mcKLH	Thermo Fisher SCIENTIFIC, 77600
Lösliche Stärke	Sigma-Aldrich, 85642
Maltodextrin (Dextrose-Äquivalent 13 – 17)	Sigma-Aldrich, 419680
Maltodextrin (Dextrose-Äquivalent 4 – 7)	Sigma-Aldrich, 419672
Natriumsulfat	Sigma-Aldrich, S1001
Polyclonal Rabbit anti-Mouse Ig-HRP	Dako, P0161
Polysucrose (Ficoll® PM 400)	Sigma-Aldrich, F4375
Protein A-Agarose	Sigma-Aldrich, P3476
Remazol-Brilliantblau	Sigma-Aldrich, R8001
StabilZyme® HRP Conjugate Stabilizer	SurModics, SZ02-1000
Thimerosal	Sigma-Aldrich, T5125
<u>Kommerzielle Amylase-Tests:</u>	
β-Amylase Assay Kit (Betamyl-3)	Megazyme, K-BETA3
Amylase SD Assay Kit	Megazyme, K-AMYLSSD
Phadebas® Amylase Test	Phadebas, 1301

Alle anderen, nicht eigens aufgeführten Reagenzien wurden in pro analysi-Qualität von der Firma Merck KGaA bezogen.

1.2 Lösungen und Puffer

Herstellung von Hapten-Konjugaten:

Aq. deion. mit Zusatz von 10 % (w/v) Natriumlaurylsulfat

Dinatriumhydrogenphosphat-Lösung (1 M)

Natriumphosphat-Lösung (0,6 M)

Herstellung von Antikörper-Enzym-Konjugaten:

Glycin-Lösung (1 M)	0,75 g Glycin auf 6 ml Aq. deion., mit 0,1 M NaOH auf pH 7 einstellen, mit Aq. deion. auf 10 ml auffüllen
Kopplungspuffer (10 mM; pH 8,0)	8,71 g K ₂ HPO ₄ auf 5 l Aq. deion. (Teil A), 1,36 g KH ₂ PO ₄ auf 1 l Aq. deion. (Teil B), Teil B zu Teil A bis zum pH 8,0 geben, Volumen des Puffers bestimmen, 50 mM NaCl zugeben
Natriumborhydrid-Lösung	8 mg NaBH ₄ auf 1 ml Aq. deion., frisch herstellen, auf Eis lagern
Natriumcarbonatpuffer (0,5 M; pH 9,5)	2,10 g NaHCO ₃ auf 50 ml Aq. deion. (Teil A), 2,65 g Na ₂ CO ₃ auf 50 ml Aq. deion., Teil A zu Teil B bis zum pH 9,5 geben
PBS/Glycin	PBS mit Zusatz von 10 mmol/l Glycin
Triethanolamin-Lösung	2,66 ml Triethanolamin zu 3 ml Aq. deion. geben, mit HCl (5 M) auf pH 8 einstellen, auf 10 ml mit Aq. deion. auffüllen

Enzymimmuntest (enzyme immunoassay, EIA):

Absättigungspuffer	PBS mit Zusatz von 3 % (w/v) Casein
Enzym-Konjugat-Verdünnungspuffer	PBS mit Zusatz von 1 % (w/v) Casein
Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS; pH 7,3)	6,79 g NaCl, 0,43 g KH ₂ PO ₄ , 1,47 g Na ₂ HPO ₄ , 1 l Aq. deion.
Schwefelsäure (1 M)	
Substrat/Chromogen-Lösung	20 Teile Substrat-Puffer, 1 Teil Tetramethylbenzidin-Lösung

Substrat-Puffer (pH 3,95)	44,13 g Citronensäure-Monohydrat, 200 ml 1 M KOH, 800 ml Aq. deion., Zugabe weiterer KOH bis pH 3,95 sowie 336 µl H ₂ O ₂
Tetramethylbenzidin-Lösung	252 mg 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin, 5 ml Aceton, 45 ml Methanol
Waschlösung	8,55 g NaCl, 0,25 ml Tween-20, 1 l Aq. deion.

Nachweis amyloytischer Enzyme:

CaCl ₂ -Malat-Puffer (pH 5,4)	134,1 g Äpfelsäure, 58,5 g NaCl, 70 g NaOH, Zugabe von 800 ml Aq. deion., Abkühlen auf Raumtemperatur, Zugabe von 4,4 g CaCl ₂ , mit NaOH (4 M) bzw. HCl (4 M) auf pH 5,4 einstellen, Zugabe von 0,9 g Natriumazid, auf 1 l mit Aq. deion. auffüllen, vor Einsatz im Verhältnis 1:20 (v/v) mit Aq. deion. verdünnen
CaCl ₂ -Tris-Puffer (pH 6,0)	13,23 g CaCl ₂ , 1,1 g Tris Base, 1 l Aq. deion., vor Einsatz im Verhältnis 1:100 (v/v) mit Aq. deion. verdünnen und mit 0,01 M HCl auf pH 6,0 einstellen
PBS (0,1 M; pH 6,0)	6,79 g NaCl, 3,7 g Na ₂ HPO ₄ , 11,9 g NaH ₂ PO ₄ , Zugabe von 800 ml Aq. deion., mit 1 M NaOH bzw. 1 M HCl auf pH 6,0 einstellen, auf 1 l mit Aq. deion. auffüllen

1.3 Amyloytische Enzyme

Enzym	Produktname	Produkt-Nr.	Ursprung⁴	Protein-Gehalt⁵
α -Amylase	BAN® 480L ¹	A7595	<i>B. amyloliquefaciens</i>	34 mg/ml ⁶
	Termamyl® 120L ¹	A3403	<i>B. licheniformis</i>	25 mg/ml ⁴
	Termamyl® 120L ²	-	-	31 mg/ml ⁶
	Termamyl® 300L ¹	A4862	<i>B. licheniformis</i>	49 mg/ml ⁴
	-	A1031 ¹	Speichel, human	90 mg/g ⁴
	-	A9857 ¹	<i>A. oryzae</i>	460 mg/g ⁴
	-	10069 ¹	<i>B. subtilis</i>	250 mg/g ⁶
	-	10080 ¹	Pankreas, Schwein	174 mg/g ⁶
β -Amylase	Secura® ²	-	-	59 mg/ml ⁶
Amylo-	AMG® 300L ²	-	-	93 mg/ml ⁶
glucosidase				
CGTase	Toruzyme® 3.0L ²	-	-	5 mg/ml ⁶
α -Glucosidase	-	E-TSAGS ³	<i>G. stearo-thermophilus</i>	19 mg/ml ⁴
Maltogene	Novamyl® 1000BG ¹	A2986	<i>Bacillus spp.</i>	20 mg/g ⁶
Amylase				
Pullulanase	Promozyme® D2 ¹	E2412	mikrobiell	7 mg/ml ⁶

¹ Bei Sigma-Aldrich verfügbare Enzym-Präparationen

² Von der Fa. Novozymes A/S dankenswerterweise zur Verfügung gestellt

³ Erworben von Megazyme

⁴ Herstellerangaben

⁵ Sofern nicht anders beschrieben, wurde der Protein-Gehalt gleich der Enzym-Konzentration gesetzt

⁶ Mit Bradford-Assay ermittelt

1.4 Geräte und Software

Datenanalyse-Software	Magellan® for F50 (Tecan)
Heizblock	Thermomixer® comfort (Eppendorf AG)
Mikrotiterplattenlesegerät	Infinite® F50 (Tecan)
Photometer	Specord® 200 Plus (Analytik Jena)
Zentrifuge	Biofuge® Pico (Heraeus)

1.5 Weitere Materialien

Amicon® Ultra-4 Filtereinheiten (3K)	Merck Millipore, UFC800324
Amicon® Ultra-4 Filtereinheiten (30K)	Merck Millipore, UFC803024
CELLLine Classic bioreactor flask	Sigma-Aldrich, Z688029
Cellstar® Tubes (15 ml)	Greiner Bio-One, 188271
Mikrotiterplatten: F96 Nunc-Immuno®	Thermo Fisher SCIENTIFIC, 439454
ReadyLyzer 0,8, MWCO 1 kDa	SERVA, 44622.01
Safe-Lock Tubes 1,5 ml	Eppendorf AG, 0030120.086
Safe-Lock Tubes 2 ml	Eppendorf AG, 0030120.094
VISKING® dialysis tubing	SERVA, 44110.04

2 Methodik

2.1 Überprüfung kommerzieller Amylase-Nachweisverfahren

Als Referenzverfahren zum Nachweis amyloytischer Aktivitäten wurden zwei kommerzielle Tests, nämlich der Phadebas® Amylase Test und der alpha-Amylase-Assay (Amylase SD Method) der Firma Megazyme, überprüft und optimiert. Dabei wurden jeweils Testansätze sowohl mit zugesetzter α -Amylase (Termamyl® 300L), als auch ohne Amylase-Zusatz untersucht. Letztere dienten als Negativkontrollen, deren Messwerte von denen der amylasehaltigen Ansätze subtrahiert wurden. Um die Reproduzierbarkeit beurteilen zu können, wurden alle Tests mindestens dreimal an verschiedenen Tagen wiederholt.

Analog zu dem vom Hersteller empfohlenen Verfahren wurden beim Phadebas® Amylase Test (Phadebas AB, 2018) 0,2 ml der Probe in 4 ml Aq. deion. verdünnt (Proben-Puffer Verhältnis 1:21). Nach einer Vorinkubation für 5 min bei 37 °C wurde das Substrat (in Form einer Tablette) zugegeben und für weitere 15 min bei 37 °C inkubiert. Das Stoppen der Reaktion erfolgte durch Zugabe von 1 ml 0,5 M Natronlauge. Im Anschluss wurde der Ansatz zentrifugiert (5 min bei 1500 x g) und die Absorption des Überstandes bei 620 nm bestimmt. Dazu wurde zur einfacheren Handhabung 0,2 ml des Überstandes in eine Kavität einer Mikrotiterplatte überführt und mittels Mikrotiterplattenlesegeräts analysiert.

Zur Überprüfung des Amylase SD Tests der Firma Megazyme wurde initial die zu untersuchende Probe im Verhältnis 1:5 (w/w) im mitgelieferten CaCl₂-Malat-Puffer (pH 5,4) verdünnt. Wie im Herstellerprotokoll beschrieben (Megazyme, 2019), wurden nach Erwärmung (5 min bei 40 °C) 0,4 ml der verdünnten Probe zu 0,1 ml Substrat-Lösung (Ammylase SD Reagenz) gegeben und anschließend für 10 min bei 40 °C inkubiert. Durch Hinzufügen von 1 ml des im Testkit enthaltenen Stoppreagenzes (Natriumphosphat-Lösung; 0,06 M; pH 11,0) wurde die Reaktion beendet. Im Anschluss an die Überführung von 0,2 ml des Ansatzes in eine Kavität einer Mikrotiterplatte wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 405 nm im Mikrotiterplattenlesegerät bestimmt.

Zur Optimierung der Verfahren und Anpassung an die zu untersuchenden Probenmatrices wurde der Testablauf der beiden kommerziellen Tests im Rahmen der vorliegenden Arbeit modifiziert. Überprüft wurden insbesondere Variationen der Inkubationstemperatur (22 – 60 °C) und -dauer (30 – 120 min) sowie unterschiedliche Proben-Puffer-Verhältnisse. Bei diesen Untersuchungen wurde die als Modellenzym eingesetzte Amylase (Termamyl® 300L) in konstanter Konzentration eingesetzt und jeweils nur ein Testparameter variiert. Der Phadebas® Amylase Test wurde außerdem dahingehend verändert, dass die zu untersuchende Probe nicht in Aq. deion., sondern in CaCl₂-Tris-Puffer verdünnt wurde. Anschließend erfolgte die Überprüfung der Nachweisempfindlichkeit der optimierten Ansätze im Vergleich zum herkömmlichen Testverfahren, indem Standardkurven mit variablen Enzym-Konzentrationen generiert wurden. Die Nachweigrenze (NWG) wurde definiert als: NWG = A₀ + 3 x SD_A. Dabei ist A₀ der Absorptionswert eines enzymfreien Kontrollansatzes und SD_A die Standardabweichung des Kontrollansatzes.

Nach Optimierung der Testparameter wurden die beiden modifizierten Testverfahren hinsichtlich ihrer Einsetzbarkeit für die Bestimmung von Amylase-Aktivitäten in Rohstoffen bzw. Milchprodukten überprüft. Dazu wurden die jeweiligen Probenmatrices mit Termamyl® 300L künstlich kontaminiert. Als Vergleichskontrolle dienten Ansätze mit nativem Probenmaterial ohne Amylase-Zusatz. Weitere Kontrollansätze dienten dazu, die Probenbedingte Trübung der Ansätze auf das Messergebnis zu verifizieren. Dazu wurde die Probe erst nach dem Stoppen zum Testansatz zugegeben. Beim modifizierten Megazyme-Nachweisverfahren wurde die verdünnte Probe, in Anlehnung an das im Herstellerprotokoll beschriebene Extraktionsverfahren, für 3 min bei 11000 x g zentrifugiert und der Überstand für die weitere Untersuchung verwendet (Megazyme, 2019).

2.2 Verflüssigung stärkehaltiger Milchprodukte

In orientierenden Modellversuchen wurden stärkehaltige Milcherzeugnisse (Fruchtjoghurts und Puddings mit intakter Textur) mit diversen stärkeabbauenden Enzymen (α - bzw. β -Amylasen, Amyloglucosidase, CGTase, α -Glucosidase, maltogene Amylase und Pullulanase) künstlich kontaminiert. Die jeweiligen Präparationen wurden dazu in sterilem PBS vorverdünnt und anschließend serielle Verdünnungsreihen (1:10) unter sterilen Bedingungen im Verhältnis 1:20 (v/v) zum unauffälligen Produkt gegeben. Die Enzym-Konzentrationen im kontaminierten Produkt lagen dabei im Bereich von 10 pg – 100 μ g Enzym/g.

Auch zugesandte Proben aktueller Verdachtsfälle wurden auf ähnliche Weise untersucht, um unabhängig von der Verfügbarkeit/Anwendbarkeit Enzym-spezifischer Analyseverfahren eine Kontamination der Probe mit amylolytischen Enzymen nachweisen zu können. Die Zugabe von bereits verflüssigten Endprodukten bzw. Rohstoffen betroffener Chargen (Aroma und Glukose-Fructose-Sirups) zu unauffälligen Kontrollprodukten erfolgte zunächst ohne vorherige Verdünnung im Volumen-Verhältnis 1:5. Trat eine Verflüssigung in diesem Vortest auf, wurde das entsprechende Produkt nach adäquater Verdünnung erneut eingesetzt. Zur Überprüfung des Einflusses der Inkubationstemperatur wurden parallel identische Testansätze bei Raumtemperatur, 37 °C, sowie 60 °C inkubiert. Als Kontrollansatz diente ein lediglich mit Verdünnungspuffer versetzter Testansatz. Die visuelle Beurteilung auf Verflüssigung erfolgte zu festgelegten Zeitpunkten jeweils nach Abkühlung der Ansätze auf Raumtemperatur.

2.3 Herstellung von Hapten-Konjugaten

2.3.1 Markierung von Mehrfachzuckern

Zur Herstellung von Enzymsubstraten wurde in Anlehnung an das Verfahren von Rinderknecht et al. (1967) lösliche Stärke, langketiges [Dextrose-Äquivalent 4 – 7; (l)-Mdx] sowie kurzkettiges [Dextrose-Äquivalent 13 – 17; (s)-Mdx] Maltodextrin in unterschiedlichen Kopplungsdichten mehrfach mit RBB markiert. Dazu wurden 500 μ l der in Aq. deion. gelösten Mehrfachzucker (100 mg/ml) auf 50 °C erwärmt und mit 500 μ l RBB-Lösung versetzt. Der Farbstoff wurde zu diesem Zweck in Aq. deion. gelöst, wobei die RBB-Konzentrationen zwischen 2,5 und 10 mg/ml lagen. Letztlich wurden Kopplungsansätze mit Gewichtsverhältnissen von 1:10, 1:13,3, 1:20 und 1:40 [RBB:Stärke(derivat)] generiert. Zu den Ansätzen wurden über einen Zeitraum von 45 min 0,1 g Natriumsulfat in mehreren Portionen zugegeben, die Temperatur lag dabei weiterhin bei 50 °C. Im Anschluss wurden

50 µl Natriumphosphat-Lösung (0,6 M) zugefügt und für weitere 75 min bei 50 °C inkubiert. Auf ähnliche Weise erfolgte auch die Markierung des synthetischen Polysaccharids Polysucrose, auch bekannt unter dem Namen Ficoll® PM 400. Dabei lag das Gewichtsverhältnis von RBB zu Polysucrose im Kopplungsansatz bei 1:10.

Alle Ansätze wurden nach der Kopplung zur Entfernung von möglichen Farbstoffüberschüssen dialysiert bzw. ultrafiltriert. Das jeweils eingesetzte Verfahren orientierte sich dabei an der mittleren Molekülgröße des verwendeten Mehrfachzuckers. Die Kopplungsansätze, bei denen lösliche Stärke bzw. Polysucrose verwendet worden waren, wurden in einem Dialyseschlauch mit einer Ausschlussgrenze (molecular weight cut-off, MWCO) von 12 – 14 kDa gegen 3 x 5 l PBS dialysiert. Markiertes (I)-Mdx wurde dagegen mittels Amicon® Ultra-4 Filtereinheiten (MWCO 3 kDa) nach Herstellerprotokoll vom ungebundenen RBB getrennt. Die Dialyse der Ansätze mit (s)-Mdx erfolgte mit Hilfe des Dialysesystems ReadyLyzer 0,8 (MWCO 1 kDa) gegen 3 x 1,2 l PBS. Nach Portionierung der Konjugate wurden Aliquote bei -20 °C bzw. 4 °C gelagert. Außerdem erfolgte eine photometrische Überprüfung der Kopplungseffizienz, wobei eine Spektralanalyse im Bereich 200 – 800 nm durchgeführt wurde.

2.3.2 Markierung von Proteinen

Um die Generierung von monoklonalen Antikörpern (mAk) zu ermöglichen, wurde Hämocyanin der Schlüsselloch-Schnecke (keyhole limpet hemocyanin, KLH) mit RBB markiert. Die Markierung erfolgte dabei ähnlich dem von Compton et al. (2002) vorgestellten Verfahren. Dazu wurden 10 mg RBB in 1 ml Aq. deion. mit Zusatz von 10 % (w/v) Natriumlaurylsulfat gelöst. Ein Teil der RBB-Lösung (40 µl) wurde anschließend mit 200 µl in PBS gelöstem Protein (10 mg/ml) und 50 µl Dinatriumhydrogenphosphat-Lösung (1 M) versetzt. Nach 20-minütiger Inkubation bei 65 °C erfolgte die Dialyse mit Hilfe eines Dialyseschlauchs (MWCO 12 – 14 kDa) gegen 3 x 5 l PBS. Das RBB-KLH-Konjugat wurde nach Portionierung bei -20 °C gelagert.

2.4 Generierung von monoklonalen Antikörpern (mAk)

Zur Generierung RBB-spezifischer, monoklonaler Antikörper wurde die Hybridomtechnik genutzt, bei der Antikörper bildende B-Zellen mit immortalen Myelomzellen fusioniert werden. Zur Immunisierung von 4 weiblichen Mäusen eines Hybrid-Stamms aus BALB/c x (NZB x NZW) wurde das oben beschriebene RBB-KLH-Konjugat verwendet, das Immunogen wurden hierbei im Verhältnis (v/v) 1:2 mit Adjuvans emulgiert und anschließend intraperitoneal (i.p.) bzw. subkutan (s.c.) appliziert. Die letzte Restimulierung

3 d vor der Fusion erfolgte ohne Zugabe des Adjuvans. Details zum Immunisierungsschema sind in Tabelle 5 zusammengefasst, Restimulierungen und Blutentnahmen erfolgten jeweils im Abstand von mehreren Wochen. Die erforderlichen Eingriffe und Behandlungen an Tieren wurden der Regierung von Oberbayern gemäß §10a des Tierschutzgesetzes angezeigt und unter dem Aktenzeichen 55.2-1-54-2532.0-47-2015 genehmigt.

Tabelle 5: Immunisierung von Mäusen mit RBB-KLH-Konjugaten

Woche	Maßnahme	Konzentration (µg/Tier)	Adjuvans/ Puffer	Appli- kation
0	Grundimmunisierung	35	I.F.A. ¹ /PBS	i.p.
11	Blutentnahme			
15	Restimulierung	25	I.F.A. ¹ /PBS	i.p.
20	Blutentnahme			
22	Restimulierung (Maus I) Fusion (Maus I)	35	--/PBS	i.p.
37	Restimulierung	20	I.F.A. ¹ /PBS	s.c.
42	Restimulierung (Maus II) Fusion (Maus II)	30	--/PBS	i.p./s.c.

¹ Inkomplettes Freundsches Adjuvans

Nach Überprüfung des Immunisierungsverlaufs und vorläufiger Charakterisierung der Antiseren mit geeigneten EIA-Verfahren erfolgte die Auswahl vielversprechender Tiere. Von diesen Mäusen wurde lymphoretikuläres Gewebe (axilläre Lymphknoten sowie Milzgewebe) unter sterilen Bedingungen entnommen und durch Zusatz von Polyethylenglykol 1500 mit murinen Myelomzellen der Zelllinie X63-Ag8.653 fusioniert. Die Kultivierung der auf diese Weise erzeugten Hybridomzellen erfolgte für 10 d bei 37 °C im Begasungsbrutschrank (CO₂ 7 %). Dazu wurden die Zellen in Zellkulturmedium aufgenommen und auf mit murinen Peritonealmakrophagen beschichteten Mikrotiterplatten ausgesät. Zum Nachweis RBB-spezifischer Antikörper wurden die Zellkulturüberstände der Kavitäten nach 10 d mittels indirekter EIA-Verfahren (III.2.6) auf RBB-spezifische Antikörper überprüft. Zelllinien mit den gewünschten Eigenschaften wurden selektiert und im weiteren Verlauf mittels dreimaliger Endpunktverdünnung kloniert und vermehrt. Nach vorläufiger Charakterisierung der gebildeten Antikörper mit indirekten EIAs, wurden vielversprechende Klone im Bioreaktor (CELLLine™ CL 1.000) massenproduziert und affinitätschromatographisch mittels Protein A gereinigt.

2.5 Herstellung von Antikörper-Enzym-Konjugaten

Zur Kopplung von Meerrettich-Peroxidase (horseradish peroxidase, HRP) an gereinigte RBB-spezifische mAk wurden 1,6 mg des aktivierte Enzyms in 0,1 ml Aq. deion. gelöst und zu 0,3 ml in Kopplungspuffer gelöstem Antikörper (4 mg/ml) gegeben. Der Ansatz wurde anschließend mit Hilfe von Natriumcarbonatpuffer auf einen pH-Wert von 8,5 eingestellt und für 2 h lichtgeschützt bei Raumtemperatur und unter leichtem Rühren inkubiert. Nach Zusatz von 40 µl Triethanolamin-Lösung und 50 µl Natriumborhydrid-Lösung erfolgte eine Inkubation für 30 min bei 4 °C. Danach wurde der Ansatz erneut mit Triethanolamin-Lösung (25 µl) versetzt und für weitere 2 h bei 4 °C inkubiert. Abschließend erfolgte die Zugabe von 10 µl Glycin-Lösung, und die Dialyse (MWCO 12 – 14 kDa) des Ansatzes gegen 3 x 5 l PBS/Glycin. Die markierten Antikörper wurden durch Zugabe von BSA (1 %), StabilZyme (1:2; v/v) und Thimerosal (0,01%) stabilisiert bzw. konserviert und nach Portionierung bei -80 °C bzw. 4 °C gelagert.

2.6 Indirekte Enzymimmuntests (EIAs) zur Charakterisierung der mAk

Die generierten, gegen RBB gerichteten Antikörper wurden mittels indirekter EIAs genauer charakterisiert, um die Einsetzbarkeit im avisierten Sandwich-EIA-System einschätzen zu können. Dazu wurden Mikrotiterplatten mit in PBS verdünnten RBB-markierten Mehrfachzuckern beschichtet (100 µl/Kavität). Nach Inkubation über Nacht, wurden die Platten entleert und mit 3 % Casein/PBS Lösung für 30 min abgesättigt (150 µl/Well). Die Platten wurden dann dreimal mit Waschlösung gespült und anschließend durch Ausschlagen auf einen Zellstoffstapel getrocknet (Waschschnitt). Es folgte die Zugabe der RBB-spezifischen mAk (100 µl/Kavität) entweder in Form von Zellkulturüberständen oder als gereinigte Antikörper. Je nach Fragestellung wurden hierbei die Antikörper-haltigen Lösungen als Verdünnungsreihe oder in definierter Verdünnung/Konzentration eingesetzt. Nach Inkubation für 1 h folgte wiederum ein Waschschnitt (4-mal). Der Nachweis gebundener Antikörper erfolgte durch Zugabe (100 µl/Kavität) von HRP-markierten Sekundärantikörpern [Polyclonal Rabbit anti-Mouse Ig-HRP; 1:2000 verdünnt in 1 % Casein/PBS Lösung (v/v)]. Nach einstündiger Inkubation und einem erneuten Waschschnitt (5-mal) wurde Enzymsubstrat/Chromogen-Lösung (100 µl/Kavität) zugegeben. Nach 20 min wurde die Farbreaktion durch Zugabe von Schwefelsäure (1 M; 100 µl/Kavität) gestoppt. Die Farbintensität wurde schließlich durch Messung der Absorption im Mikrotiterplattenlesegerät bei 450 nm ermittelt. Alle Inkubationen fanden bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer statt.

Zur Bestimmung der relativen Affinität der Antikörper wurden Mikrotiterplatten seriell (1:2

Schritte) mit in PBS verdünnten RBB-Mehrfachzuckern beschichtet und mit den in konstanten Konzentrationen (5 µg/ml) eingesetzten Primärantikörper beprobt. Die Untersuchung der Antikörper-Robustheit, hinsichtlich Ionen-Stärke, pH-Wert und NaCl-Konzentration, erfolgte durch Veränderung der Pufferzusammensetzung. Dazu wurde der zu untersuchende Antikörper seriell (1:2 Schritte) in den jeweiligen Puffern verdünnt und auf die mit RBB-Konjugat in konstanten Konzentrationen (200 ng/ml) beschichtete Platte gegeben.

Die Kreuzreakтивität der Antikörper wurde mit diversen Lebensmittelfarbstoffen überprüft, deren Molekülstruktur ähnlich wie RBB Sulfonatgruppen aufweist. Für die Generierung von Standardkurven wurden RBB-Konjugat und Antikörper in mittels Hemmtitration bestimmten, optimalen Konzentrationen eingesetzt. Nach Beschichtung der Platten mit RBB-(I)-Mdx (Kopplungsverhältnis 1:10) in konstanter Konzentration (60 ng/ml), erfolgte bei dieser kompetitiven EIA-Form der Auftrag der zu untersuchenden Farbstoffe zeitgleich mit dem der Primärantikörper. Dazu wurden Verdünnungsreihen (1:2 Schritte in PBS; Ausgangskonzentration 100 µg/ml) der Farbstoffe angefertigt und anschließend im Verhältnis 1:2 (v/v) mit den in PBS verdünnten Antikörpern (Antikörper-Konzentration: mAk 2C7 40 ng/ml; mAk 3B5 25 ng/ml) versetzt. Der weitere Testablauf erfolgte wie oben beschrieben. Nach Ermittlung der mittleren inhibitorischen Konzentrationen (half maximal inhibitory concentration, IC₅₀) wurde mit nachfolgender Formel die relative Kreuzreaktion zu RBB berechnet:

$$[50\text{ }%-{\text{Wert}}\text{ (RBB)} \div 50\text{ }%-{\text{Wert}}\text{ (jeweiliger getesteter Farbstoff)}] \times 100$$

2.7 Sandwich-EIA

Zum Nachweis RBB-markierter Substrate (III.2.3.1) wurden Mikrotiterplatten über Nacht mit in PBS verdünnten, RBB-spezifischen Antikörpern in den durch Schachbretttitration ermittelten, optimalen Konzentrationen (mAk 2C7 10 µg/ml; mAk 3B5 1,5 µg/ml) beschichtet (100 µl/Kavität). Anschließend wurden die Platten mit 3 % Casein/PBS Lösung für 30 min abgesättigt (150 µl/Kavität), und danach mit in PBS verdünnten RBB-Mehrfachzuckern beschickt (100 µl/Kavität). Zudem wurde in mehrere Kavitäten lediglich PBS pipettiert (100 µl), diese dienten als antigenfreie Kontrollansätze. Im Anschluss an eine einstündige Inkubation erfolgte der Auftrag von in 1 % Casein/PBS Lösung (v/v) verdünntem, RBB-spezifischem Antikörper-HRP-Konjugat (1 µg/ml; 100 µl/Kavität). Waschschrifte sowie das weitere Vorgehen erfolgten analog zu dem bei den indirekten EIAs beschriebenen Verfahren (III.2.6). Mit den Sandwich-EIAs wurden von allen unter III.2.3.1 beschriebenen RBB-Mehrfachzucker-Konjugaten Standardkurven erstellt, wobei neben den

oben beschriebenen EIA-Varianten, bei denen jeweils der gleiche mAk im EIA als Beschichtungs- und als Detektionsantikörper fungierte, auch EIAs basierend auf Kombinationen der verschiedenen Antikörper überprüft wurden.

2.8 Nachweis amylolytischer Enzym-Aktivitäten

De facto soll mit dem angestrebten Nachweissystem der Abbau der als Enzymsubstrat eingesetzten, mit RBB markierten Stärke(derivate) durch amylolytische Enzyme nachgewiesen werden. Der Nachweis des Abbaus erfolgte nach Vorinkubation der RBB-Mehrfachzucker mit (enzymhaltigem) Probenmaterial. Kommt es durch amylolytische Enzyme zu einer Spaltung der markierten Mehrfachzucker, können dann im Sandwich-EIA an die entstandenen Bruchstücke nur noch wenige oder keine Detektionsantikörper mehr binden, das Testsignal nimmt deutlich ab.

Zur Überprüfung der Realisierbarkeit (proof of principle) wurde die Amylase-Präparation Termamyl® 300L seriell in 1:3 Schritten in PBS (mit Zusatz von 0,1 % BSA) verdünnt und im Verhältnis 1:2 (v/v) zu den RBB-Mehrfachzuckern (500 ng/ml PBS mit Zusatz von 0,1 % BSA) gegeben. Bei amylasefreien Kontrollansätzen wurde im gleichen Verhältnis lediglich PBS (mit 0,1 % BSA) zum markierten Mehrfachzucker hinzugefügt. Während des direkt anschließenden Vorverdaus wurden die Ansätze für 2 h bei 60 °C inkubiert. Unmittelbar danach erfolgte der Einsatz im oben beschriebenen Sandwich-EIA-System. Dazu wurden, nach adäquater Verdünnung in PBS, die inkubierten Ansätze in Form von Duplikaten auf die Platte gegeben. Nach Beendigung des Tests wurden zur Bewertung der Amylase-Aktivität die relativen Absorptionen im Verhältnis zur Absorption der amylasefreien Kontrollansätze berechnet.

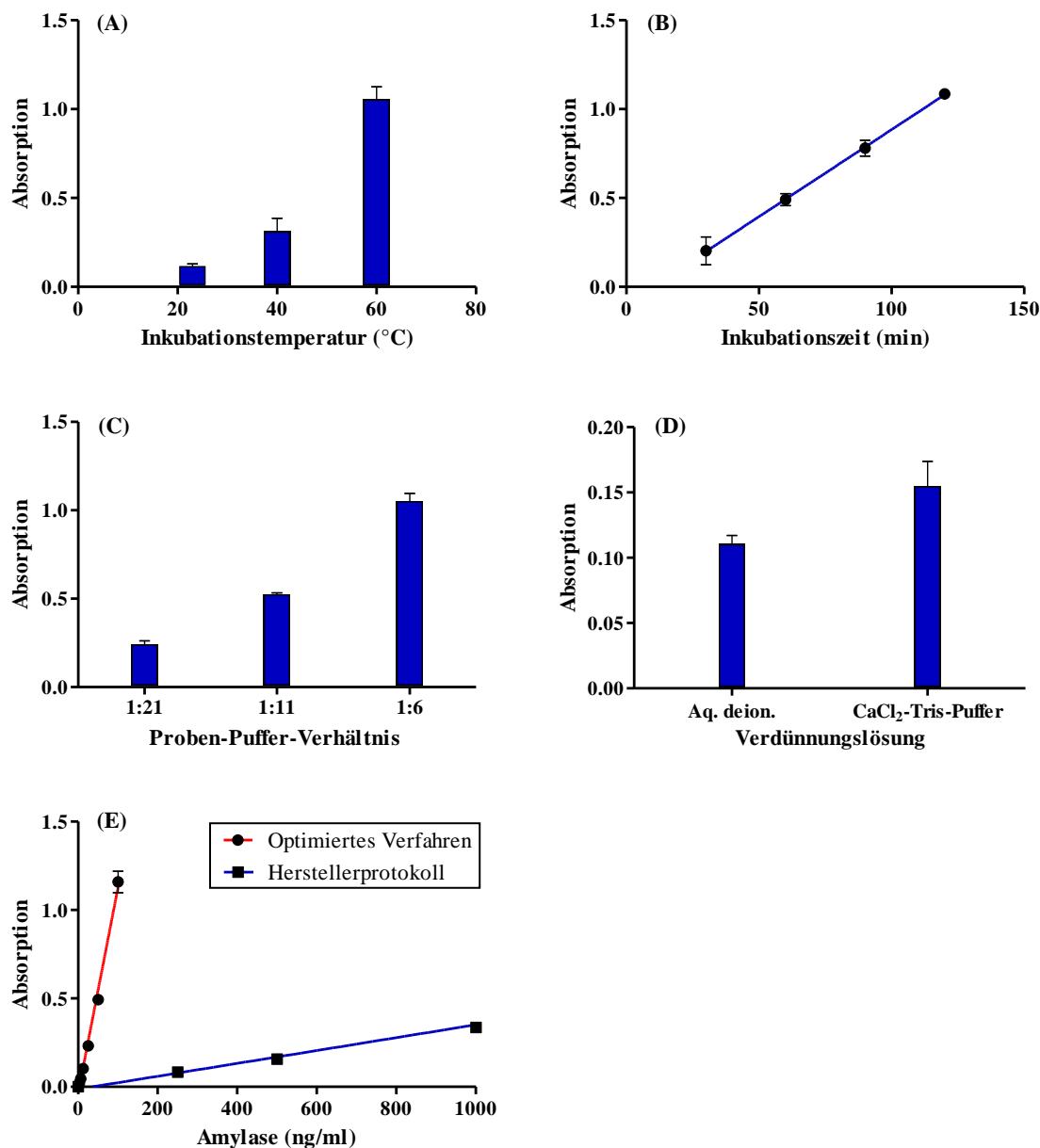
Anschließend wurden verschiedene Testparameter modifiziert (IV.5.3), um eine Steigerung der Nachweisempfindlichkeit zu überprüfen. Letztendlich wurde beim optimierten Testverfahren die zu untersuchende Probe in CaCl₂-Malat-Puffer (50 mM; pH 5,4) mit Zusatz von 0,1 % BSA verdünnt. Als Substrat wurde das unter IV.3.1 beschriebene, im Verhältnis 1:40 mit RBB markierte, langkettige Maltodextrin in einer Konzentration von 1 µg/ml eingesetzt. Die Inkubation erfolgte bei 60 °C für 2 bzw. 18 h. Die vorverdauten Testansätze wurde dann mittels auf mAk 2C7 basierendem Sandwich-EIA (IV.4) analysiert.

IV ERGEBNISSE

1 Optimierung und Anwendbarkeit kommerzieller Amylase-Tests

Die von den Herstellern vorgeschlagenen Einsatzgebiete der jeweiligen kommerziellen Amylase-Tests beschränken sich meist auf Produkte/Proben pflanzlichen (Mehl) bzw. tierischen/menschlichen Ursprungs (Honig, Blut, Urin). Die dabei nachgewiesenen, eukaryotischen Amylasen unterscheiden sich allerdings in wesentlichen Punkten (Temperatur-, pH-Optimum, Hitzestabilität) von den für die vorliegende Arbeit relevanten, prokaryotischen Präparationen. Daher wurde zunächst überprüft, inwiefern sich im Handel erhältliche Testverfahren eignen, (prokaryotische) Amylase-Aktivitäten sensitiv in Milchprodukten bzw. deren Rohwaren nachzuweisen. Zur Steigerung der Testempfindlichkeit dieser Verfahren wurden zudem einige wesentliche Testparameter modifiziert.

Bei Modifikation des Phadebas[®] Amylase Tests zeigte sich, dass eine Erhöhung der Inkubationstemperatur eine deutliche Steigerung der Amylase-Aktivität zur Folge hat. Im Vergleich zur Inkubation bei 22 °C wurden bei 60 °C in etwa 8-fach höhere Absorptionswerte erreicht (Abb. 2 A). Auch eine verlängerte Inkubationszeit führte zu erhöhten Messwerten, so war nach 2 h die Absorption um ca. Faktor 5 höher als nach 30 min (Abb. 2 B). Wurde das Proben-Puffer-Verhältnis zugunsten der Probe verändert, nahmen die gemessenen Absorptionen ebenfalls zu (Abb. 2 C). Außerdem erhöhte sich durch die alternative Verwendung von CaCl₂-Tris-Puffer die Aktivität der getesteten Amylase im Vergleich zum Ansatz mit Aq. deion. um etwa 40 % (Abb. 2 D). Die Testdurchführung des optimierten Verfahrens beinhaltete somit eine Probenverdünnung im Verhältnis 1:6 (w/w) in CaCl₂-Tris-Puffer sowie eine anschließende Inkubation von Testsubstrat und verdünnter Probe für 2 h bei 60 °C. Verglichen mit der Herstellerprozedur konnte auf diese Weise die Nachweisgrenze der α -Amylase-Präparation Termamyl[®] 300L etwa 31-fach auf 6 ng Enzym/ml gesenkt werden (Abb. 2 E).

**Abbildung 2:**

Optimierung des Phadebas[®] Amylase Tests. Überprüft wurde der Einfluss (A) der Inkubationstemperatur, (B) der Inkubationszeit, (C) des Proben-Puffer-Verhältnisses sowie (D) verschiedener Verdünnungslösungen. Dargestellt sind die Absorptionswerte, die bei Analyse einer α -Amylase-Präparation [122 ng/ml bei (A), (B) und (C) bzw. 8 ng/ml bei (D)] erhalten wurden. (E) Vergleich der Nachweisempfindlichkeit des modifizierten Verfahrens mit dem vom Hersteller vorgeschlagenen Protokoll.

Ähnliche Ergebnisse wurden auch bei Veränderung der Parameter des alpha-Amylase-Assays (Amylase SD Method) der Firma Megazyme beobachtet. Die in Abbildung 3 unter (A) dargestellten Ergebnisse zeigen eine Zunahme der Amylase-Aktivität um Faktor 5 bei Erhöhung der Inkubationstemperatur von 22 °C auf 60 °C. Durch Verlängerung der Inkubationszeit von 30 min auf 120 min wurde zudem eine 6-fache Steigerung der Messwerte festgestellt (Abb. 3 B). Außerdem stiegen, ähnlich wie beim Phadebas-Test, die gemessenen Absorptionen mit zunehmenden Probenanteil an (Abb. 3 C). Aufgrund dieser Resultate wurden beim optimierten Testverfahren die Proben im Verhältnis 1:3 (w/w) verdünnt und nach Substratzugabe für 2 h bei 60 °C inkubiert. Mit diesen Modifikationen konnte die Nachweisgrenze für Termamyl® 300L im Vergleich zur Standardmethode etwa 27-fach auf 3 ng Enzym/ml gesenkt werden (Abb. 3 D).

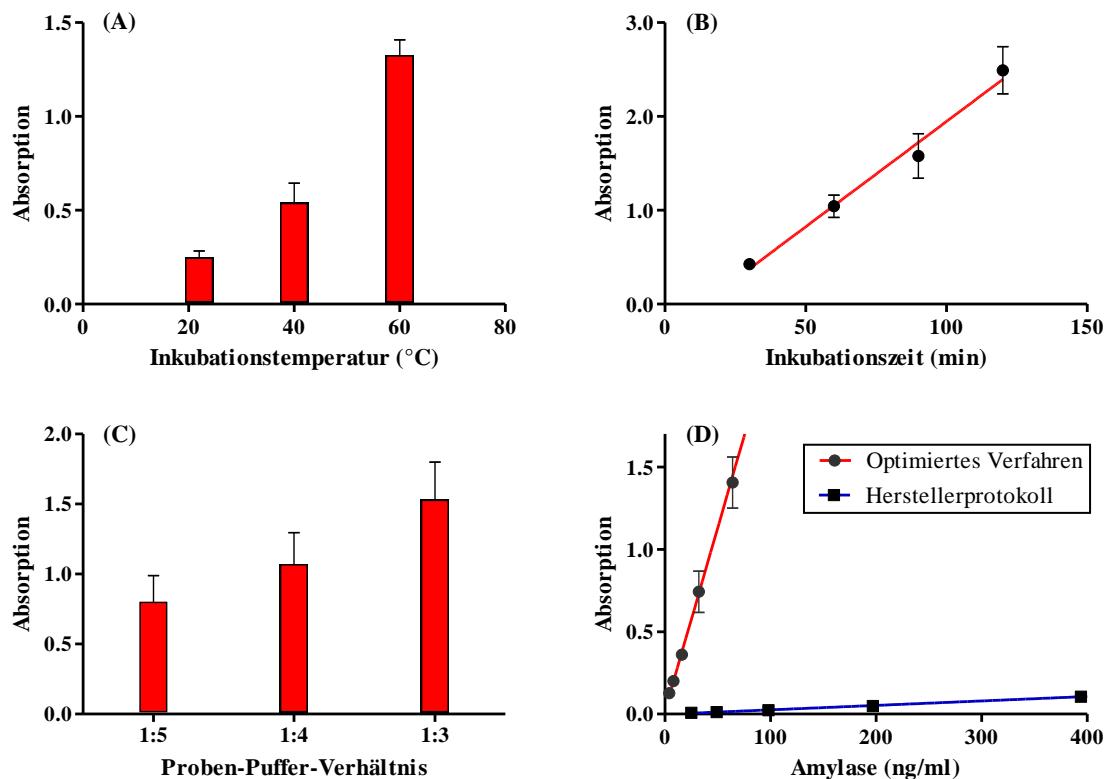


Abbildung 3: Optimierung des Megazyme-Tests. Überprüft wurde der Effekt (A) der Inkubationstemperatur, (B) der Inkubationszeit und (C) des Proben-Puffer-Verhältnisses auf die im Test erreichte Absorption. Dabei wurde die Amylase in konstanten Konzentrationen eingesetzt [200 ng/ml bei (A) und (C) bzw. 122 ng/ml bei (B)]. Die Gegenüberstellung der optimierten Prozedur mit dem Verfahren nach Herstellerprotokoll und ist unter (D) dargestellt.

Um die erhaltenen Werte in Relation zu anderen in der Literatur beschriebenen Testverfahren setzen zu können, wurden zudem die relativen Aktivitäts-Äquivalente berechnet. Als Bezugsgröße diente der Enzym-Gehalt (49 mg/ml) sowie die mit dem Standardverfahren des Phadebas-Tests ermittelte Amylase-Aktivität (20 kU/ml) der α -Amylase-Präparation Termamyl® 300L. Bei entsprechender Umrechnung und unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors entsprachen die Nachweisgrenzen des modifizierten Phadebas- bzw. Megazyme-Tests in etwa 2,4 bzw. 1,2 mU/ml. Dies entspricht wiederum 40 bzw. 20 pkat/ml.

Die beiden optimierten Testverfahren wurden anschließend auf ihre Anwendbarkeit bei komplexen Probenmatrices überprüft. Hierbei wurden Amylase-Konzentrationen (8 ng/g) eingesetzt, die um Faktor 1,33 (Phadebas-Test) bzw. 2,66 (Megazyme-Test) höher als die Nachweisgrenze des jeweiligen Tests lagen. In der Regel war bei fast allen Proben aufgrund eines ausgeprägten Probenmatrix-Effekts keine eindeutige Unterscheidung von Ansätzen mit und ohne Amylase-Zusatz möglich. Nur bei Einsatz von Glukose-Sirup bzw. raffiniertem Zucker konnten eindeutig amylasehaltige von amylasefreien Proben unterschieden werden (Abb. 4). Dabei lag die Absorption der Ansätze mit Amylase-Zusatz, abzüglich den Messwerten der Kontrollansätze, bei ca. 0,1 (Phadebas-Test) bzw. ca. 0,2 (Megazyme-Assay). Testansätze mit den Probenmatrices Fruchtjoghurt, Fruchtzubereitung, H-Milch (1,5 % Fett) bzw. Pudding wiesen eine starke Proben-bedingte Eigenfärbung bzw. Trübung auf. Besonders ausgeprägt war dies im Phadebas-Test bei Einsatz von Fruchtjoghurt bzw. Pudding, im Megazyme-Test hingegen zeigten Ansätze mit H-Milch die stärkste Trübung (Abb. 4). Bedingt durch diese starke Trübung konnten amylasehaltige von amylasefreien Proben i.d.R. nicht unterschieden werden. Die Ausnahme bildete hierbei eine Fruchtzubereitung, bei der mittels Megazyme-Assay eine entsprechende Differenzierung möglich war. Trübungs-bedingte Probleme traten bei den untersuchten Aroma-Präparationen hingegen nicht auf, Probenmatrix-bedingt (Zusatz von Ethanol) konnten aber auch im einem kontaminierten Apfel-Aroma keine Amylase-Aktivitäten nachgewiesen werden. Im Vanille-Aroma (auf Propylenglykol-Basis) führte die zugesetzte Amylase hingegen tendenziell zu erhöhten Messwerten (Abb. 4). Unter Berücksichtigung der Absorption der amylasefreien Ansätze wurden dabei Werte um 0,1 erreicht. Auffällig war, dass mit Hilfe des Megazyme-Tests aber auch im nicht künstlich kontaminierten Vanille-Aroma, Enzym-Aktivität nachweisbar war. Im Phadebas-Test konnte dies nicht festgestellt werden (Abb. 4).

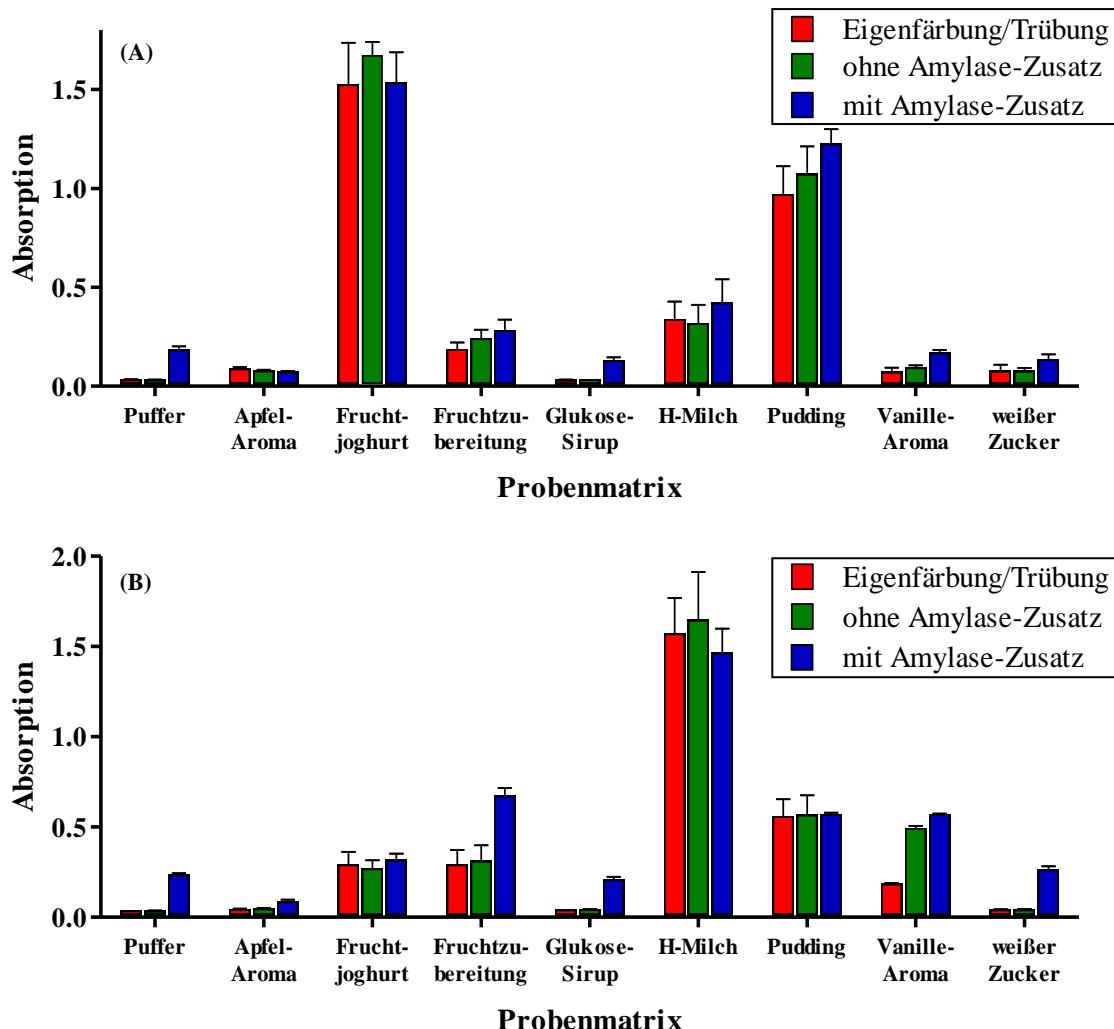


Abbildung 4: Analyse von künstlich kontaminierten Proben mit optimierten, kommerziellen Nachweisverfahren: (A) Phadebas- bzw. (B) Megazyme-Test. Dazu wurden den Probenmatrices 8 ng α -Amylase/g zugesetzt. Zur Überprüfung der Proben-eigenen Amylase-Aktivität wurde natives Probenmaterial eingesetzt. Die Beurteilung der Eigenfärbung bzw. Trübung basiert auf Ansätzen, bei denen Probenmaterial erst nach dem Stoppen der Enzym-Reaktion zu den Ansätzen gegeben wurde.

2 Modellversuche zur Produktverflüssigung

Durch künstliche Kontamination von unauffälligem, stärkehaltigem Joghurt bzw. Pudding mit Enzym-Gehalten von 10 pg/g – 100 µg/g sollten die Enzym-spezifischen, technologischen Störgrenzen ermittelt werden. Sie wurden als die niedrigste Enzym-Konzentration definiert, bei der nach einer Inkubation von bis zu 10 d bei 60 °C eine Verflüssigung des untersuchten Erzeugnisses auftrat. Um möglichst aussagekräftige Resultate zu erzielen, wurden identische Versuche mit Milchprodukten verschiedener Hersteller durchgeführt. Außerdem erfolgte eine parallele Inkubation von Kontrollansätzen ohne Enzym-Zusatz. Bei den überprüften Enzymen handelte es sich um verschiedene, kommerzielle Präparationen mit amylolytischer Aktivität, die ein hohes Temperatur-Optimum besitzen (> 55 °C) und auf unterschiedliche Weise Stärke bzw. stärkeähnliche Kohlenhydrate umsetzen (Tab. 6). Die Präparationen wurden direkt vom Hersteller zur Verfügung gestellt, die katalytische Aktivität wurde orientierend mit den unter IV.1 beschriebenen Verfahren bzw. dem β-Amylase Assay (Betamyl-3) der Firma Megazyme (Nachweis der katalytischen Aktivität von Exoamylasen; β-Amylase, Amyloglucosidase, α-Glucosidase, maltogene Amylase) überprüft. Mit künstlich kontaminierten Ansätzen konnte gezeigt werden, dass abhängig vom Enzym und Produkt unterschiedliche Enzym-Konzentrationen notwendig waren, um eine Konsistenzveränderung hervorzurufen.

Wurden verschiedene Produkte (Joghurt- bzw. Puddingproben verschiedener Hersteller) mit dem gleichen Enzym versetzt, unterschieden sich die ermittelten Störgrenzen um maximal eine Verdünnungsstufe (Tab. 6). Bei Vergleich der Ergebnisse verschiedener Enzyme waren die Abweichungen jedoch deutlich größer. Während bei Einsatz von Amyloglucosidase und β-Amylase die technologische Störgrenze im Bereich von 10 – 100 µg/g lag, verursachten bei anderen Enzymen (α-Amylasen bzw. CGTase) schon 10.000-fach niedrigere Konzentrationen eine Produktverflüssigung (Tab. 6). Zwischen diesen beiden Extremen lagen die Aktivitäten der untersuchten Pullulanase bzw. maltogenen Amylase, bei denen i.d.R. mittlere Enzym-Gehalte von 100 – 1000 ng/g zu einer sichtbaren Verflüssigung der künstlich kontaminierten Proben führten (Tab. 6). Einige mit Pullulanase versetzte Produkte veränderten ihre Konsistenz aber erst bei Zusatz von 10 µg Enzym/g. Ansätze mit α-Glucosidase zeigten hingegen selbst bei Enzym-Konzentrationen von 100 µg/g keine abweichenden Produkteigenschaften (Tab. 6).

Tabelle 6: Verflüssigung von stärkehaltigen Milchprodukten durch kommerziell eingesetzte, amylolytische Enzyme. Angegeben sind einige Charakteristika der überprüften Enzyme sowie die technologischen Störgrenzen, d.h. diejenigen Enzym-Konzentrationen durch die nach einer Inkubation bei 60 °C für 10 d noch eine Verflüssigung der künstlich kontaminierten Probe induziert wurde.

Eigenname des Präparats	Enzym	EC-Nr. ¹	Enzymeigenschaften			Technologische Störgrenze (ng Enzym/g Probe)				
			Reaktion mit Stärke oder stärkeähnlichen Verbindungen ²		pH-Optimum ³	Temp.-Optimum (° C) ³	Pudding A	Pudding B	Joghurt A	Joghurt B
AMG® 300L	Amylo- glucosidase	3.2.1.3	Vom nicht-reduzierenden Ende ausgehende Hydro- lyse von α1→4-glyko- sidischen Bindungen (bei Amyloglucosidase auch α1→6-Bindungen)	3,5 – 4,5 6,5	70 – 75 60	100.000 > 100.000	10.000 > 100.000	10.000 > 100.000	10.000 > 100.000	
E-TSAGS	α-Glucosidase	3.2.1.20								
Novamyl® 1000BG	Maltogene Amylase	3.2.1.133								
Secura®	β-Amylase	3.2.1.2								
Promozyme® D2	Pullulanase	3.2.1.41	Hydrolyse von α1→6- glykosidischen Bindungen	4,5 – 5,5	55 – 65	10.000	10.000	10.000	100.000	
Termamyl® 120L	α-Amylase	3.2.1.1	Hydrolyse von α1→4- glykosidischen Bindungen	4,5 – 5,5 5,6 – 6,0	55 – 60 85 – 88	10.000 1	1.000 1	1.000 10	10.000 10	
Termamyl® 300L	α-Amylase	3.2.1.1	innerhalb des Mehr- fachzuckers	5,6 – 6,0	85 – 88	1	1	10	10	
Toruzyme® 3.0L	CGTase	2.4.1.19	Zyklische Dextrine als Abbauprodukt	5,0 – 6,5	90 – 95	10	1	1	10	

¹ Enzyme Commission Number

² Nach den Informationen der Enzymdatenbank BRENDA (Jeske et al., 2018)

³ Herstellerangaben

Parallel zur Inkubation bei 60 °C wurden identische Testansätze bei niedrigeren Temperaturen gelagert, wobei die Produktverflüssigung meist deutlich verzögert bzw. bei Zusatz von hohen Enzym-Gehalten in seltenen Fällen auch zeitgleich auftrat. Bei einigen mit in sehr geringer Konzentration an CGTase bzw. maltogener Amylase beimpften Ansätzen wurde während der Lagerung bei Raumtemperatur selbst nach 3 Wochen keine Viskositätsabnahme festgestellt, während es beim 60 °C-Ansatz bereits nach wenigen Tagen zur Verflüssigung kam (Ergebnisse nicht dargestellt). Tabelle 7 zeigt exemplarisch den Zeitverlauf bei der temperaturabhängigen Verflüssigung eines unauffälligen Puddings nach Zugabe von α -Amylase (1 ng/ml). Bei höheren Lagerungstemperaturen trat der Produktfehler deutlich schneller auf. So verflüssigte sich der Pudding bei 60 °C schon nach 3 d, bei 37 °C nach 9 d und bei Raumtemperatur erst nach 17 d.

Tabelle 7: Temperaturabhängige Verflüssigung eines künstlich mit der α -Amylase-Präparation Termamyl® 300L kontaminierten, stärkehaltigen Puddings. Die eingesetzte Konzentration von 1 ng/g entsprach der in Vorversuchen ermittelten technologischen Störgrenze.

Inkubation bei	Inkubationsdauer (d)						
	0	2	3	8	9	16	17
60 °C	-	-	+	+	+	+	+
37 °C	-	-	-	-	+	+	+
Raumtemperatur	-	-	-	-	-	-	+

-, keine Änderung der Textur; +, sichtbare Verflüssigung des Puddings

Ferner wurden auch von verschiedenen Herstellern zugesandte Proben aktueller Verflüssigungsfälle untersucht. Dabei konnten lediglich bei einem, zur Herstellung eines Fehlprodukts verwendeten Aroma amyloytische Aktivitäten nachgewiesen werden, wobei die ermittelte technologische Störgrenze (Inkubation 10 d bei 60 °C) bei ca. 0,1 % Aroma lag. Der verflüssigte Pudding, bei dem in der Herstellung das auffällige Aroma eingesetzt worden war, rief nach Zusatz zum unauffälligen Milcherzeugnis hingegen keine Produktveränderung hervor. Bei dieser Probe handelte es sich um eine Rückstellprobe, deren MHD bereits um mehrere Monate überschritten war. Ob das negative Ergebnis dadurch verursacht wurde, dass in der Probe nur sehr geringe Amylase-Konzentrationen vorlagen, oder dass womöglich aufgrund des Alters der Probe (> 1 Jahr) das ursächliche Enzym nicht mehr in seiner aktiven Form vorlag, konnte nicht abschließend geklärt werden.

3 Herstellung der Testreagenzien

Da die unter IV.1 und IV.2 dargestellten Versuche zeigten, dass mit den derzeitig verfügbaren enzymatischen Tests technische Enzyme prokaryotischen Ursprungs nicht mit der erforderlichen Sensitivität ($\leq 1 \text{ ng/g}$) in Rohwaren und stärkehaltigen Milchprodukten nachgewiesen werden können, wurde ein alternativer Testansatz überprüft. Das avisierte Testprinzip beruht, wie eingangs erwähnt, auf dem hochsensitiven Nachweis von Stärke bzw. Stärkederivaten mittels Sandwich-EIA. Entscheidend ist, dass die als Substrat eingesetzten Mehrfachzucker mehrfach mit einer niedermolekularen Substanz (RBB) markiert sind. Nur so können gegen das Hapten gerichtete Antikörper als Fang- und Detektionsantikörper genutzt werden. Die markierten Mehrfachzucker dienen als Enzymsubstrat und werden mit der zu untersuchenden Probe vorinkubiert. Ist das Probenmaterial mit stärkeabbauenden Enzymen kontaminiert, kommt es zur Hydrolyse der Stärke(derivate) und damit zur Bildung von Abbauprodukten, die aufgrund ihrer geringen Molekülgröße keine oder nur noch sehr wenige Hapten-Reste besitzen und dadurch im Sandwich-EIA nicht mehr oder nur schlecht nachweisbar sind. Mit zunehmender amylolytischer Enzym-Aktivität in der Probe nimmt also die im Sandwich-EIA gemessene Signalintensität ab.

3.1 Enzymsubstrate

Im Vergleich zu den kommerziellen Verfahren sollte mit dem avisierten Testsystem ein wesentlich sensitiverer Nachweis von amylolytischen Enzym-Aktivitäten in Lebensmitteln ermöglicht werden. Dabei dienten verschiedene Mehrfachzucker, wie lösliche Stärke bzw. lang- und kurzkettiges Maltodextrin, als Enzymsubstrate und wurden dazu mit RBB markiert. Die Spektren der RBB-Konjugate zeigen deutlich, dass Substrate mit unterschiedlicher Kopplungsdichte erzeugt werden konnten (Abb. 5). Bei allen drei verwendeten Mehrfachzuckern folgte die Kopplungseffizienz annähernd einem linearen Trend. Dies wird vor allem durch den Vergleich der Absorptionen der gereinigten Kopplungsprodukte bei einer Wellenlänge von 592 nm veranschaulicht. Hier zeigten Substratvarianten mit doppelter RBB-Menge im Kopplungsansatz um etwa Faktor 2 höhere Absorptionswerte (Abb. 5 D). Zwischen den markierten Substraten gab es jedoch geringfügige Unterschiede. Prinzipiell wies RBB-(l)-Mdx hierbei die höchste Kopplungseffizienz auf, danach folgten RBB-Stärke und RBB-(s)-Mdx (Abb. 5).

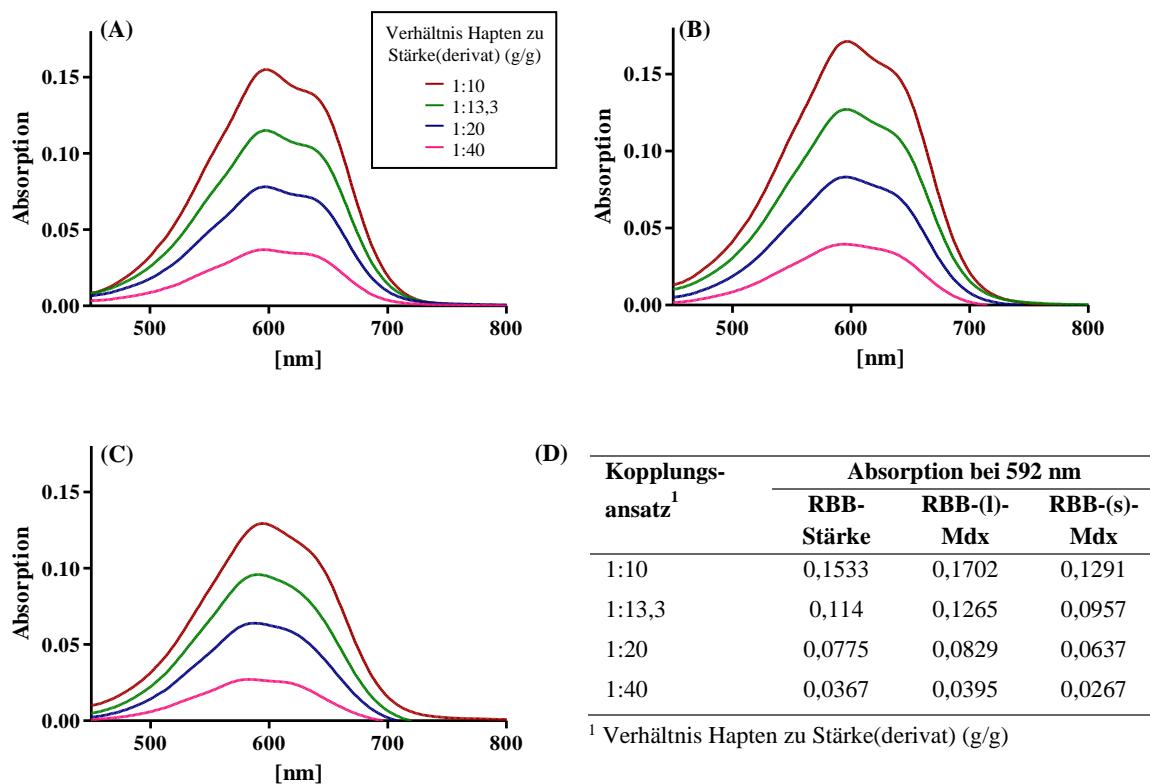


Abbildung 5: Spektralanalysen (400 – 800 nm) der verschiedenen mit RBB markierten Mehrfachzucker [Konzentration: 0,4 mg Stärke(derivat)/ml]: (A) lösliche Stärke; (B) langketiges Maltodextrin, (l)-Mdx; (C) kurzkettiges Maltodextrin, (s)-Mdx. Die bei 592 nm gemessenen Absorptionswerte sind unter (D) tabellarisch zusammengefasst.

3.2 Entwicklung und Charakterisierung von Hapten-spezifischen Antikörpern

Basierend auf hochaffinen mAk sollte ein sensitiver Sandwich-EIA erstellt werden, mit dem der Abbau der in IV.3.1 beschriebenen Enzymsubstrate zuverlässig nachgewiesen werden kann. Die Herstellung geeigneter Antikörper erfolgte mittels Hybridomtechnik, wobei zwei vielversprechende Klone, nämlich 2C7 bzw. 3B5, isoliert werden konnten. Nach erfolgreicher Massenproduktion wurden die gereinigten mAk mittels indirekter EIAs (III.2.6) genauer charakterisiert. Grundsätzlich war im nicht-kompetitiven, indirekten EIA mit den Antikörpern beider Klone ein sensitiver Nachweis aller RBB-Konjugate möglich, wobei je nach verwendeten RBB-Mehrfachzucker die EIA-Reaktivitäten variierten (Tab. 8). Grundsätzlich reagierte der mAk 3B5 um ca. Faktor 2 – 2,5 besser mit den markierten Substraten als der mAk 2C7 (Tab. 8). Die höchste relative Affinität (9,2 bzw. 3,9 ng/ml) wiesen beide mAk mit dem RBB-(l)-Mdx-Konjugat auf.

Tabelle 8: Relative Affinität der monoklonalen Antikörper 2C7 bzw. 3B5 im nicht-kompetitiven, indirekten EIA. Die dargestellten Werte entsprechen derjenigen RBB-Konjugat-Konzentration, bei der im EIA im Mittel eine Absorption von 1,0 erreicht wurde (jeweils Mittelwerte aus drei Testansätzen).

Konjugat	monoklonaler Antikörper	
	2C7	3B5
RBB-Stärke (Ansatz ¹ 1:10)	12,7 ng/ml	6,4 ng/ml
RBB-(l)-Mdx (Ansatz ¹ 1:10)	9,2 ng/ml	3,9 ng/ml
RBB-(s)-Mdx (Ansatz ¹ 1:10)	37,2 ng/ml	14,8 ng/ml

¹ Verhältnis Hapten zu Stärke(derivat) (g/g)

Analog zum nicht-kompetitiven Testsystem zeigte auch in kompetitiven, indirekten EIAs der mAk 3B5 eine höhere Affinität als der mAk 2C7 (Tab. 9). Grundsätzlich konnte mit beiden Antikörpern freies RBB äußerst sensitiv detektiert werden, die IC₅₀-Werte lagen bei 0,71 bzw. 0,13 ng RBB/ml. Strukturverwandte Lebensmittelfarbstoffe führten dagegen nur in sehr hohen Konzentrationen ($\geq 7,4 \mu\text{g}/\text{ml}$) zu messbaren Veränderungen der Signalintensitäten im EIA (Tab. 9), wobei auch hier mAk 3B5 im Allgemeinen empfindlicher als mAk 2C7 mit den strukturverwandten Lebensmittelfarbstoffen reagierte (Tab. 9). Die berechnete relative Kreuzreaktion betrug jedoch in allen Fällen maximal 0,002 % (Tab. 9). Die höchste Reaktivität trat beim mAk 3B5 mit Brillantblau FCF auf, beim mAk 2C7 war die höchste relative Kreuzreaktion (0,0012 %) mit Gelborange S feststellbar.

Tabelle 9: Charakteristika der monoklonalen Antikörper 2C7 bzw. 3B5. Angegeben ist die Konzentration, die zur 50 %-Hemmung im kompetitiven, indirekten EIA führte (IC_{50} -Wert) sowie bei den getesteten Lebensmittelfarbstoffen die relative Kreuzreaktion in % (jeweils Mittelwerte aus drei Testansätzen). Zum Vergleich sind des Weiteren die gesetzlichen Farbstoff-Höchstmengen in Milchprodukten aufgeführt.

Farbstoff	IC₅₀-Werte		Maximal zugelassene Höchstmenge in Milchprodukten¹	
	(relative Kreuzreaktion)	mAk 2C7	mAk 3B5	
RBB	0,71 ng/ml	0,13 ng/ml		
Briliantschwarz BN (E151)	> 100 µg/ml (< 0,0008 %)	10,6 µg/ml (0,0012 %)		150 µg/ml ²
Gelborange S (E110)	64,2 µg/ml (0,0012 %)	40,5 µg/ml (0,0003 %)		5 µg/ml
Cochenillerot A (E124)	> 100 µg/ml (< 0,0008 %)	71,1 µg/ml (0,0002 %)		5 µg/ml
Brilliantblau FCF (E133)	> 100 µg/ml (< 0,0008 %)	7,4 µg/ml (0,002 %)		150 µg/ml ²

¹ Nach Verordnung (EG) Nr. 1333/2008 vom 16. Dezember 2008 über Lebensmittelzusatzstoffe

² Höhere Konzentrationen in essbarer Käserinde zulässig

Ein weiteres Bewertungskriterium für die Einsetzbarkeit der Antikörper im avisierten Testsystem war deren Robustheit. Die Überprüfung verschiedener Parameter verdeutlichte, dass beide Antikörper eine ausreichende Stabilität aufweisen und nahezu identisch auf die getesteten Einflüsse reagieren (Abb. 6). Lediglich bei höheren NaCl-Konzentrationen (> 0,25 M) bzw. extremen Testbedingungen, wie pH-Werten von $\leq 5,0$ oder geringen Ionenstärken (2,5 mM), waren gewisse Aktivitätseinbußen zu erkennen. Die relative Restaktivität lag aber in allen Fällen bei über 50 %.

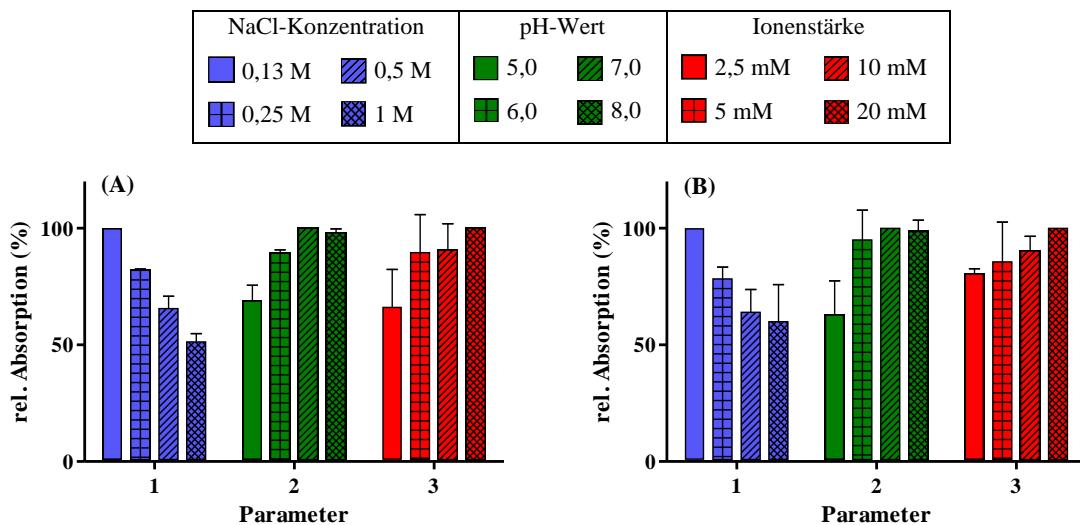


Abbildung 6: Robustheit der monoklonalen Antikörper im nicht-kompetitiven, indirekten EIA. Dargestellt ist die relative Reaktivität (A) des mAk 2C7 bzw. (B) des mAk 3B5 nach Verdünnung in Puffern mit verschiedenen NaCl-Konzentrationen, pH-Werten bzw. Ionenstärken. Die Absorptionen der Ansätze mit 0,13 M NaCl, pH 7,0 bzw. 20 mM Ionenstärke wurden gleich 100 % gesetzt.

4 Etablierung von Sandwich-EIAs

Da sich die Charakteristika der beiden mAk nicht fundamental unterschieden, wurde sowohl mAk 2C7 als auch mAk 3B5 zur Entwicklung von Sandwich-EIAs eingesetzt. Hierfür wurde zunächst mittels Schachbretttitration die optimale Konzentration der verwendeten Antikörper (Konjugate) ermittelt und anschließend die Reaktivität der RBB-markierten, als Antigen eingesetzten Mehrfachzucker-Konjugate überprüft. Dazu wurden Standardkurven mit sämtlichen Varianten der RBB-Stärke(derivate) angesetzt (IV.3.1). Die in Tab. 10 am Beispiel des auf mAk 2C7 basierenden Sandwich-EIAs dargestellten Ergebnisse zeigen, dass deutliche Unterschiede in der Nachweisbarkeit der verschiedenen RBB-Stärke(derivate) bestehen. Grundsätzlich konnten, wie erwartet, Substrate mit höherer Markierungsdichte auch im Sandwich-EIA erheblich sensitiver nachgewiesen werden (Tab. 10). Um eine Extinktion von 1,0 zu erreichen, musste bspw. das Konjugat mit geringster Markierungsdichte (Verhältnis 1:40) um Faktor 15 – 46 konzentrierter eingesetzt werden als das entsprechende, am stärksten markierte Stärke(derivat) (Verhältnis 1:10). Des Weiteren zeigte sich, dass die höchste Nachweisempfindlichkeit mit markiertem (I)-Mdx erreicht wird (Tab. 10). Konjugate anderer Mehrfachzucker mit gleicher Farbstoffdichte im Kopplungsansatz waren weniger gut nachweisbar. Besonders auffällig war dieser Effekt bei Kopplungsansätzen mit einem RBB-Stärke(derivat)-Verhältnis von 1:40. Dabei wurde

RBB-Stärke um ca. Faktor 2, markiertes (s)-Mdx hingegen um etwa Faktor 8 schlechter nachgewiesen als RBB-(l)-Mdx (Tab. 10).

Tabelle 10: Reaktivität verschiedener RBB-Stärke(derivate) im 2C7-Sandwich-EIA. Angegebenen ist die jeweilige Konzentration [ng Stärke(derivat)/ml], bei der im EIA eine Absorption von 1,0 erreicht wurde (jeweils Mittelwerte aus drei Testansätzen).

Kopplungsansatz ¹	Lösliche Stärke	(l)-Mdx	(s)-Mdx
1:10	22	15	39
1:13,3	37	24	84
1:20	85	49	217
1:40	502	217	1803

¹ Verhältnis Hapten zu Stärke(derivat) (g/g) im Kopplungsansatz

Tendenziell ähnliche Ergebnisse wurden auch in der auf mAk 3B5 basierenden EIA-Variante erhalten (Abb. 7 A). Wie sich bereits in den indirekten EIAs angedeutet hatte, konnte mit diesem Sandwich-EIA eine deutliche Steigerung der Substrat-Nachweisbarkeit erreicht werden. Bei Verwendung des mAk 3B5 wurden, wie in Abbildung 7 dargestellt, die mit RBB markierten Stärke(derivate) im EIA um etwa Faktor 5 – 15 sensitiver nachgewiesen als im 2C7-System. Weitere überprüfte Testvarianten, bei denen Kombinationen der beiden Antikörper eingesetzt wurden, führten jedoch zu keiner Verbesserung der Testsensitivität. Darüber hinaus wurde der Einfluss von RBB-ähnlichen Lebensmittelfarbstoffen auf die auf mAk 2C7 bzw. mAk 3B5 basierenden Sandwich-EIAs überprüft. Dies ist insofern wichtig, da im späteren Test auch farbstoffhaltige Lebensmittelproben eingesetzt werden sollen. Durch mögliche Kreuzreaktionen der Antikörper ist eine negative Beeinflussung des Testsystems denkbar. Zwar wurde im indirekten EIA nur eine geringe Kreuzreakтивität der beiden mAk festgestellt (IV.3.2), für eine abschließende Bewertung erfolgte jedoch der Einsatz der maximal zulässigen Farbstoff-Konzentrationen (vgl. Tab. 9) in beiden Sandwich-EIA-Systemen. Wurden die Farbstoffe dabei auf gleiche Weise wie Realproben untersucht, war kein hemmender Effekt sichtbar (Ergebnisse nicht dargestellt).

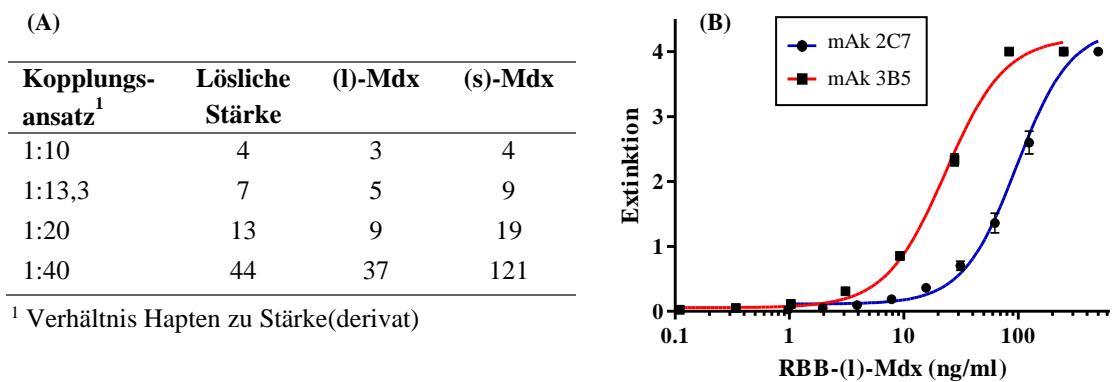


Abbildung 7: Reaktivität verschiedener RBB-Stärke(derivate) im 3B5-Sandwich-EIA. (A) Tabellarische Darstellung der jeweiligen Konzentration [ng Stärke(derivat)/ml], bei der im EIA eine Absorption von 1,0 erreicht wurde. (B) Vergleich der Reaktivität von RBB-(l)-Mdx (Kopplungsverhältnis 1:20) bei Einsatz in auf mAk 2C7 bzw. mAk 3B5 basierenden Sandwich-EIAs.

5 EIA-basierter Nachweis amyloytischer Enzym-Aktivitäten

5.1 Untersuchungen zur Substratstabilität

Nicht nur ein sensibler Nachweis des Enzymsubstrats, sondern auch eine ausreichende Substratstabilität ist für das avisierte Testsystem unerlässlich. Nur so können korrekte Messergebnisse und eine hohe Reproduzierbarkeit gewährleistet werden. In orientierenden Vorversuchen zeigte sich jedoch eine zeitabhängige Instabilität des Substrats. So wurde bei der als Modellsubstrat verwendeten RBB-Stärke (Kopplungsverhältnis 1:20) nach zweistündiger Vorinkubation bei 60 °C lediglich eine Rest-Reaktivität von 34 % im Sandwich-EIA festgestellt (Abb. 8 A). Durch den Zusatz von BSA konnte jedoch eine deutliche Stabilisierung erreicht werden. Bereits bei Konzentrationen von 0,01 % BSA im Testansatz wurde das RBB-Konjugat ausreichend stabilisiert und zeigte im EIA ähnliche Extinktionen, wie nicht inkubierte Kontrollansätze (Abb. 8 B). Für weitere Untersuchungen wurde daher als Verdünnungspuffer PBS mit Zusatz von 0,1 % BSA verwendet. Dabei lag die im EIA ermittelte Rest-Reaktivität sowohl nach 2 h als auch nach 18 h bei 60 °C bei über 90 %.

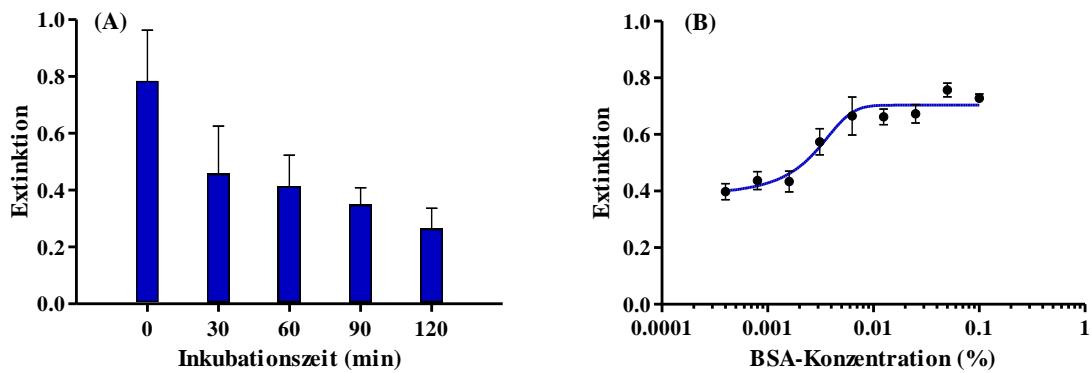


Abbildung 8: Überprüfung der Stabilität von in PBS verdünntem RBB-Stärke-Konjugat (Kopplungsverhältnis 1:20) bei 60 °C. (A) Reaktivität des Substrats im 2C7-Sandwich-EIA in Abhängigkeit von der Inkubationszeit. (B) Stabilisierung durch Zusatz von BSA zum Verdünnungspuffer.

Ähnlich hohe Rest-Reaktivitäten wurden auch für das Modellsubstrat RBB-(I)-Mdx (Kopplungsverhältnis 1:20) gefunden, wobei in dieser Versuchsreihe auch der Einfluss des pH-Wertes (überprüfter pH-Bereich 5,0 – 8,0) überprüft wurde. Nach 2 h Inkubation bei 60 °C mit 0,1 % BSA im Testansatz wurden im Vergleich zum Kontrollansatz (pH 7,0), relative Absorbtionen von 97 – 105 % im Sandwich-EIA registriert.

5.2 Überprüfung des Testprinzips

Mit der durch BSA-Zusatz erreichten Substratstabilisierung war eine erste Überprüfung des Testprinzips möglich. Dabei zeigte sich, dass ein Vorverdau der RBB-Stärke(derivate) mit der Amylase-Präparation Termamyl® 300L dosisabhängig zu reduzierten Extinktionen im Sandwich-EIA führte (Abb. 9). Das Ausmaß der Reduktion war dabei abhängig vom Amylase-Gehalt, je höher die Enzym-Konzentration desto geringer die gemessenen Absorptionswerte.

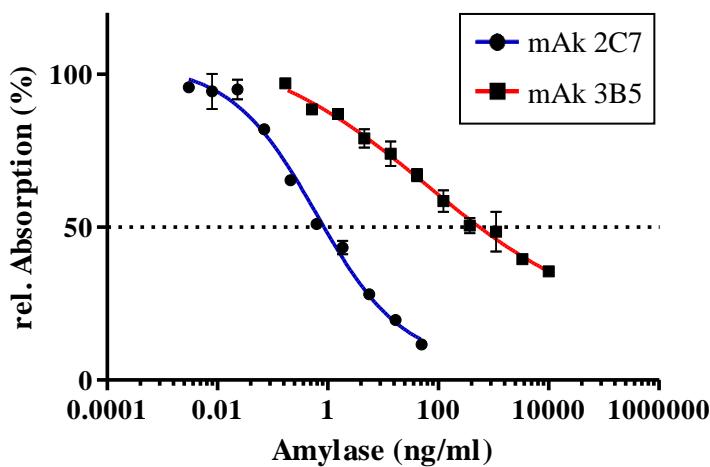


Abbildung 9: Vergleich der Amylase-Nachweisbarkeit unter Verwendung des 2C7- bzw. 3B5-Sandwich-EIAs. Dargestellt ist die im EIA gemessene Reaktivität von RBB-(l)-Mdx (Kopplungsverhältnis 1:20) in Abhängigkeit von der eingesetzten Amylase-Konzentration. Die Ansätze wurden dazu für 2 h bei 60 °C vorverdaut (Absorptionswert des amylosefreien Kontrollansatzes wurde gleich 100 % gesetzt).

Bei Verwendung der beiden etablierten Sandwich-EIA-Systeme (IV.4) wurden allerdings sehr unterschiedliche Ergebnisse im Hinblick auf die Nachweisbarkeit der amylolytischen Aktivität erhalten. Überraschenderweise konnten mit dem 3B5-EIA-System trotz der in den Vorversuchen beobachteten hohen Affinität des mAk 3B5 nur schlechte Nachweisempfindlichkeiten erreicht werden. Wie exemplarisch in Abbildung 9 am Beispiel von markiertem (l)-Mdx demonstriert, unterschieden sich bei Einsatz der unter gleichen Bedingungen vorverdauten Ansätze die Enzym-Konzentrationen, die zu einer relativen Absorption von 50 % führten (EC₅₀-Werte), massiv. So wurden im 3B5-Testsystem ca. 650-fach höhere EC₅₀-Werte (552 ng/ml) festgestellt als bei Verwendung des 2C7-Sandwich-EIAs (0,85 ng/ml). Darüber hinaus verläuft die mit mAk 3B5 generierte Standardkurve relativ flach, so dass selbst bei Einsatz von 10 µg Amylase/ml die relative Absorption immer noch über 35 % liegt. Basierend auf diesen Ergebnissen wurde daher für alle weiteren Untersuchungen nur mehr das 2C7-Sandwich-System eingesetzt.

Bei der systematischen Untersuchung aller in IV.3.1 beschriebenen Enzymsubstrate konnte festgestellt werden, dass die Testempfindlichkeit umso höher lag, je geringer die Markierungsdichte des Mehrfachzuckers war (Abb. 10). Ein Vergleich der verschiedenen Stärke(derivate) zeigte außerdem, dass bei Konjugaten mit gleichem Kopplungsverhältnis Amylase-Aktivitäten mit dem auf langkettigem Maltodextrin basierenden Substrat am

sensitivsten nachgewiesen werden konnten. Dabei lagen die EC₅₀-Werte bei Verwendung von RBB-Stärke bzw. RBB-(s)-Mdx als Substrat erheblich höher als bei markiertem (l)-Mdx (Abb. 10 D). Der Einsatz von im Verhältnis 1:40 markiertem RBB-(l)-Mdx ergab den niedrigsten EC₅₀-Wert (0,41 ng/ml).

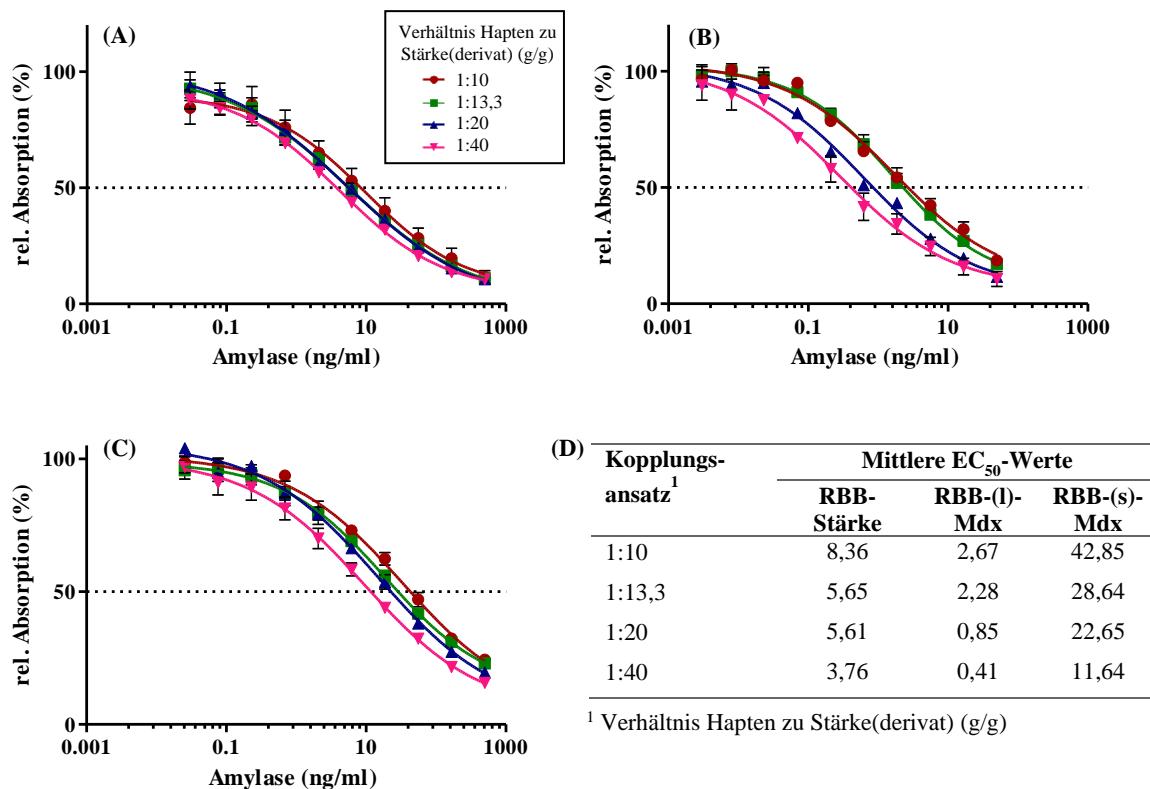


Abbildung 10: Indirekter Nachweis von Amylase-Aktivitäten mittels 2C7-Sandwich-EIA. Der amylasehaltige Testansatz wurde mit verschiedenen Mehrfachzucker-Konjugaten versetzt, für 2 h bei 60 °C inkubiert, und anschließend mittels EIA analysiert. (A) RBB-Stärke, (B) RBB-(l)-Mdx, (C) RBB-(s)-Mdx als Substrat. (D) Tabellarische Zusammenfassung der Substrat-spezifischen EC₅₀-Werte. Der Absorptionswert des amylasefreien Kontrollansatzes wurde jeweils gleich 100 % gesetzt.

5.3 Optimierung der Testparameter

Die in den oben dargestellten Versuchen zur orientierenden Überprüfung des Testprinzips gewonnenen Ergebnisse zeigten bereits das hohe Potential dieses methodischen Ansatzes, die EC₅₀-Werte von bis zu 0,41 ng/ml lagen um Größenordnungen unterhalb der mit den kommerziellen Enzym-Tests erreichten Nachweisempfindlichkeiten (IV.1). Trotz dieser guten Ausgangslage wurde in weiteren Versuchen überprüft, ob durch Variationen des Testablaufs eine weitere Steigerung der Testsensitivität erreicht werden kann. Während Inkubationszeit und -temperatur (2 h und 60 °C) aus den Vorversuchen vorerst übernommen wurden, erfolgte eine genauere Überprüfung des Einflusses der Pufferzusammensetzung auf die gemessene Aktivität der diversen, in Tabelle 6 beschriebenen Enzyme. Für diese Versuche wurden sämtliche überprüften Puffer mit 0,1 % BSA versetzt. Neben der bisher verwendeten Verdünnungslösung (PBS), wurden die Präparationen der amyloytischen Enzyme sowie des RBB-markierten Substrats in alternativen Puffersystemen [CaCl₂-Malat-Puffer, CaCl₂-Tris-Puffer bzw. PBS (0,1 M)] diluiert. Nach Einsatz der vorverdauten Testansätze im 2C7-Sandwich-EIA wurden die relativen Aktivitäten im Vergleich zum Testansatz mit PBS/0,1 % BSA ermittelt. Mit Ausnahme von CaCl₂-Tris-Puffer bzw. PBS (0,1 M), die bei Toruzyme® 3.0L bzw. Termamyl® 120L keine signifikante Aktivitätssteigerung hervorriefen, konnten mit den alternativen Puffersystemen stets höhere Enzym-Aktivitäten erzielt werden (Abb. 11). Abhängig von Enzym und Puffer war die Zunahme jedoch mehr oder weniger stark ausgeprägt. Besonders präsent war dieser Effekt bei AMG® 300L, Novamyl® 1000BG, Promozyme® D2 und Secura®, wobei Aktivitätssteigerungen um bis zu Faktor 2,4 gemessen wurden (Abb. 11). Tendenziell wurde bei den meisten Ansätzen die höchste relative Aktivität bei Verwendung des CaCl₂-Malat-Puffers erreicht. Nur bei den Enzym-Präparationen Termamyl® 120L und Promozyme® D2 schneidet dieser Puffer geringfügig schlechter ab als CaCl₂-Tris-Puffer bzw. PBS (0,1 M) (Abb. 11).

Zusätzlich zu den in Abbildung 11 aufgeführten Enzymen, wurde auch das Verhalten von α-Glucosidase überprüft. Dabei konnte jedoch, selbst bei einer sehr hohen Enzym-Konzentration von 9 mg/ml, bei keinem der untersuchten Puffer ein Abbau des als Substrat angebotenen RBB-Mehrfachzuckers nachgewiesen werden.

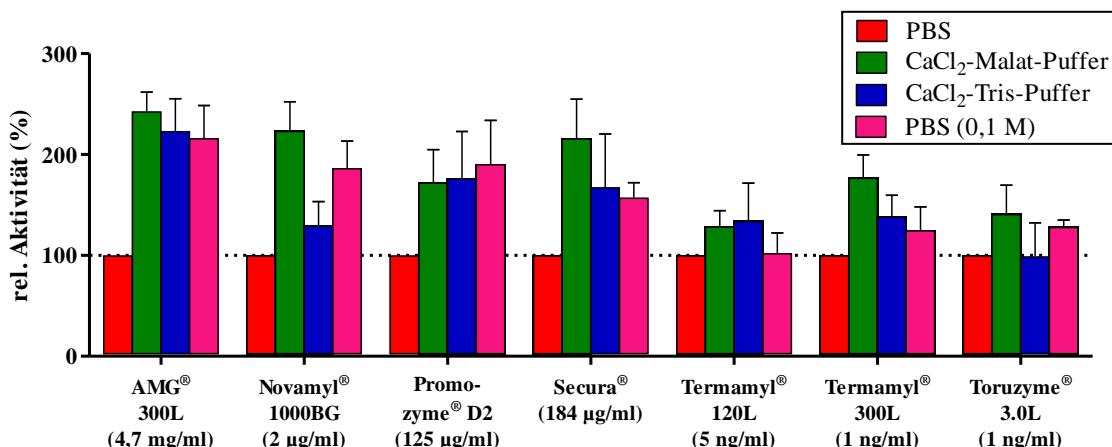


Abbildung 11: Relative Enzym-Aktivität in Abhängigkeit vom verwendeten Inkubationspuffer. Diverse amylolytische Enzym-Präparationen (vgl. Tab. 6) wurden dazu in verschiedenen Puffern (mit 0,1 % BSA) verdünnt, mit RBB-(l)-Mdx (Kopplungsverhältnis 1:20) versetzt und die Ansätze nach Inkubation für 2 h bei 60 °C mittels 2C7-Sandwich-EIA untersucht. Die jeweilige Enzym-Aktivität in PBS wurde gleich 100 % gesetzt. Die eingesetzte Enzym-Konzentration (in Klammern) orientierte sich dabei an den in Vorversuchen mit dem RBB-(l)-Mdx-Substrat erhaltenen Ergebnissen. (Mittelwerte ± Standardabweichung aus 3 unabhängigen Versuchsreihen)

Neben der Pufferzusammensetzung spielt beim Nachweis von Enzym-Aktivitäten in der Regel auch die im Testansatz vorliegende Substrat-Konzentration eine entscheidende Rolle. Um den Einfluss dieses Parameters auf eine potenzielle Steigerung der Testempfindlichkeit zu überprüfen, wurden sämtliche Kopplungsvarianten von RBB-(l)-Mdx im Konzentrationsbereich von 0,125 – 2 µg/ml in den Test eingesetzt. Die höchste Enzym-Aktivität wurde unabhängig von der Markierungsdichte bei Einsatz von 1 µg Substrat pro ml Testansatz erreicht (Abb. 12). Sowohl bei höheren als auch bei niedrigeren Konzentrationen war die getestete Amylase (Termamyl® 300L) tendenziell weniger aktiv. Aufgrund dieser Resultate wurden alle weiteren Untersuchungen unter den folgenden optimierten Bedingungen durchgeführt: Verwendung von CaCl₂-Malat-Puffer (mit Zusatz von 0,1 % BSA) als Verdünnungspuffer; RBB-(l)-Mdx (1:40) als Analysesubstrat; Einsatz des Substrates in Konzentrationen von 1 µg/ml.

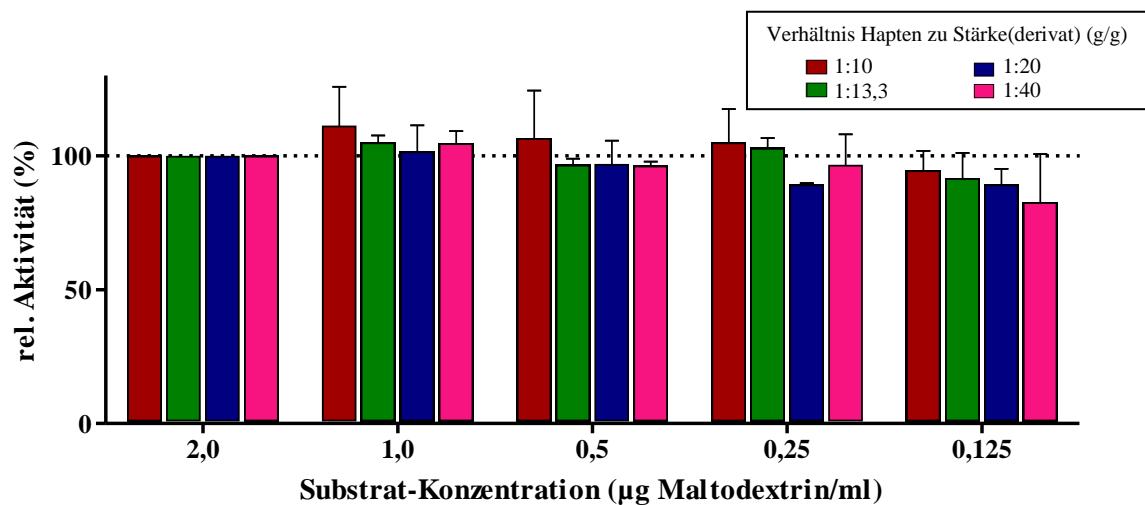


Abbildung 12: Einfluss der im Testansatz verwendeten Substrat-Konzentration auf die im 2C7-Sandwich-EIA nachweisbare Enzym-Aktivität. Dazu wurde markiertes RBB-(l)-MdX mit konstanten Gehalten an Termamyl® 300L versetzt und für 2 h bei 60 °C vorverdaut. Die Enzym-Aktivität der Ansätze mit 2 µg Substrat/ml wurden gleich 100 % gesetzt. (Mittelwerte ± Standardabweichung aus 3 unabhängigen Versuchsreihen)

5.4 Nachweisbarkeit amyloytischer Enzyme

Neben der vorzugsweise in den bisher dargestellten Versuchen eingesetzten Enzym-Präparation Termamyl® 300L konnten mit dem optimierten Testsystem auch erfolgreich weitere α -Amylasen eu- und prokaryotischen Ursprungs detektiert werden. Sowohl Amylase aus Schimmelpilzen (*A. oryzae*), bakterielle Amylasen (*B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis* bzw. *B. subtilis*) und aus dem Speichel bzw. dem Pankreasgewebe stammende Amylasen waren im untersuchten Konzentrationsbereich ohne Probleme nachweisbar (Abb. 13). Enzym-Konzentrationen, mit denen im optimierten Phadebas-Test eine Signalintensität von 0,1 [relatives Aktivitäts-Äquivalent ca. 2,4 mU/ml; entspricht der Nachweisgrenze des Tests (IV.1)] erreicht wurde, führten im neu entwickelten Enzym-Test zu stark positiven Ergebnissen, die mittleren relativen Absorptionen lagen im Bereich von 10 – 21 %. Bei 10-fach niedrigeren Enzym-Gehalten wurden immer noch positive Ergebnisse erzielt, hierbei lagen die durchschnittlichen, relativen Absorptionswerte bei 24 – 39 % (Abb. 13).

Da sich das angestrebte Testsystem aber nicht nur auf den Nachweis von α -Amylase-Aktivitäten beschränken sollte und v.a. industriell eingesetzte, amyloytische Enzyme für die vorliegende Arbeit von Interesse waren, wurden auch diverse kommerziell genutzte Enzym-Präparationen genauer untersucht. Dazu wurden Standardkurven erstellt, wobei das jeweilige Enzym als Verdünnungsreihe eingesetzt wurde. Die Untersuchungen erfolgten an

mindestens drei unterschiedlichen Tagen, die Extinktionen der amylasefreien Kontrollansätze innerhalb der Tests variierten dabei im Mittel um ca. 8 % ($n = 44$). Basierend auf dem dreifachen Wert dieser Standardabweichung und eines weiteren Sicherheitsfaktors wurde daher als Nachweisgrenze des neu entwickelten Tests diejenige Enzym-Konzentration definiert, die zu einer relativen Absorption von 70 % im EIA (Signifikanzniveau $\alpha = 0,01$) führt. Diese Konzentrationen können demnach zuverlässig mit hoher Sicherheit nachgewiesen werden.

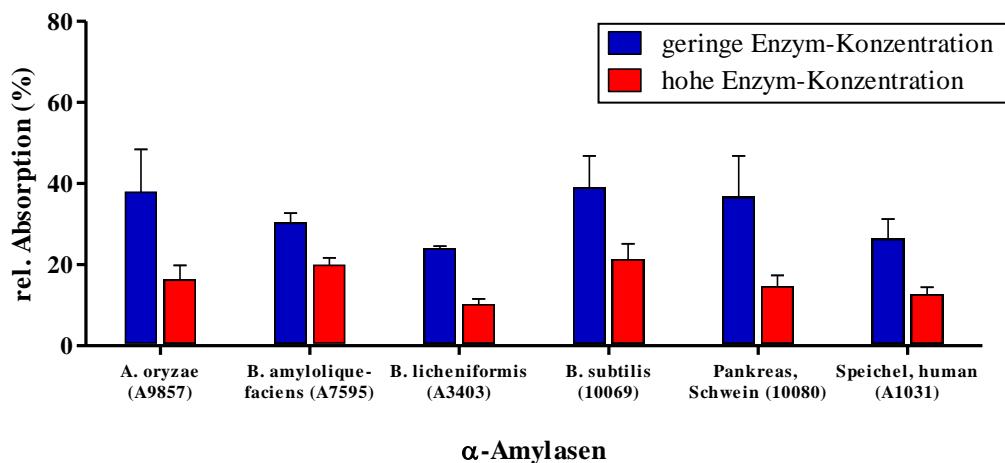


Abbildung 13: Nachweisbarkeit von α -Amylasen verschiedenen Ursprungs im optimierten Testsystem nach einer Inkubation von 2 h bei 60 °C. Dabei wurden die Enzyme jeweils in Konzentrationen eingesetzt, mit denen im optimierten Phadebas-Test Extinktionen von 0,1 (entspricht in etwa der Nachweisgrenze des Tests) erreicht worden waren. Vergleichend dazu wurden auch Präparationen mit 10-fach geringeren Enzym-Gehalten im entwickelten Test untersucht. Die Absorption des amylasefreien Kontrollansatzes wurde dabei jeweils gleich 100 % gesetzt. In Klammern angegeben ist die jeweilige Produktnummer der eingesetzten Amylase (Sigma-Aldrich, Taufkirchen).

Obwohl selbst bei zweistündigem Vorverdau teilweise schon Enzym-Konzentrationen im pg-Bereich nachweisbar waren, erfolgte vergleichend dazu die Generierung von Standardkurven basierend auf einer 18-stündigen Inkubation, um zu überprüfen, ob dadurch eine weitere Erhöhung der Testsensitivität möglich ist (Abb. 14). Sämtliche untersuchten Enzyme konnten durch diese verlängerte Inkubationsdauer wesentlich sensitiver nachgewiesen werden. Dabei war die Steigerung der Testempfindlichkeit abhängig vom Enzym, wobei sich die Nachweisgrenze von AMG® 300L am wenigsten verbesserte (Tab. 11).

Tabelle 11: Überprüfung der Testsensitivität. Das Enzymsubstrat [RBB-(l)-Mdx (1:40)] wurde für 2 bzw. 18 h bei 60 °C mit amyloytischen Enzymen vorinkubiert und die Ansätze dann mittels Sandwich-EIA analysiert. Angegeben sind die Enzym-Konzentrationen, die zu relativen Absorptionen von 30 %, 50 % bzw. 70 % im 2C7-Sandwich-EIA führten (jeweils Mittelwerte aus drei Testansätzen). Der Messwert des amylasefreien Kontrollansatzes wurde gleich 100 % gesetzt.

Präparation	EC ₃₀ (18 h)	EC ₅₀ (18 h)	EC ₇₀ (18 h)	EC ₇₀ (2 h)
AMG® 300L	35 µg/ml	13 µg/ml	7 µg/ml	11 µg/ml
Novamyl® 1000BG	98 ng/ml	8 ng/ml	1 ng/ml	8 ng/ml
Secura®	30 µg/ml	11 µg/ml	5 µg/ml	31 µg/ml
Promozyme® D2	3 ng/ml	2 ng/ml	1 ng/ml	14 ng/ml
Termamyl® 120L	1167 pg/ml	211 pg/ml	44 pg/ml	97 pg/ml
Termamyl® 300L	329 pg/ml	75 pg/ml	19 pg/ml	101 pg/ml
Toruzyme® 3.0L	20 pg/ml	7 pg/ml	3 pg/ml	49 pg/ml

Wie in Tabelle 11 dargestellt, reichten grundsätzlich bei α -Amylasen, wie Termamyl® 120L bzw. Termamyl® 300L bereits wenige Pikogramm an Enzym aus (44 bzw. 19 pg/ml), um mit 18-stündigem Vorverdau eine relative Absorption von 70 % zu erzielen. Dabei entspricht die minimal nachweisbare Enzym-Aktivität in etwa einem relativen Aktivitäts-Äquivalent (IV.1) von 8 µU/ml. Die Aktivität von Toruzyme® 3.0L (CGTase) konnte sogar bei Einsatz noch geringerer Konzentrationen (3 pg/ml) zuverlässig nachgewiesen werden. Bei anderen Präparationen, wie Novamyl® 1000BG bzw. Promozyme® D2, wurde der 70 %-Wert hingegen erst bei Enzym-Konzentrationen von 1 ng/ml erreicht. Deutlich höhere Nachweisgrenzen (7 bzw. 5 µg/ml) zeigten AMG® 300L bzw. Secura® (Tab. 11). Bei diesen Enzymen war zudem bei geringer Aktivität ein inverser Effekt zu sehen, bei dem es zu einer erhöhten Extinktion im Vergleich zum Enzym-freien Kontrollansatz kam. Mit zunehmender Verdünnung nahm die gemessene Extinktion jedoch wieder ab und näherte sich schließlich dem Absorptionswert des Kontrollansatzes an (Abb. 14)

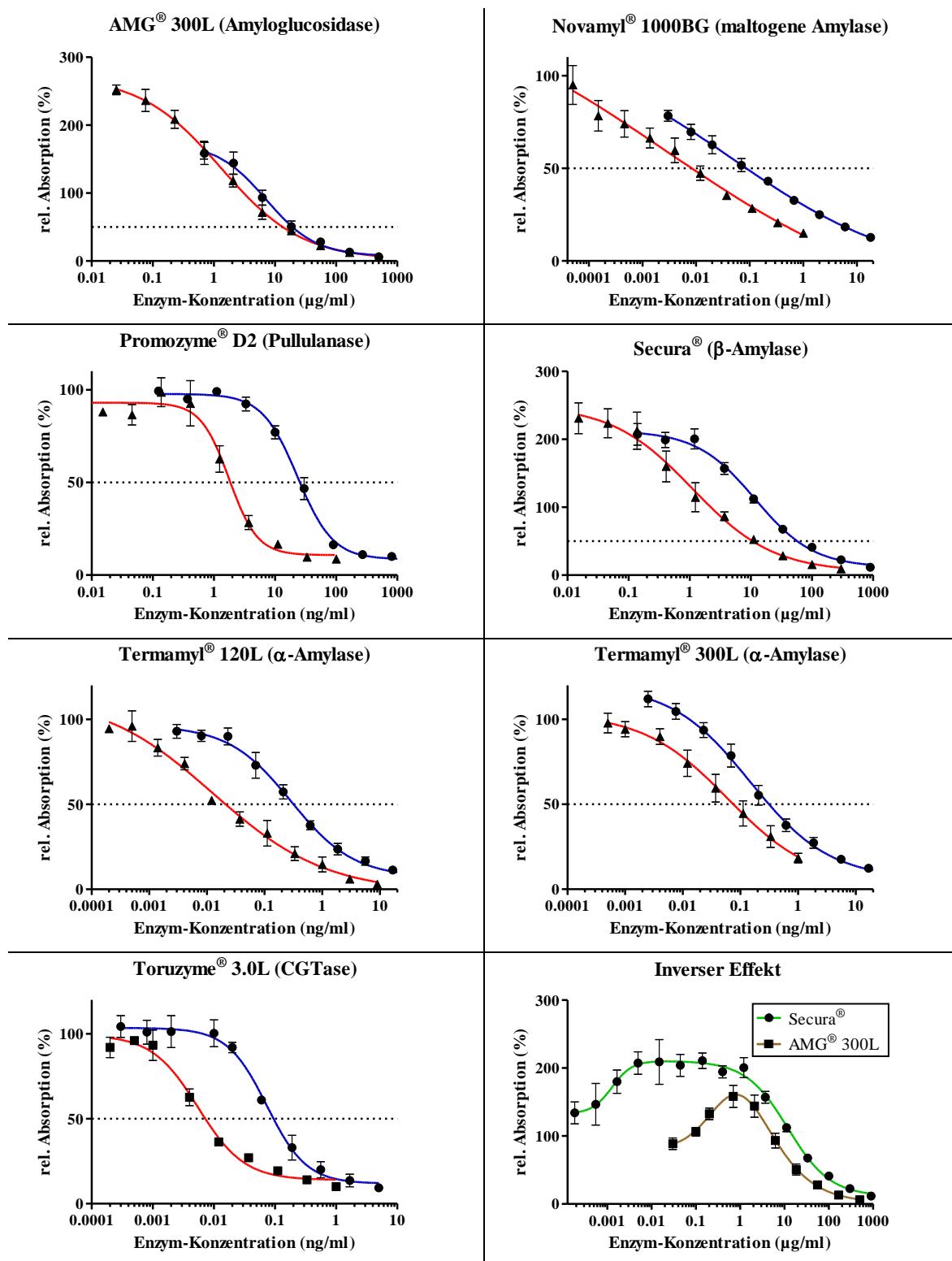


Abbildung 14: Nachweisbarkeit verschiedener amylolytischer Enzyme im optimierten Test in Abhängigkeit von den für den Vorverdau eingesetzten Inkubationszeiten. Der Vorverdau der Ansätze erfolgte bei 60 °C entweder für 2 h (blaue Linie) oder für 18 h (rote Linie). Zusätzlich wurde das Verhalten von AMG® 300L und Secura® nach 2 h bei 60 °C genauer untersucht (unten rechts). Die Werte der Kontrollansätze ohne Enzym-Zusatz wurden gleich 100 % gesetzt.

6 Anwendbarkeit des neu entwickelten Testsystems

6.1 Implementierung von Kontrollansätzen

Anders als bei den bisherigen Versuchen, bei denen die Enzyme lediglich in Puffer verdünnt wurden, ist bei Einsatz von Probenmaterial eine unspezifische Beeinflussung des Testsystems nicht auszuschließen. Zur Erkennung möglicher falsch-positiver Untersuchungsergebnisse, die unter Umständen durch hemmende Probenmatrix-Effekte entstehen, wurden Kontrollansätze etabliert, bei denen RBB-markierte Polysucrose-Konjugate als „Substrat“ eingesetzt wurden. Polysucrose kann von amylolytischen Enzymen nicht abgebaut werden. Das synthetische Polysaccharid wurde zu diesem Zweck, ähnlich den Stärke(derivaten), mit RBB markiert. Die bei 592 nm gemessene Absorption des dialysierten Kopplungsansatzes lag bei ca. 0,16 und bestätigt damit die Effizienz der Kopplung (Abb. 15 A). Auch bei Einsatz im Sandwich-EIA war das RBB-Konjugat sehr gut nachweisbar, wobei eine Extinktion von 1,0 bei ca. 16 ng Polysucrose/ml erreicht wurde (Abb. 15 B).

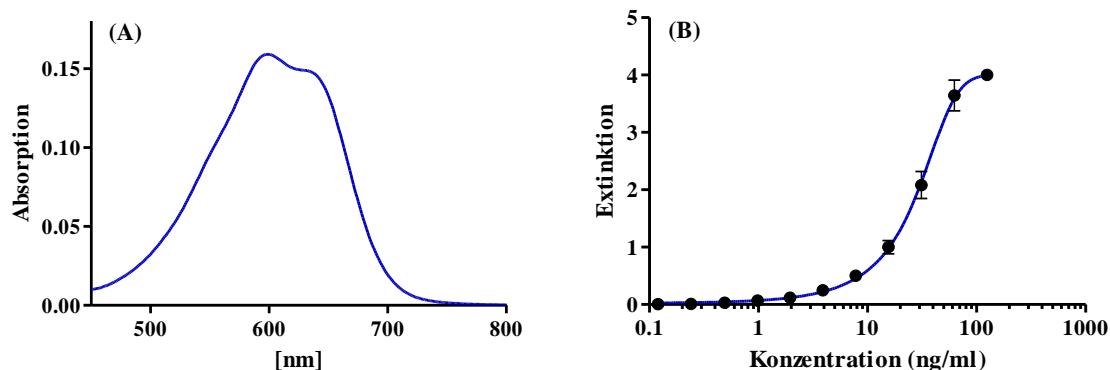


Abbildung 15: Charakterisierung von RBB-markierter Polysucrose. (A) Spektralanalyse (Konzentration: 0,4 mg Polysucrose/ml), (B) Reaktivität im 2C7-Sandwich-EIA.

Entscheidend für die Eignung des Polysaccharids als Kontrollansatz ist eine hohe Stabilität. Untersuchungen im pH-Bereich von 5,0 bis 7,0 bestätigten die hohe Stabilität, nach Einsatz im 2C7-Sandwich-EIA wurden nahezu identische Absorptionswerte erhalten (Abb. 16 A). Lediglich bei pH 8,0 wurde eine geringfügige Reduktion der Messwerte im EIA beobachtet, wobei die mittlere relative Absorption aber immer noch bei $\geq 90\%$ lag. Auch bei Inkubation mit diversen amylolytischen Enzymen, die in sehr hohen Konzentrationen eingesetzt wurden (0,5 – 31 mg/ml), erwies sich RBB-Polysucrose als äußerst stabil (Abb. 16 B). Keine der getesteten Enzym-Präparationen war in der Lage das Kontrollsubstrat abzubauen, eine

signifikante Abnahme der Extinktionswerte im EIA wurde nicht beobachtet. Dies gilt auch für die getestete α -Glucosidase (E-TSAGS).

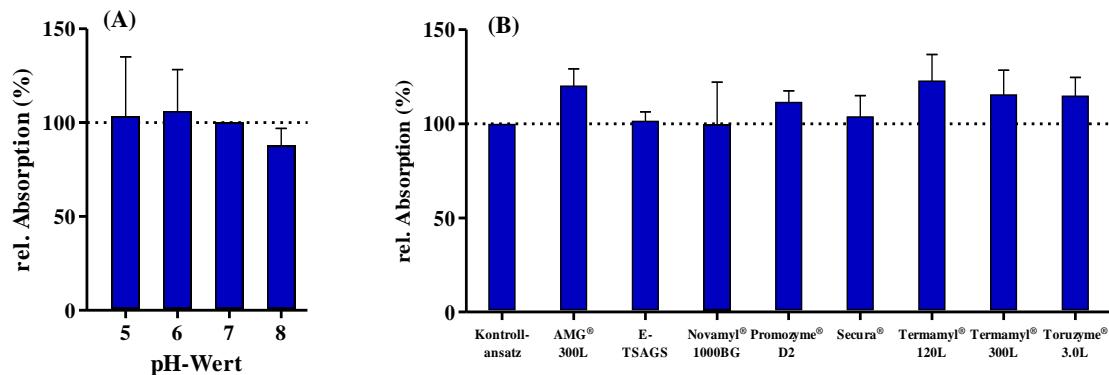


Abbildung 16: Robustheit des RBB-Polysucrose-Konjugats. (A) pH-Stabilität, (B) Resistenz gegenüber amyloytischen Enzymen. Das Konjugat wurde dazu bei verschiedenen pH-Werten bzw. mit unterschiedlichen Enzym-Präparationen (vgl. Tab. 6) für 2 h bei 60 °C inkubiert (mit 0,1 % BSA im Testansatz). Dargestellt sind die im 2C7-Sandwich-EIA ermittelten relativen Absorptionen, wobei der Ansatz mit pH 7,0 bzw. der Kontrollansatz ohne Enzym-Zusatz gleich 100 % gesetzt wurde.

6.2 Überprüfung der Probenmatrix-Kompatibilität

Das abbaustabile Kontrollsubstrat erlaubte eine detailliertere Untersuchung des Einflusses verschiedener Milchprodukte bzw. Rohwaren auf das neu entwickelte Testsystem. Bei den nachfolgenden Tests wurden standardmäßig die Proben im Verhältnis 1:3 (w/w) verdünnt, mit RBB-(l)-Mdx (Kopplungsverhältnis 1:40) bzw. RBB-Polysucrose versetzt und nach 18 h bei 60 °C im 2C7-Sandwich-EIA eingesetzt. Das Testsystem zeigte sich dabei als relativ robust. Besonders wenig Einfluss hatten Probenmatrices wie Fruchtzubereitung, Glukose-Sirup, H-Milch (1,5 % Fett), weißer Zucker sowie eine als Modell eingesetzte Apfel-Aroma-Präparation (Abb. 17). Die Absorptionswerte beider RBB-Konjugate wichen dabei nur um maximal 8 % von der Probenmatrix-freien Kontrolle ab. Der Einsatz von Fruchtjoghurt bzw. Pudding führte hingegen zu geringgradig reduzierten relativen Absorptionen von 81 bis 86 % (Abb. 17). Dieser Effekt war unabhängig vom verwendeten Substrat und betraf sowohl die Ansätze mit RBB-(l)-Mdx als auch die Ansätze mit RBB-Polysucrose. Die Ergebnisse für diese beiden Probenmatrices zeigen somit, dass eine Matrix-bedingte Beeinflussung des Sandwich-EIAs durch den auf RBB-Polysucrose basierenden Kontrollansatz zuverlässig erkannt werden kann. Falsch-positive Ergebnisse werden so vermieden.

Eindeutig positive Ergebnisse wurden hingegen für das eingesetzte Vanille-Aroma erhalten. Wurde das Aroma mit RBB-(l)-Mdx vorinkubiert, lag die relative EIA-Absorption bei ca. 49 %, bei Zusatz von RBB-Polysucrose hingegen wurde kein hemmender Effekt sichtbar (Abb. 17). Die Aroma-Präparation muss also amylolytische Enzyme enthalten, die zu einem Abbau von RBB-(l)-Mdx führten, RBB-Polysucrose konnte hingegen aufgrund der hohen Resistenz gegenüber amylolytischen Enzymen nicht abgebaut werden.

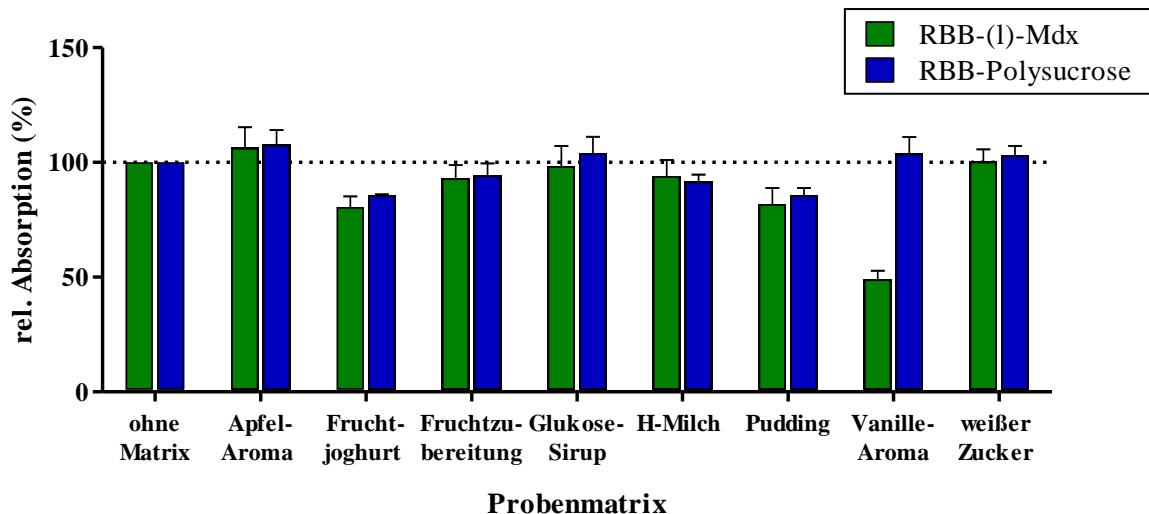


Abbildung 17: Einfluss verschiedener Probenmatrices auf die Nachweisbarkeit des Kontroll- (RBB-Polysucrose) bzw. Analysesubstrats [RBB-(l)-Mdx (1:40)] im optimierten Test. Absorbtionen der Ansätze ohne Probenmatrix wurden gleich 100 % gesetzt.

Die weitere Validierung des Testsystems erfolgte anhand der Untersuchung von künstlich kontaminierten Proben, wobei sich das Kontaminationsniveau an der in den Modellversuchen (IV.2) ermittelten technologischen Störgrenze orientierte. Dazu wurden die im 2C7-Sandwich-EIA gemessenen Absorbtionen mit den Messwerten von probenhaltigen Ansätzen ohne Enzym-Zusatz verglichen. Dabei zeigte sich, dass bei den untersuchten stärkehaltigen Milchprodukten (Fruchtjoghurt bzw. Pudding) die eingesetzten, sehr niedrigen Enzym-Konzentrationen nur noch sehr schlecht nachweisbar waren. Bei Amylase-Zusatz lagen die relativen Absorbtionen der Ansätze mit Probenmaterial im Bereich von 66 – 68 %, während ohne Probenmatrix eine relative Absorbtion von 25 % erreicht wurde (Abb. 18). Etwas bessere Ergebnisse wurden für Glukose-Sirup-Proben erhalten, die relativen Absorptionswerte lagen hier bei 59 %. Aufgrund der vergleichsweise einfachen Matrix des Glukose-Sirups wurde versucht, ob durch eine Aufkonzentration der Proben mit Amicon®-Filttereinheiten (MWCO 30 kDa) ein verbesserter Nachweis erreicht werden kann. In der Tat wurde durch diese Vorbehandlung die Amylase-Nachweisbarkeit

erheblich gesteigert, für amylasehaltige Ansätze wurde danach eine relative Absorption von ca. 43 % erzielt (Abb. 18). Aufgrund der komplexen Probenmatrix von stärkehaltigen Milchprodukten war bei diesen Proben eine Aufbereitung mittels Amicon®-Filtereinheiten jedoch nicht möglich. Um störende Probenbestandteile zu entfernen wurden die Proben stattdessen, ähnlich dem Extraktionsverfahren des Megazyme-Tests, für 3 min bei 11000 x g zentrifugiert. Der gewonnene Überstand wurde dann weiter untersucht. Entgegen den Erwartungen führte diese Probenaufbereitung jedoch nicht zu einer gesteigerten Amylase-Nachweisbarkeit (Abb. 18).

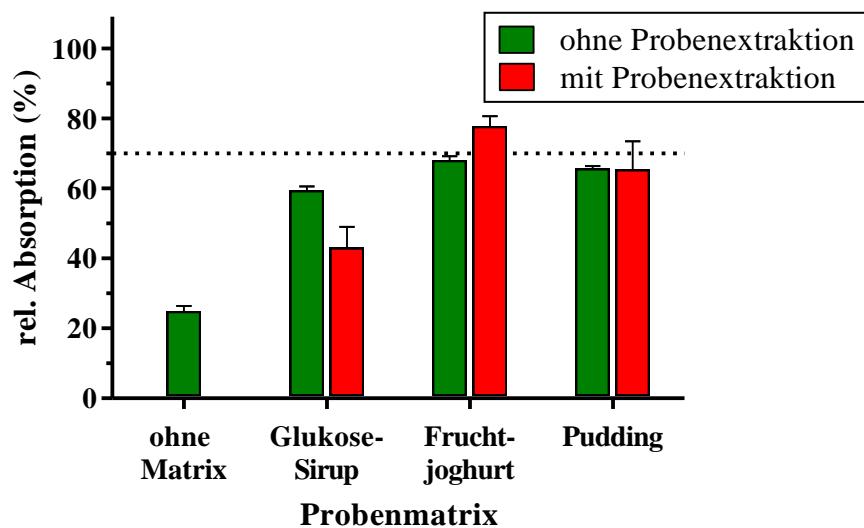


Abbildung 18: Analyse komplexer Probenmatrices im optimierten Testsystem. Die Proben wurden mit Termamyl® 300L (1 ng Enzym/g) versetzt und sowohl mit als auch ohne vorherige Aufbereitung untersucht. Ansätze ohne Amylase-Zusatz wurden gleich 100 % gesetzt. Die gestrichelte Linie entspricht der Nachweisgrenze des Testsystems.

Zur Abklärung der Ursache für diese geringe Nachweisbarkeit wurden in weiteren Versuchsreihen stärkehaltige Testansätze analysiert. Es zeigte sich, dass mit zunehmendem Stärke-Gehalt der Abbau des RBB-Substrats stark zurückgeht. So konnte bei Proben mit 0,03 % Stärke-Gehalt eine mittlere relative Absorption von 47 % festgestellt werden, bei Gehalten von 8 % Stärke lag der Wert hingegen bei 100 % (Abb. 19), ein Abbau des zugesetzten Analysesubstrats [RBB-(I)-Mdx (1:40)] wurde somit durch die vorhandene Stärke vollständig unterbunden.

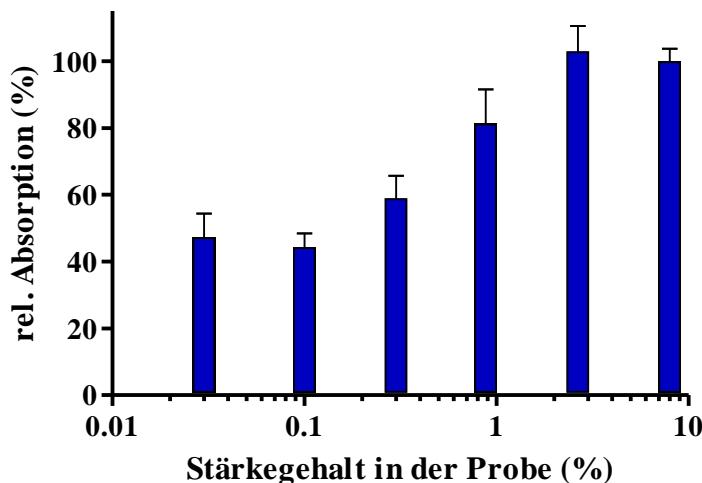


Abbildung 19: Effekt stärkehaltiger Proben auf die nachweisbare Amylase-Aktivität im optimierten Test. Als Modell dienten stärkehaltige Lösungen, die mit Termamyl® 300L (1 ng Enzym/ml) versetzt wurden. Ansätze ohne Amylase-Zusatz wurden gleich 100 % gesetzt.

Bei nicht stärkehaltigen Proben konnten die amylolytischen Enzyme hochsensitiv nachgewiesen werden. Hierbei wurden neben Termamyl® 300L auch andere, für die Produktverflüssigung relevante, amylolytische Enzyme überprüft. Die Probenmatrix „Milch“ wurde dazu mit Enzym-Konzentrationen versetzt, die der minimalen technologischen Störgrenze des jeweiligen Enzyms entsprachen (vgl. Tab. 6). Die anderen untersuchten Rohwaren, wie Aromen, Fruchtzubereitung, Glukose-Sirup und Zucker, wurden hingegen mit 10-fach höheren Enzym-Mengen künstlich kontaminiert, da diese Rohwaren im verzehrfertigen Produkt max. einen Anteil von 10 % ausmachen. Unabhängig von der Probenmatrix konnten dabei sämtliche kommerziellen Enzyme problemlos nachgewiesen werden, wobei die mittleren relativen Absorptionswerte stets $\leq 60\%$ lagen (Tab. 12). Außerdem variierten die bei unabhängigen Testdurchführungen ermittelten Werte nur geringfügig, so lag die Interassay-Standardabweichung bei maximal 13 % (Tab. 12).

Tabelle 12: Anwendbarkeit des optimierten Nachweisverfahrens zur Untersuchung von stärkefreien Rohwaren. Angegeben ist die mittlere relative Absorption (%) \pm Standardabweichung von 3 unabhängig voneinander durchgeführten Versuchsansätzen. Der Absorptionswert des Kontrollansatzes ohne Enzym-Zusatz wurde gleich 100 % gesetzt, Werte von $\leq 70\%$ entsprechen positiven Messergebnissen.

Enzym-Präparation	Enzym-Zusatz	Apfel-Aroma	Frucht-zubereitung	Glukose-Sirup ¹	H-Milch ²	Vanille-Aroma	weißer Zucker
Novamyl® 1000BG	1 µg/g	33 \pm 7	29 \pm 5	53 \pm 4	45 \pm 5	38 \pm 1	56 \pm 5
Promozyme® D2	10 µg/g	4 \pm 1	6 \pm 2	60 \pm 6	8 \pm 1	4 \pm 1	7 \pm 1
Termamyl® 120L	10 ng/g	24 \pm 8	8 \pm 1	14 \pm 2	23 \pm 5	12 \pm 2	16 \pm 1
Termamyl® 300L	10 ng/g	17 \pm 3	8 \pm 4	15 \pm 2	16 \pm 6	9 \pm 3	12 \pm 5
Toruzyme® 3.0L	10 ng/g	8 \pm 0	11 \pm 2	53 \pm 13	15 \pm 5	9 \pm 1	12 \pm 1

¹ Nach Probenextraktion mittels Amicon®-Filtereinheiten

² Ansätze mit 10-fach geringerer Enzym-Konzentration

Wurden die gleichen Enzyme zu den stärkehaltigen Probenmatrices „Fruchtjoghurt“ bzw. „Pudding“ gegeben, ergab sich hingegen ein anderes Bild. Bei diesen Milcherzeugnissen sollte eine Enzym-Menge äquivalent zur minimalen technologischen Störgrenze detektiert werden. Zwar gelang es, bei Einsatz von Termamyl® 300L derart niedrige Enzym-Gehalte nachzuweisen, die mittleren relativen Absorptionen lagen aber mit 66 % bzw. 68 % relativ dicht an der Detektionsgrenze von 70 % (Tab. 13). Für einen zuverlässigeren Nachweis musste die Präparation, ähnlich den meisten anderen Enzymen, um Faktor 10 höher konzentriert eingesetzt werden. Fruchtjoghurtansätze mit Toruzyme® 3.0L erreichten selbst bei dieser erhöhten Konzentration im Mittel Messwerte, die nur knapp oberhalb des 70 %-Grenzwertes lagen. In diesem Fall waren für einen belastbaren Nachweis Enzym-Gehalte erforderlich, die der 100-fachen technologischen Störgrenze entsprachen (Tab. 13). Während die meisten Enzyme insgesamt ein sehr ähnliches Muster zeigten, wich das Verhalten von Promozyme® D2 deutlich ab. Zwar war im Fruchtjoghurt ein äußerst sensibler Nachweis des Enzyms möglich, wobei sogar die niedrigste, überprüfte Konzentration problemlos detektiert werden konnte. Im Pudding jedoch war selbst beim Ansatz mit dem höchsten, untersuchten Enzym-Gehalt die Aktivität nicht sicher feststellbar (Tab. 13).

Tabelle 13: Anwendbarkeit des optimierten Nachweisverfahrens zur Analyse von stärkehaltigen Milchprodukten. Angegeben ist die mittlere relative Absorption (%) \pm Standardabweichung von 3 unabhängig voneinander durchgeföhrten Versuchsansätzen. Der Absorptionswert des Kontrollansatzes ohne Enzym-Zusatz wurde gleich 100 % gesetzt, Werte von $\leq 70\%$ entsprechen positiven Messergebnissen und sind fett dargestellt.

Enzym-Präparation	minimale technologische Störgrenze ¹	Stärkehaltiger Fruchtjoghurt mit			Stärkehaltiger Pudding mit		
		geringen	mittlerem	hohem	geringen	mittlerem	hohem
		Enzym-Gehalt ²	Enzym-Gehalt ²	Enzym-Gehalt ²	Enzym-Gehalt ²	Enzym-Gehalt ²	Enzym-Gehalt ²
Novamyl® 1000BG	100 ng/g	77 \pm 18	39 \pm 2	18 \pm 1	91 \pm 16	57 \pm 9	27 \pm 6
Promozyme® D2	1 μ g/g	19 \pm 1	8 \pm 0	6 \pm 1	97 \pm 11	99 \pm 12	74 \pm 12
Termamyl® 120L	1 ng/g	80 \pm 2	53 \pm 11	9 \pm 2	78 \pm 19	56 \pm 17	21 \pm 9
Termamyl® 300L	1 ng/g	68 \pm 2	46 \pm 13	8 \pm 2	66 \pm 1	46 \pm 7	16 \pm 4
Toruzyme® 3.0L	1 ng/g	85 \pm 7	75 \pm 4	27 \pm 4	71 \pm 9	50 \pm 7	26 \pm 5

¹ Niedrigste Enzym-Konzentration, die in Modellversuchen zur Produktverflüssigung führte (vgl. Tab. 6)

² Geringer Enzym-Gehalt entspricht der Enzym-spezifischen minimalen technologischen Störgrenze. Ansätze mit mittlerem bzw. hohem Enzym-Gehalt wurden mit 10- bzw. 100-fach höheren Enzym-Konzentrationen versetzt.

6.3 Untersuchung von Realproben

Neben der Analyse von künstlich kontaminierten Proben wurde auch Probenmaterial von tatsächlichen Fehlprodukten bzw. deren Rohwaren untersucht. Als besonders auffällig erwies sich ein natürliches Aroma, das bei der Herstellung eines verflüssigten Produkts verwendet worden war. Nach einer Inkubation für 18 h bei 60 °C waren selbst bei Testansätzen mit 1:10⁶ verdünntem Aroma noch amylolytische Aktivitäten nachweisbar (Abb. 20). Verglichen mit der Amylase-Präparation Termamyl® 300L entspricht die im unverdünnten Aroma enthaltene Enzym-Menge in etwa einer Konzentration von 20 µg Amylase/ml. Durch Parallelansätze mit RBB-Polysucrose konnte zudem eine unspezifische Beeinflussung des EIAs durch die Aroma-Probenmatrix ausgeschlossen werden. Bei der Untersuchung des entsprechenden, verflüssigten Milchprodukts (Pudding) wurden hingegen negative Ergebnisse erhalten. Die relativen Absorptionen der Ansätze mit RBB-(l)-Mdx bzw. mit RBB-Polysucrose unterschieden sich dabei kaum (Ergebnisse nicht dargestellt). Auch in den Modellversuchen zur Produktverflüssigung (IV.2) wurden bei Einsatz des betroffenen Produkts keine amylolytischen Aktivitäten nachgewiesen. Der Grund hierfür lag vermutlich im Alter der Probe (> 1 Jahr) und einer damit einhergehenden Abnahme der Enzym-Aktivität.

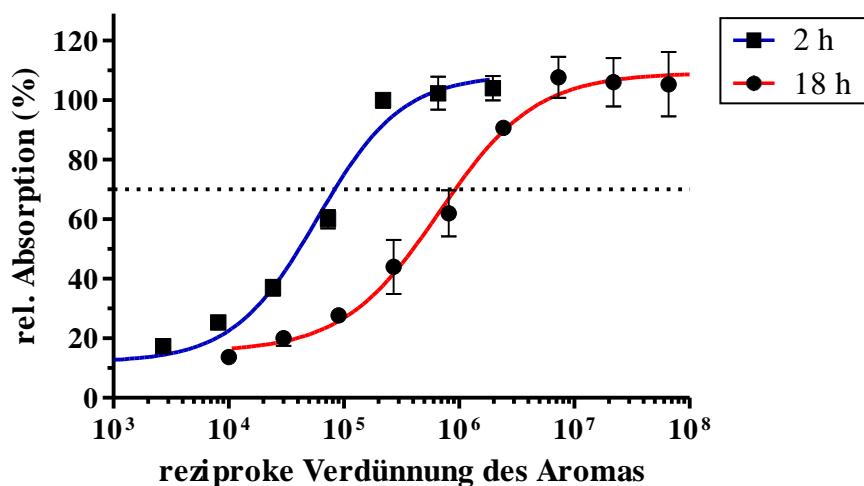


Abbildung 20: Analyse einer auffälligen Aroma-Präparation unter Verwendung des optimierten Testsystems mit 2 h bzw. 18 h Vorverdau. Die Absorption von Aroma-freien Kontrollansätzen wurde gleich 100 % gesetzt.

Da bei diesem Verdachtsfall das Aroma als mögliche Kontaminationsquelle identifiziert werden konnte, wurden weitere, im Handel erhältliche Aroma-Präparationen auf eine mögliche Kontamination mit amylolytischen Enzymen untersucht. Die meisten untersuchten

Aromen erwiesen dabei sich als negativ (Tab. 14). Bei einigen Präparationen konnte jedoch eindeutig eine Kontamination mit amylolytischen Enzymen festgestellt werden. Dazu zählte das bereits bei der Überprüfung der Probenmatrix-Kompatibilität (IV.6.2) auffällige Vanille-Aroma sowie eine Nuss-Aroma-Präparation, die ebenfalls deutlich positiv im neu entwickelten Test reagierte (Tab. 14). Eine Verunreinigung von Aroma-Präparationen mit amylolytischen Enzymen scheint also relativ häufig aufzutreten.

Tabelle 14: Untersuchung von diversen im Handel erhältlichen Aromen mittels optimiertem Amylase-Nachweis. Die Präparationen wurden dazu im Verhältnis 1:3 (w/w) verdünnt und ohne weitere Vorbehandlung für 18 h mit dem Substrat inkubiert. Angegeben ist die relative Absorption (%). Die Absorptionswerte ohne Probenmaterial wurden gleich 100 % gesetzt.

Untersuchte Probe	RBB-(I)-Mdx	RBB-Polysucrose
Apfel-Aroma	106	108
Erdbeer-Aroma	83	103
Honig-Aroma	113	113
Karamell-Aroma	76	105
Nuss-Aroma	57	114
Rum-Aroma	97	111
Schokoladen-Aroma	108	120
Vanille-Aroma	49	98

Um mögliche alternative Einsatzbereiche des neu entwickelten Tests zu überprüfen, wurden darüber hinaus auch weitere, potenziell amylasehaltige Lebensmittel untersucht. Abgesehen von Honig und Mehl, die natürlicherweise Amylase enthalten, wurde auch Rohrzucker, der evtl. Rückstände von technischen Enzymen aufweist, auf mögliche amylolytische Enzym-Aktivitäten getestet. Selbst ohne weitere Anpassung der Inkubationsbedingungen während des Vorverdaus (18 h bei 60 °C) war bei allen probenhaltigen Ansätzen ein Abbau des Analysesubstrats sichtbar (Abb. 21). Besonders hoch war die Enzym-Aktivität bei Honig und Rohrzucker (relative Absorption < 14 %). Dagegen konnten bei Einsatz von Mehl – sehr wahrscheinlich bedingt durch den hohen Stärke-Gehalt dieser Probenmatrix – nur relativ geringe Enzym-Aktivitäten festgestellt werden, wobei eine mittlere relative Absorption von 55 % erreicht wurde (Abb. 21). Die Messwerte der Kontrollansätze mit RBB-Polysucrose unterschieden sich dabei nach Proben-Zusatz kaum von den Ergebnissen des Testansatzes ohne Probenmaterial.

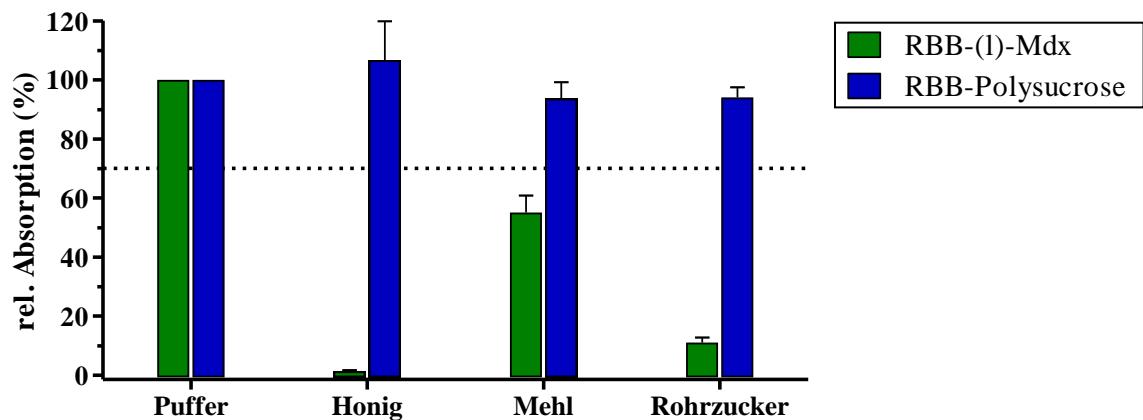


Abbildung 21: Untersuchung von potenziell amylasehaltigen Lebensmitteln mittels optimiertem Amylase-Nachweis. Die Proben wurden dazu im Verhältnis 1:3 (w/w) verdünnt und für 18 h mit dem Substrat vorinkubiert. Der Einsatz von Honig bzw. Rohrzucker erfolgte ohne weitere Vorbehandlung. Ansätze mit Mehl wurden für 3 min bei 11000 x g zentrifugiert und der Überstand für die weitere Untersuchung verwendet. Die Absorptionswerte ohne Probenmaterial wurden gleich 100 % gesetzt.

V DISKUSSION

Entscheidend für die Beliebtheit von Milchprodukten ist neben dem Geschmack auch das Mundgefühl, wobei Verbraucher i.d.R. eine cremige Struktur und eine relativ hohe Viskosität präferieren (Elmore et al., 1999). Um die gewünschten Produkteigenschaften zu erzielen, setzen Hersteller oftmals modifizierte Stärken als Verdickungsmittel ein (Deeth and Lewis, 2017). Wird die zugesetzte Stärke jedoch unerwünschter Weise abgebaut, kommt es zu einer drastischen Verflüssigung der betroffenen Milcherzeugnisse (Tran et al., 2003). Derartige Veränderungen werden sehr wahrscheinlich durch Kontaminationen mit hitzestabilen, amylolytischen Enzymen verursacht und treten oft erst nach längerer Lagerung auf (Barefoot and Adams, 1980). Das verflüssigte Produkt befindet sich zu diesem Zeitpunkt also bereits im Handel, sodass ein Produktrückruf neben einem enormen Image-Schaden auch mit erheblichen finanziellen Folgen für den Hersteller verbunden ist (Velthuis et al., 2009). Eine möglichst frühzeitige Erkennung von belasteten Produkten ist somit für den Produzenten in vielerlei Hinsicht wünschenswert.

Daher war das Ziel der vorliegenden Arbeit, ein vergleichsweise schnell durchführbares Verfahren zu entwickeln, mit dem stärkeabbauende Enzyme in relevanten Lebensmitteln selbst in äußerst geringen Konzentrationen hochsensitiv nachweisbar sind. Dabei wurde ein besonderes Augenmerk auf einen geringen apparativen Aufwand und einen verhältnismäßig unkomplizierten Untersuchungsgang, bei dem auf eine aufwändige Probenextraktion verzichtet werden kann, gelegt. Zudem wurde ein generischer Nachweis verschiedener amylolytischer Enzyme angestrebt, um verdächtige Produkte, zeitgleich neben α -Amylasen, auch auf weitere technisch zur Stärkehydrolyse genutzte Enzyme testen zu können.

1 Testentwicklung

Grundvoraussetzung für die Realisierung des angestrebten Nachweisverfahrens war die Herstellung geeigneter Testreagenzien. Dies umfasste zum einen die Generierung hochaffinier, Hapten-spezifischer Antikörper und zum anderen die Synthese von zum Nachweis von amylolytischen Enzymen geeigneten Enzymsubstraten. Im Hinblick auf die nachhaltige Verfügbarkeit der Immunreagenzien wurde die Entwicklung von mAk angestrebt. Als vielversprechend konnten dabei Antikörper der Klone 2C7 bzw. 3B5 identifiziert werden, da sie neben einer hohen Affinität gegen das zur Substratmarkierung eingesetzte RBB, auch eine ausgeprägte Stabilität gegenüber variablen, externen Einflüssen, wie pH-Wert, Ionenstärke bzw. NaCl-Konzentration, zeigten. Vorteilhaft für die

Einsetzbarkeit im avisierten Test war außerdem eine geringe Kreuzreaktion der mAk mit RBB-ähnlichen Lebensmittelfarbstoffen. Bei hoher Kreuzreakтивität käme es im späteren Test bei Einsatz von farbstoffhaltigen Lebensmittelproben durch Hemmung der Antikörperbindung möglicherweise zu falsch-positiven Ergebnissen. Wie sich zeigte, reagierten jedoch beide mAk nur äußerst schwach mit den überprüften Lebensmittel-farbstoffen. So war unter Realbedingungen bei Einsatz der maximal zulässigen Farbstoff-Konzentration keine Beeinträchtigung der auf mAk 2C7 bzw. mAk 3B5 basierenden Sandwich-EIAs feststellbar.

Darüber hinaus war für die Testentwicklung auch die Herstellung von Hapten-markierten Enzymsubstraten erforderlich. In Anlehnung an ein von Rinderknecht et al. bereits 1967 beschriebenes Verfahren, konnten Mehrfachzucker mit unterschiedlicher Kettenlänge schnell, unkompliziert und reproduzierbar mit RBB markiert werden. Diese niedermolekulare, zur Gruppe der Reaktivfarbstoffe zählende Verbindung spielt in der Lebensmittelindustrie i.d.R. keine Rolle, sondern wird vielmehr zur Färbung von Textilien verwendet (Gök et al., 2010). RBB-Rückstände in Lebensmitteln, die theoretisch, aufgrund hemmender Effekte auf das Testsystem, zu falsch-positiven Ergebnissen führen könnten, sind daher nicht zu erwarten. Durch den effektiven Reaktionsmechanismus von RBB, bei dem der Farbstoff im alkalischen Milieu kovalent an verschiedene funktionelle Gruppen bindet (Heyna, 1962, Weber and Stickney, 1993), war eine effiziente Markierung der Mehrfachzucker möglich. Sowohl mittels Spektralanalyse als auch bei Einsatz im Sandwich-EIA zeigte sich, dass je nach Kopplungsansatz erfolgreich Substratvarianten mit unterschiedlicher Kopplungsdichte erzeugt werden konnten.

Im Hinblick auf die Robustheit des Testverfahrens ist natürlich die Stabilität dieser als Enzymsubstrat eingesetzten RBB-Konjugate von entscheidender Bedeutung. In ersten Untersuchungen, bei denen die RBB-Konjugate für 2 h bei 60 °C inkubiert wurden, war allerdings nach dieser Inkubation nur mehr ein Bruchteil der ursprünglichen Reaktivität im EIA nachweisbar. Durch Zusatz von BSA, das auch zur Stabilisierung von Antikörpern eingesetzt wird (Sakaki et al., 1999), konnte aber eine hohe Stabilität des markierten Substrats erreicht werden. Mit BSA im Testansatz zeigten sich die RBB-Mehrfachzucker auch bei abweichenden pH-Werten (5,0 – 8,0) als äußerst robust, auch nach einer Inkubation von bis zu 18 h bei 60 °C lagen die Rest-Reaktivitäten deutlich über 90 %. Dies ist insbesondere für die Untersuchung von Milchprodukten relevant, da mit dem angestrebten Nachweisverfahren auch leicht saure Proben, wie z.B. Joghurt (Al-Haddad, 2003), überprüft werden sollen.

Diese hohe Substratstabilität war die Grundvoraussetzung für eine genauere Überprüfung der markierten Stärke(derivate). Von besonderem Interesse war zunächst, inwiefern sich die verschiedenen Substratvarianten zum Nachweis von Amylase-Aktivitäten eignen. Prinzipiell wurden dabei umso schlechtere Nachweisempfindlichkeiten festgestellt, je höher die Markierungsdichte des eingesetzten Substrates und je längerkettiger das verwendete Stärke(derivat) war. Beide Effekte lassen sich relativ einfach durch das zugrundeliegende Testprinzip erklären. Bei niedrigen Amylase-Konzentrationen in der Probe entstehen sowohl bei Einsatz von Substraten mit hoher Markierungsdichte als auch mit zunehmender Kettenlänge eher Spaltprodukte, die nach wie vor mehrfach mit RBB markiert sind und die dadurch im EIA immer noch eine hohe Reaktivität zeigen. In diesen Fällen ändert sich trotz Abbau des Substrats die gemessene Signalintensität nicht oder nur geringgradig. Im Fall der Kettenlänge war aber bei Einsatz von sehr kurzkettigen Mehrfachzuckern [Dextrose-Äquivalent 13 – 17; (s)-Mdx] trotzdem ein negativer Effekt auf die Testsensitivität zu beobachten. Dies ist vermutlich auf die Enzym-spezifische Substrataffinität der untersuchten Amylase zurückzuführen, da Substrate, die lediglich aus wenigen Glukose-Monomeren bestehen, von α -Amylasen i.d.R. nur schlecht umgesetzt werden (Iwasa et al., 1974, Govindasamy et al., 1992). Letztendlich erwies sich somit langkettiges Maltodextrin [Dextrose-Äquivalent 4 – 7; (l)-Mdx] mit geringer Markierungsdichte (Kopplungsverhältnis 1:40) als optimales Enzymsubstrat.

Die Reaktivität der verschiedenen, nicht vorverdauten Substrate in den beiden auf mAk 2C7 bzw. mAk 3B5 basierenden EIAs war vergleichbar, wobei mit der letzteren Variante signifikant höhere Messwerte erzielt wurden. Im Hinblick auf die Nachweisbarkeit amylolytischer Aktivitäten unterschieden sich die beiden Testsysteme jedoch massiv. Zwar besaß der mAk 3B5 grundsätzlich eine höhere Affinität zu den RBB-Konjugaten, amylolytische Aktivitäten wurden jedoch um ca. Faktor 650 schlechter nachgewiesen als mit mAk 2C7. Der Grund für die schlechtere Performance des 3B5-basierten Testsystems könnte in der hohen Affinität der eingesetzten Antikörper liegen, da dadurch eventuell auch sehr kleine, gering mit RBB markierte Spaltfragmente im EIA noch erkannt werden. Diese Fragmente können während des Vorverdaus vom zugesetzten Enzym nur schlecht weiter abgebaut werden (Iwasa et al., 1974, Govindasamy et al., 1992). Dagegen wären im 2C7-Sandwich-EIA ähnliche Spaltprodukte, aufgrund der niedrigeren Affinität des mAk 2C7, gar nicht oder nur sehr schlecht nachweisbar. So kommt es selbst bei unvollständigem Abbau des Substrats zu drastisch reduzierten Absorptionswerten. Der durch amylolytische Enzym-Aktivitäten hervorgerufene Effekt auf die im EIA gemessene Absorption ist also bei Verwendung des mAk 2C7 deutlich ausgeprägter als im 3B5-Sandwich-EIA.

Die Empfindlichkeit des entwickelten Testverfahrens ist aber nicht nur vom Sandwich-EIA an sich, sondern auch vom Vorverdau, also der Inkubation der zu untersuchenden Probe zusammen mit dem markierten Stärkederivat, abhängig. Aus diesem Grund wurden auch die wesentlichen Parameter dieses Untersuchungsschrittes, nämlich Temperatur, Zeit, Substratkonzentration sowie Zusammensetzung des verwendeten Puffers, überprüft und optimiert. In der Regel werden bei Amylase-Tests Calcium-haltige Puffer bevorzugt, denn die zweiwertigen Ionen wirken als wichtige Cofaktoren und können die Stabilität ebenso wie die Aktivität des Enzyms deutlich erhöhen (Madsen et al., 1973, Eggleston et al., 2013). Daneben beeinflusst auch der pH-Wert des Puffers die Enzym-Aktivität maßgeblich (Bisswanger, 2014). Im Fall der untersuchten, technischen Enzyme lag das Aktivitäts-Optimum bei pH 3,5 – 6,5 (Tab. 6), daher sollte auch der im Vorverdau eingesetzte Puffer einen ähnlichen pH-Wert aufweisen. Um zudem mögliche Probenmatrix-bedingte pH-Veränderungen besser ausgleichen zu können und gleichbleibende, reproduzierbare Testbedingungen zu schaffen, sind außerdem Verdünnungslösungen mit hoher Pufferkapazität von Vorteil (Karow et al., 2013). Im Hinblick auf diese Anforderungen erwies sich der überprüfte Calcium-haltige Malat-Puffer (50 mM; pH 5,4) mit Zusatz von 0,1 % BSA als besonders geeignet, der in seiner Zusammensetzung dem Puffer des Megazyme-Tests ähnelt (Megazyme, 2019).

Darüber hinaus wurde auch der Einfluss von verschiedenen Substrat-Gehalten im Testansatz überprüft. Theoretisch ist es sinnvoll, das Analysesubstrat in einer möglichst hohen Konzentration einzusetzen, denn i.d.R. wird so die maximale Geschwindigkeit einer Enzym-Reaktion erreicht (Michaelis and Menten, 1913, Bisswanger, 2014). Dies ist bei kommerziellen Amylase-Nachweisverfahren (Phadebas® Amylase Test bzw. alpha-Amylase-Assay der Firma Megazyme) für gewöhnlich problemlos möglich, denn die Testprinzipien beruhen auf dem Nachweis des durch Enzym-Aktivität entstandenen Abbauproduktes (Barnes and Blakeney, 1974, Cornaggia et al., 2016). Da jedoch im neu entwickelten Testsystem nicht das Spaltprodukt, sondern das intakte Substrat nachgewiesen wird, wirkt sich prinzipiell der Einsatz von sehr hohen Substratkonzentrationen negativ auf die Testempfindlichkeit aus. Die Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit zeigten, dass bei Einsatz von Substratkonzentrationen von 1 µg/ml die höchste Testsensitivität erreicht wird. Höhere (2 µg/ml) wie auch sehr niedrige (0,125 µg/ml) Substrat-Gehalte führen tendenziell eher zu einer geringgradigen Verschlechterung des Nachweises.

Im Weiteren wurde die während des Vorverdaus vorherrschende Inkubationstemperatur an das typischerweise hohe Temperatur-Optimum industriell eingesetzter Enzyme angepasst

(Bisgaard-Frantzen et al., 1999). Eine detaillierte Untersuchung der Amylase-Präparation Termamyl® 300L mittels Phadebas- bzw. Megazyme-Test bestätigte eine deutlich gesteigerte Enzym-Aktivität bei erhöhten Temperaturen. Da auch weitere in der Lebensmittelindustrie eingesetzte, kommerzielle Enzym-Präparationen nach Herstellerangaben im Bereich von 55 – 95 °C die höchste Aktivität aufweisen (vgl. Tab. 6), wurde der Vorverdau routinemäßig bei 60 °C durchgeführt. Von einer weiteren Temperaturerhöhung wurde abgesehen, da bei stärkerer Erhitzung eine zunehmende Inaktivierung der Enzyme zu erwarten ist (Hmidet et al., 2008).

Zudem ist auch die Dauer der Inkubation ein wichtiger Faktor, der die nachweisbare Enzym-Aktivität entscheidend beeinflusst. Für eine hohe Testempfindlichkeit kommen i.d.R. möglichst lange Inkubationszeiten zum Einsatz. So werden bspw. bei dem von Reichenberger et al. (2020) beschriebenen enzymatischen Amylase-Nachweis die Ansätze für 24 h inkubiert. Auch im neu entwickelten Test konnten die überprüften, amylolytischen Enzyme mit 18-stündiger Inkubation wesentlich sensitiver nachgewiesen werden als bei einer Inkubationsdauer von 2 h. Durchschnittlich wurde dabei eine Steigerung um etwa Faktor 7 beobachtet. Je nach Enzym wurden dabei unterschiedliche Nachweisgrenzen festgestellt. Ein Vergleich dieser auf der Masse-Konzentration des jeweiligen Enzyms basierenden Nachweisgrenzen ist schwierig, denn jedes Enzym besitzt eine spezifische Aktivität (MacGregor and Morgan, 1992). Das Verhältnis von Enzym-Konzentration (Protein-Gehalt) zur Aktivität ist demnach stark vom jeweiligen Enzym abhängig.

Dennoch war auffällig, dass einige Enzyme, wie β -Amylase, Amyloglucosidase bzw. α -Glucosidase nur in hohen Konzentrationen (μg -Bereich) bzw. gar nicht nachweisbar waren, während α -Amylasen und CGTase schon bei Einsatz weniger Pikogramm messbare Aktivitäten zeigten. Die Nachweisgrenzen von maltogener Amylase und Pullulanase lagen zwischen diesen beiden Extremen. Dieses Verhalten lässt sich möglicherweise mit der spezifischen Wirkungsweise erklären, mit der die Enzyme das angebotene Substrat umsetzen. Zum Beispiel sind α -Amylasen in der Lage glykosidische Bindungen innerhalb des Substratmoleküls zu hydrolysieren (Iwasa et al., 1974, Vukelić et al., 1992) und führen damit schnell und effizient zur Bildung von farbstoffarmen Spaltprodukten, wodurch es wie erwünscht zu einer reduzierten Absorption im EIA kommt. Auch CGTasen wirken auf innermolekulare, glykosidische Bindungen (Leemhuis et al., 2003) und sind daher, ähnlich den α -Amylasen, sehr sensitiv im innovativen Testsystem nachweisbar. Etwas schlechter konnte hingegen die überprüfte Pullulanase nachgewiesen werden. Dieses entzweigende (debranching) Enzym hydrolysiert i.d.R. spezifisch $\alpha 1 \rightarrow 6$ -glykosidische Bindungen innerhalb des Substrats (Ohba and Ueda, 1975, Nisha and Satyanarayana, 2016). Dadurch

ist zwar ein schneller, aber kein vollständiger Abbau des markierten Maltodextrins möglich, denn es besitzt neben $\alpha 1 \rightarrow 6$ - auch $\alpha 1 \rightarrow 4$ -glykosidische Bindungen (Wang and Wang, 2000, Hofman et al., 2016). Die Enzyme mit schlechter Nachweisbarkeit (β -Amylase, Amyloglucosidase bzw. α -Glucosidase) spalten als Exoamylasen hingegen nach Informationen der Enzymdatenbank BRENDA (Jeske et al., 2018) Stärke bzw. stärkeähnliche Verbindungen vom nicht-reduzierenden Ende ausgehend. Dabei entstehen i.d.R. Mono- bzw. Disaccharide, wobei nur ein langsamer Abbau des RBB-Substrats möglich ist. Ein im EIA nachweisbarer Effekt tritt also erst bei relativ hohen Enzym-Aktivitäten auf, wodurch die schlechte Nachweisbarkeit dieser Enzyme erklärt werden kann. Auch maltogene Amylase wird teilweise als Exoamylase beschrieben (Lagrain et al., 2012), bei genauerer Untersuchung wurde jedoch auch ein α -Amylase-ähnliches Verhalten festgestellt (Christophersen et al., 1998). Dies wiederum erklärt die vergleichsweise gute Nachweisbarkeit dieses Enzyms in entwickelten Test.

Überraschenderweise wurde bei den Untersuchungen mit β -Amylase und Amyloglucosidase teilweise ein inverser Effekt festgestellt, d.h. im Vergleich zum Enzym-freien Kontrollansatz wurden bei Einsatz von geringen Enzym-Konzentrationen im EIA deutlich erhöhte Messwerte erhalten. Die Ursache hierfür konnte letztendlich nicht geklärt werden. Vorstellbar wäre, dass durch den partiellen Abbau des RBB-Substrats vom nicht-reduzierenden Ende her die sterische Konfiguration des Substrates sich so verändert, dass dem mAk zusätzliche Epitope präsentiert werden. Dies resultiert dann in erhöhten EIA-Messwerten. Die anderen Enzyme zeigten keinen derartigen Effekt.

Um einen Vergleich zu anderen Nachweisverfahren zu ermöglichen, wird bei Enzym-Tests nach Möglichkeit die gemessene Enzym-Aktivität in internationalen Einheiten (units, U) oder katal (kat) angegeben, dabei ist es notwendig die Stoffmenge des umgewandelten Substrats exakt bestimmen zu können (Bisswanger, 2014). Dies war jedoch beim neu entwickelten Testverfahren nicht möglich, da es sich bei dem als Substrat eingesetzten Maltodextrin um ein heterogenes Gemisch aus Kohlenhydraten mit variabler Molekülgröße handelt (Avaltroni et al., 2004). Dies ist ein grundlegendes Problem und gilt auch für andere Amylase-Tests, die Stärke als Substrat nutzen (Marciniak and Kula, 1982). Häufig werden aus diesem Grund je nach Testverfahren bzw. Enzym-Hersteller unterschiedliche Aktivitäts-Einheiten angegeben (Eggleston et al., 2008). Daher ist ein Vergleich verschiedener Amylase-Nachweisverfahren i.d.R. nur dann möglich, sofern identische Enzyme parallel eingesetzt werden (Marciniak and Kula, 1982). Zur ungefähren Einschätzung der Testempfindlichkeit wurden in der vorliegenden Arbeit relative Aktivitäts-Äquivalente basierend auf den Ergebnissen des Phadebas-Standardverfahrens definiert (IV.1).

Zur detaillierten Untersuchung der Testsensitivität des neu entwickelten Tests im Vergleich zu den im Handel erhältlichen Nachweisverfahren (Phadebas® Amylase Test bzw. alpha-Amylase-Assay der Firma Megazyme) wurde die α -Amylase-Präparation Termamyl® 300L eingesetzt. Die beiden kommerziellen Testverfahren wurden dazu speziell für den Nachweis von Amylasen mit hohem Temperatur-Optimum modifiziert. Grundsätzlich konnte in den eigenen Untersuchungen gezeigt werden, dass durch Verlängerung der Inkubationszeit, Erhöhung der Inkubationstemperatur und Veränderung des Proben-Puffer-Verhältnisses zugunsten der Probe, die Enzym-Nachweisbarkeit deutlich verbessert werden kann. Ähnlich den Ergebnissen von Eggleston et al. (2013) wurde beim Phadebas-Test außerdem eine Aktivitätssteigerung durch Verwendung von Calcium-haltigem Puffer erreicht.

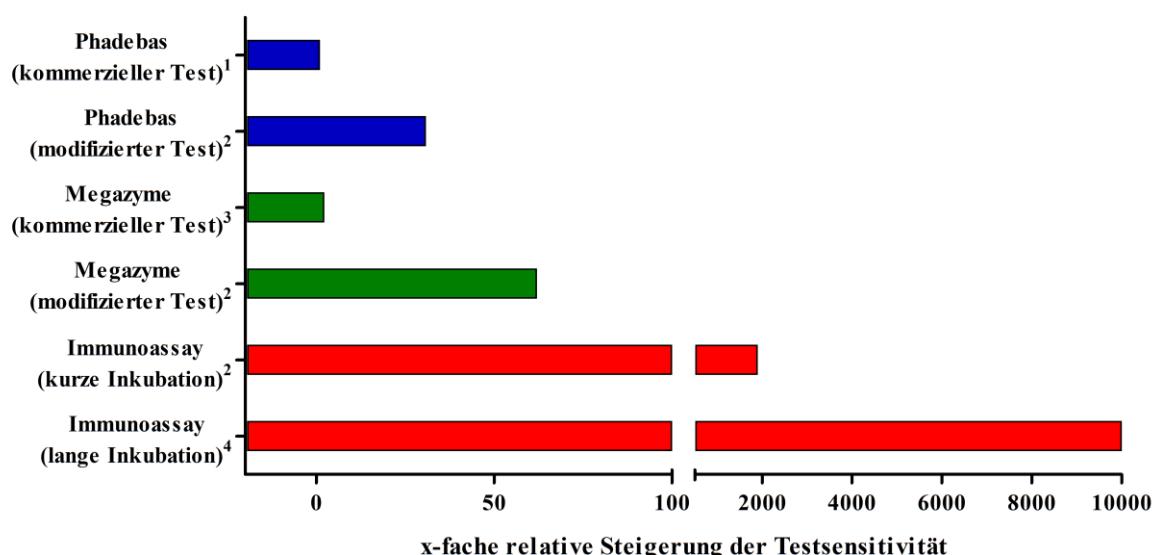


Abbildung 22: Relative Nachweisempfindlichkeit verschiedener Testsysteme im Vergleich zum kommerziellen Phadebas-Test. Dabei wurden die Testansätze für (1) 15 min bei 37 °C, (2) 2 h bei 60 °C, (3) 10 min bei 40 °C bzw. (4) 18 h bei 60 °C inkubiert.

Verglichen mit der Testdurchführung nach Herstellerprotokoll (Phadebas AB, 2018, Megazyme, 2019), resultierten diese Modifikationen in einer massiven Steigerung der Testempfindlichkeit (Abb. 22). Trotzdem waren unter identischen Inkubationsbedingungen (2 h bei 60 °C) die Nachweisgrenzen der optimierten, kommerziellen Tests weiterhin deutlich schlechter als die des neu entwickelten Nachweisverfahrens. Im Vergleich zum „Standard-Phadebas-Tests“ (NWG 190 ng/ml; relatives Äquivalent 78 mU/ml) konnte die Nachweisbarkeit mit dem auf mAk 2C7 basierenden Testsystem bei zweistündigem Vorverdau um etwa Faktor 2000 (NWG 0,1 ng/ml; relatives Äquivalent 41 μ U/ml), bei einer Inkubationsdauer von 18 h sogar um ca. Faktor 10000 auf Werte von 0,019 ng/ml (relatives

Äquivalent 8 µU/ml) gesteigert werden (Abb. 22). Bei anderen Testverfahren, die für den Amylase-Nachweis in Lebensmittelproben optimiert wurden, wurden Nachweisgrenzen von etwa 100 µU/g (Reichenberger et al., 2020) bzw. 3000 µU/ml (Koyama et al., 2013) angegeben.

2 Überprüfung der Anwendbarkeit

Insbesondere auch im Hinblick darauf, dass eine Verflüssigung stärkehaltiger Milchprodukte oft erst Wochen bzw. Monate nach der Herstellung des Produkts auftritt (Barefoot and Adams, 1980), wurde oft spekuliert, dass wohl sehr geringe Amylase-Kontaminationen ausreichen würden, um diesen Verderb hervorzurufen (Eggleson et al., 2013, Koyama et al., 2013, Visvanathan et al., 2020). Erstaunlicherweise finden sich aber in der Literatur keine detaillierten Untersuchungen zu dieser Fragestellung. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden daher entsprechende, orientierende Modellversuche durchgeführt, mit denen belastbare Daten zur technologischen Störgrenze generiert und so sozusagen der Zielkorridor für die tatsächliche Anwendbarkeit des neu entwickelten Testverfahrens abgesteckt werden sollte. Dazu wurden diverse amylolytische Enzyme in verschiedenen Konzentrationen zu unauffälligen, stärkehaltigen Fruchtjoghurts bzw. Puddings gegeben und nach anschließender Inkubation visuell auf Verflüssigung beurteilt. Ähnliche Kontaminationsversuche wurden auch Koyama et al. (2013) durchgeführt, wobei sich diese Untersuchungen auf die Beurteilung von gelatinisierten Stärkesuspensionen konzentrierten. Für praxisrelevante Ergebnisse ist es jedoch sinnvoller, im Handel erhältliche, unauffällige Milcherzeugnisse einzusetzen. Nur so kann der Einfluss der Produkt-spezifischen Zusammensetzung mitberücksichtigt werden. So variierten in den eigenen Untersuchungen in Abhängigkeit vom eingesetzten technischen Enzym die technologischen Störgrenzen z.T. sehr deutlich bei Produkten verschiedener Hersteller. Diese Abweichungen hängen sehr wahrscheinlich mit dem Stärke-Gehalt des jeweiligen Produkts bzw. der Art der vorliegenden Stärke zusammen. So konnte bei Versuchen mit verschiedenen Stärken gezeigt werden, dass die Amylase-Aktivität maßgeblich vom eingesetzten Substrat beeinflusst wird (Konsula and Liakopoulou-Kyriakides, 2004). Andererseits wirken womöglich andere im Milchprodukt vorliegende Verdickungsmittel, wie Carrageen oder Johannisbrotkernmehl (Glück and Thier, 1980), einer amylasebedingten Konsistenzveränderung entgegen und beeinflussen damit auch die jeweilige technologische Störgrenze.

Die Untersuchungen von Koyama et al. (2013) beschränkten sich außerdem auf eine Inkubationsdauer von max. 30 min bei 40 °C. Unter Realbedingungen tritt die Verflüssigung

der Produkte jedoch oft erst Monate nach der Herstellung auf (Barefoot and Adams, 1980). Zur Bestimmung der technologischen Störgrenzen wurde daher in der vorliegenden Arbeit die Inkubationsdauer auf 10 d verlängert und die Bebrütungstemperatur auf 60 °C erhöht. Durch diese veränderten Inkubationsbedingungen konnte eine realistischere Einschätzung der Enzym-spezifischen Verflüssigungseigenschaften erfolgen. Gleichzeitig war aufgrund der Temperaturerhöhung keine monatelange Inkubation der Testansätze notwendig, denn verglichen mit niedrigeren Temperaturen traten die Konsistenzveränderungen bei 60 °C i.d.R. deutlich schneller auf. Dieses Verhalten lässt sich mit den Eigenschaften kommerziell genutzter Enzyme erklären, da sie üblicherweise ein hohes Temperatur-Optimum aufweisen (Bisgaard-Frantzen et al., 1999). Auch die überprüften Enzym-Präparationen erfüllten dieses Kriterium (vgl. Tab. 6). Je nach Enzym waren jedoch sehr unterschiedliche Konzentrationen notwendig, um eine Konsistenzveränderung des Milchprodukts hervorzurufen. So verursachten Exoamylasen wenn überhaupt nur bei sehr hohen Enzym-Gehalten einen sichtbaren Effekt. Da bei Einsatz von α -Glucosidase selbst bei der höchsten, überprüften Konzentrationsstufe (100 µg/g) keine Konsistenzabweichung feststellbar war, wurde sie als mögliche Verflüssigungsursache ausgeschlossen. Auch die bspw. bei der Herstellung von Glukose- bzw. Maltose-Sirup eingesetzten Enzym-Präparationen AMG® 300L (Amyloglucosidase) bzw. Secura® (β -Amylase) führten nur in sehr hohen Konzentrationen von ≥ 10 µg/g zur Produktverflüssigung. Die von der Fa. Novozymes A/S zur Verfügung gestellten Enzym-Präparationen wiesen Enzym-Gehalte von 93 bzw. 59 mg/ml auf. Unter Berücksichtigung der üblicherweise zur Sirup-Produktion empfohlenen Enzym-Dosierung von $\leq 0,15$ % (Madsen et al., 1973, Novozymes A/S, 2002a) und der üblicherweise im Milchbereich eingesetzten Sirup-Konzentration von ≤ 7 % (Herstellerangaben, persönliche Mitteilung) ist eine ausreichende Kontamination im relevanten Konzentrationsbereich nur schwer vorstellbar. Zusätzlich wird der durch Stärkehydrolyse gewonnene Sirupextrakt im Rahmen der Herstellung auch mittels Filtration bzw. Aktivkohle-Behandlung gereinigt, wodurch Proteine entfernt werden (Hobbs, 2009). Aufgrund dieses Prozessschritts erscheint es äußerst unwahrscheinlich, dass eine Kontamination mit β -Amylase bzw. Amyloglucosidase ursächlich für die Verflüssigung von stärkehaltigen Milcherzeugnissen sein kann. Sehr viel plausibler lassen sich die Konsistenzveränderungen durch Verunreinigung mit α -Amidasen bzw. CGTasen erklären. Sie riefen selbst bei Zusatz von 1 ng/g eine drastisch reduzierte Viskosität hervor. Auch für die beiden anderen untersuchten Enzyme (maltogene Amylase bzw. Pullulanase) kann eine ursächliche Beteiligung nicht ausgeschlossen werden. Insgesamt deckte sich das in den Modellversuchen festgestellte Aktivitätsmuster sehr gut mit der Nachweisbarkeit der Enzyme im neu entwickelten

Testsystem und beruhte, wie oben genauer erläutert, vermutlich ebenfalls auf dem Enzymspezifischen Abbauverhalten.

Von elementarer Bedeutung für die Anwendbarkeit des neu entwickelten Nachweisverfahrens ist außerdem, dass trotz Einsatz von komplexen Probenmatrices positive sowie negative Proben auch korrekt als solche erkannt werden. In der Regel erfolgt dies durch entsprechende Kontrollansätze, die die Identifizierung falsch-positiver bzw. falsch-negativer Ergebnisse ermöglichen (Eggleston et al., 2013, Bisswanger, 2014, Reichenberger et al., 2020). So konnten auch im vorliegenden Testsystem falsch-negative Resultate relativ unkompliziert durch Parallel-Ansätze mit künstlich Amylase-kontaminiertem Probenmaterial identifiziert werden. Zur Feststellung von falsch-positiven Messergebnissen wird bei klassischen Enzym-Tests die zu untersuchende Probe üblicherweise mit starken Laugen versetzt, wodurch die Enzymreaktion gestoppt wird (Phadebas AB, 2018, Megazyme, 2019). Dadurch kann der Einfluss der untersuchten Probenmatrix auf das Testsystem beurteilt werden. Eine ähnliche Behandlung der Probe war mit dem vorliegenden Test nicht kompatibel, da hohe pH-Werte zu einer drastisch verminderten Reaktivität der Antikörper und damit zu einer reduzierten Nachweisempfindlichkeit des EIAs führen (Matikainen, 1984). Aus diesem Grund wurden andere Lösungsansätze überprüft. Unter anderem wäre eine Inaktivierung der Enzyme auch durch Hitzeeinwirkung denkbar (Violet and Meunier, 1989). Als problematisch dürften sich dabei jedoch hitzestabile Enzyme erweisen, die eine Wärmebehandlung evtl. überstehen (vgl. Tab. 2). Außerdem wird eine zusätzliche Stabilisierung der Enzyme durch bestimmte Probenmatrix-Bestandteile, wie z.B. Stärke und Proteine, beschrieben (Anderson et al., 1983), wodurch ein einheitliches Inaktivierungs-Verfahren nur schlecht umsetzbar ist.

Eine weitere Möglichkeit bestand darin, ein abbaustabiles RBB-Konjugat, das nicht von amylolytischen Enzymen beeinflusst wird, als Kontrolle einzusetzen. Nach intensiver Recherche erwies sich Polysucrose als vielversprechender Ansatz. Das synthetische Polysaccharid, auch als Ficoll® PM 400 bekannt, findet in vielen Laborbereichen Verwendung und besitzt eine hervorragende Wasserlöslichkeit (Hou et al., 2006). Ähnlich den Stärkederivaten konnte es erfolgreich mit RBB markiert und im Sandwich-EIA sensitiv nachgewiesen werden. Sowohl bei Inkubation mit diversen amylolytischen Enzymen, die dabei in sehr hohen Konzentrationen eingesetzt wurden, als auch bei variablen pH-Werten zeigte sich RBB-Polysucrose als äußerst stabil.

Mit der Herstellung des RBB-markierten Polysucrose-Konjugats gelang es, eine effiziente Vergleichskontrolle zu generieren, mit der bspw. eine Beeinflussung des Testsystems durch Fruchtjoghurt bzw. Pudding erkannt werden konnte. Bei einer anderen Probe, einem gering

kontaminiertem Vanille-Aroma, konnte indirekt durch Zusatz der RBB-Polysucrose die Richtigkeit des Analyseergebnisses bestätigt werden, d.h. das Analysesubstrat RBB-(l)-Mdx wurde abgebaut, das Kontrollsubstrat RBB-Polysucrose hingegen nicht.

Die Anwendbarkeit des Testverfahrens wurde in einem breiten Ansatz anhand verschiedener Probenmatrices und einer breiten Palette an relevanten amylolytischen Enzymen überprüft. Bei der Analyse von Fruchtjoghurt bzw. Pudding wurde die in den Modellversuchen ermittelten, minimalen technologischen Störgrenzen der jeweiligen Enzyme als Zielkonzentration eingesetzt. Im Hinblick auf die erforderlichen Nachweisgrenzen für amylolytische Enzyme in anderen, für die Herstellung von stärkehaltigen Milchprodukten verwendeten Rohwaren, spielen auch noch andere Aspekte eine Rolle. Prinzipiell stellen diese Zutaten nur einen gewissen Anteil des verzehrfertigen Produkts dar, bspw. enthielten die überprüften Fruchtjoghurts laut Packungsangabe ca. 8 % bzw. 10 % Fruchtanteil. Außerdem wird derartigen Milchprodukten in der Regel etwa 8 % Zucker zugesetzt (Stiftung Warentest, 2017). Bei den verwendeten Puddings war ein Zuckeranteil von 12 % bzw. 13 % deklariert. Auch andere Puddingdesserts weisen einen ähnlichen Zucker-Gehalt auf (ÖKO-TEST AG, 2019). Dieser Wert entspricht laut Anhang I der Verordnung (EU) 1169/2011 vom 25. Oktober 2011 (zuletzt geändert am 11.12.2015) dem Anteil sämtlicher im Produkt enthaltener Mono- und Disaccharide. Unter Berücksichtigung des natürlichen Laktose-Gehalts in Puddingdesserts von üblicherweise mind. 3,3 % (Kamensky, 2019), liegt die tatsächlich zugesetzte Menge an Saccharose bzw. Glukose-Sirup somit deutlich unter dem angegebenen Zuckerwert und wurde deshalb auf maximal 10 % geschätzt. Auch Aromen werden den Milchprodukten nur in geringen Mengen beigefügt. Laut Herstellerangaben enthalten Milcherzeugnisse dieser Art in etwa 0,1 % Aroma (persönliche Mitteilung). Im Gegensatz zur Probenmatrix „Milch“, die für gewöhnlich den Hauptanteil von Milchprodukten ausmacht, muss also der Enzym-Gehalt bei Rohwaren, wie Aroma, Fruchtzubereitungen, Glukose-Sirup bzw. Zucker, mindestens 10-fach über den ermittelten technologischen Störgrenzen liegen, um letztendlich eine Produktverflüssigung hervorrufen zu können.

Wurden die Rohwaren mit den entsprechenden Enzym-Mengen künstlich kontaminiert, waren im neu entwickelten Testsystem sämtliche untersuchten Enzyme auf relevantem Konzentrationsniveau zuverlässig und problemlos nachweisbar. In der Regel war hierfür keine Aufbereitung der Proben notwendig, dadurch war eine schnelle und unkomplizierte Analyse möglich. Im Gegensatz dazu werden bei anderen in der Literatur beschriebenen Amylase-Nachweisverfahren häufig aufwändige und zeitintensive Extraktionsprozeduren beschrieben, wobei das Untersuchungsmaterial zunächst vorinkubiert, dann zentrifugiert

und schließlich mittels Entsalzungssäulen gereinigt wird (Koyama et al., 2013, Reichenberger et al., 2020). Einzig beim Nachweis von sehr geringen Enzym-Konzentrationen in der Probenmatrix „Glukose-Sirup“ konnte in der vorliegenden Arbeit auf eine Probenaufbereitung mittels Amicon®-Filtereinheiten (MWCO 30 kDa) nicht verzichtet werden. Glukose und andere Kohlenhydrate mit geringem Molekulargewicht, die wahrscheinlich im Sinne einer Produkthemmung den Amylase-Nachweis behinderten (Hill et al., 1997), können dabei die Filtermembran passieren. Stärkeabbauende Enzyme hingegen, die für gewöhnlich sehr viel höhere Molekülgrößen besitzen (Nigam and Singh, 1995, Sun et al., 2010), wurden zurückgehalten und befanden sich im zur weiteren Untersuchung verwendeten Retentat. Dieses Verfahren war sehr schnell, innerhalb von 15 min, durchführbar und resultierte in einer deutlich verbesserten Nachweisbarkeit.

Neben der Inhibition durch Reaktionsprodukte kann ebenso eine kompetitive Hemmung durch strukturverwandte Substrate zur Verringerung der nachweisbaren Enzym-Aktivität führen (Yamaguchi et al., 2008, Koyama et al., 2013). Dies zeigte sich insbesondere bei der Überprüfung von stärkehaltigen Milchprodukten (Fruchtjoghurt bzw. Pudding), bei denen mit dem Test i.d.R. nur deutlich höhere Enzym-Konzentrationen zuverlässig nachweisbar waren. Vermutlich trat die im Produkt enthaltene Stärke in Konkurrenz mit dem RBB-Substrat, wodurch dieses weniger effizient abgebaut und somit die nachweisbare Enzym-Aktivität abnahm. Diese Annahme wurde in Modellversuchen bestätigt, wobei Testansätze mit Produkt-ähnlichen Stärke-Gehalten gleichermaßen zu einer Hemmung der Amylase-Aktivität führten. Auch bei kommerziellen Amylase-Tests, wie dem Phadebas® Amylase Test, wird ein kompetitiver Effekt durch Proben-eigene Stärke beschrieben (Barnes and Blakeney, 1974). Eine Aufbereitung mit Amicon®-Filtereinheiten, ähnlich den Glukose-Sirup-Proben, ist bei stärkehaltigem Untersuchungsmaterial wenig erfolgversprechend, da die störende Stärke aufgrund ihrer hohen Molekülgröße (Ong et al., 1994) ebenso wie möglicherweise enthaltene, stärkeabbauende Enzyme zurückgehalten wird. Auch ein an den Megazyme-Test angelehntes Extraktionsverfahren (Megazyme, 2019) führte zu keiner verbesserten Nachweisbarkeit. Mit aufwändigeren Extraktions-Protokollen, wie sie z.T. in der Literatur beschrieben werden (Koyama et al., 2013, Reichenberger et al., 2020) wäre evtl. auch bei diesen komplexen Probenmatrices, ein sensitiverer Nachweis möglich. Derartige Verfahren wurden jedoch bewusst nicht überprüft, da der neu entwickelte Test so unkompliziert und praxisnah wie möglich gehalten werden sollte. Der Einsatz solcher aufwändigen Extraktionsprotokolle ist sicherlich dann sinnvoll, wenn retrospektiv die Ursache für den Verderb einer Charge zweifelsfrei aufgeklärt werden soll und andere mögliche Ursachen wie bspw. proteolytische Vorgänge (Teh et al., 2014) ausgeschlossen

werden sollen. Im Sinne einer prophylaktischen Strategie ist aber die schnelle und einfache Analyse insbesondere der zur Herstellung des Produkts eingesetzten Rohstoffe deutlich effektiver.

Enzym-Konzentrationen, die der technologischen Störgrenze entsprachen, konnten folglich in den verzehrfertigen Produkten meist nicht detektiert werden. Wurden die Milcherzeugnisse dagegen mit 10 bzw. 100-fach höheren Enzym-Gehalten künstlich kontaminiert, war i.d.R. amylolytische Enzym-Aktivität nachweisbar. Dabei zeigte sich in beiden überprüften Produkten (Fruchtjoghurt bzw. Pudding) meist ein ähnliches Muster. Bei Einsatz von Pullulanase hingegen war auffällig, dass ihre Aktivität zwar im Pudding äußerst schlecht, im Fruchtjoghurt jedoch sehr sensitiv nachgewiesen werden konnte. Möglicherweise wurden in den Produkten unterschiedliche modifizierte Stärken zur Stabilisierung der Konsistenz eingesetzt, die die Enzym-Aktivität verschieden stark beeinflussten. Da Pullulanasen für gewöhnlich lediglich Substrate mit $\alpha 1 \rightarrow 6$ -glykosidischen Bindungen umsetzen (Ohba and Ueda, 1975, Nisha and Satyanarayana, 2016), ist folglich die kompetitive Hemmung ausgeprägter, sofern die Proben-eigene Stärke stark verzweigt ist. Bei der Herstellung von Lebensmitteln werden aber auch Stärken eingesetzt, bei denen $\alpha 1 \rightarrow 6$ -glykosidische Bindungen weitestgehend hydrolysiert wurden (Liu et al., 2017). Enthalten die untersuchten Produkte also diese Art von Stärke ist kein bzw. nur ein geringer hemmender Effekt auf die nachweisbare Pullulanase-Aktivität zu erwarten.

Ähnlich den Versuchen zur Überprüfung der Anwendbarkeit des neu entwickelten Verfahrens, wurde künstlich kontaminiertes Probenmaterial im optimierten Phadebas- bzw. Megazyme-Test eingesetzt. Dabei war trotz relativ hoher α -Amylase-Konzentrationen bei einigen Probenmatrices kein Nachweis der Enzym-Aktivität möglich. So führten, anders als im innovativen Testsystem, Proben mit starker Eigenfärbung bzw. Trübung zur Überlagerung der Messwerte und beeinträchtigten damit die Beurteilung der Ergebnisse maßgeblich. Dies betraf vor allem Testansätze mit Fruchtjoghurt, Fruchtzubereitung, H-Milch und Pudding. Außerdem werden beide Verfahren vom Hersteller als spezifisch für die Bestimmung von α -Amylase-Aktivität beschrieben (Phadebas AB, 2018, Megazyme, 2019). Eine gleichzeitige Detektion von verschiedenen amylolytischen Enzymen, wie es das neue Testverfahren aus der vorliegenden Arbeit ermöglicht, ist aber für die Aufklärung von Produktveränderungen essenziell, da in den Kontaminationsversuchen neben α -Amylasen auch weitere, kommerziell genutzte Enzyme zur Verflüssigung von stärkehaltigen Milchprodukten führten.

Dieser generische Nachweis erwies sich auch bei der Untersuchung eines bei einem realen Verflüssigungsfall eingesetzten Aromas als nützlich. Dieses zeigte im neuen Enzym-Test

eine sehr hohe amylolytische Aktivität. Weitergehende, am Lehrstuhl für Physiologie (Prof. Dr. C. Deeg) durchgeführte, proteomische Analysen zeigten, dass das Präparat mit CGTase kontaminiert war – ein technisches Enzym, das zur Herstellung von häufig auch in Aroma-Präparationen eingesetzten Cyclodextrinen verwendet wird (Norman and Jørgensen, 1992, Ciobanu et al., 2013). Darüber hinaus konnten auch in weiteren, im Handel erhältlichen Aroma-Präparationen amylolytische Aktivitäten festgestellt werden. Der Kontaminationsweg über verunreinigte Aromen dürfte also auch bei anderen Verflüssigungsfällen eine weitaus größere Rolle spielen als bislang gedacht.

Zusammenfassend konnte in der vorliegenden Arbeit in einem innovativen Ansatz ein effizientes, ultrasensitives Nachweisverfahren für amylolytische Enzyme, insbesondere α -Amylasen und CGTasen, entwickelt werden, mit dem es möglich ist, auch Spurenkonzentrationen (bis zu 1 ng/g; relatives Äquivalent ca. 0,4 mU/g bzw. 7 pkat/g) dieser Enzyme in Rohwaren zuverlässig nachzuweisen. Zudem zeigte sich, dass das neu entwickelte Testsystem auch bei anderen Lebensmitteln eingesetzt werden kann. Bspw. konnten, ähnlich wie von Eggleston et al. (2013) berichtet in Rohrzucker stärkeabbauende Aktivitäten gefunden werden, die vermutlich auf eine Verunreinigung mit technischen Enzymen zurückzuführen sind. Auch der natürliche Amylase-Gehalt in Honig bzw. Mehl war problemlos detektierbar. Diese Ergebnisse unterstreichen das breite Einsatzspektrum des hochsensitiven Nachweisverfahrens.

In der vorliegenden Arbeit wurde v.a. die Anwendbarkeit des Verfahrens zur Vermeidung amylasebedingter Fehlproduktionen bei stärkehaltigen Milchprodukten überprüft. Unabhängig davon könnten sich aber auch im Bereich Lebensmitteldeklaration weitere Einsatzgebiete ergeben. Zum Schutz des Verbrauchers existieren strenge Regulierungen hinsichtlich der Kennzeichnungspflicht von Produkten, bei deren Herstellung technische Enzyme verwendet wurden. Gemäß der Verordnung (EG) 1332/2008 vom 16. Dezember 2008 (zuletzt geändert am 13.11.2012) müssen Enzyme dann als Zutat gekennzeichnet werden, sofern im Produkt die Aktivität des eingesetzten Enzyms nachweisbar ist, andernfalls gelten sie als (technische) Hilfsstoffe und sind somit nicht kennzeichnungspflichtig. Mit den derzeitigen Nachweisverfahren sind bei den meisten amylolytischen Enzymen keine Restaktivitäten im Endprodukt nachweisbar, eine Deklaration erfolgt daher i.d.R. nicht. Mit einem hochsensitiven Verfahren, wie es in der vorliegenden Arbeit vorgestellt wurde, könnten hingegen eventuell solche Restaktivitäten nachweisbar werden. Dies hätte dann im Hinblick auf eine Deklarationspflicht weitreichende Auswirkungen für viele Bereiche der Lebensmittelindustrie.

VI ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Entwicklung eines hochsensitiven, innovativen Testverfahrens zum Nachweis amyloytischer Enzym-Aktivitäten in Rohwaren bzw. Milchprodukten. Das zweistufige Testverfahren basiert (1) auf einem enzymatischen Vorverdau von Hapten-markierten Substraten durch in kontaminierten Proben vorhandenen, stärkeabbauenden Enzymen und (2) dem anschließenden Nachweis des Substrates in einem Hapten-spezifischen Sandwich-EIA.

Zur Generierung der benötigten Testreagenzien (Hapten-markierte Substrate bzw. Hapten-spezifische Antikörper) wurden zum einen Stärke bzw. Stärkederivate mit dem niedermolekularen Textilfarbstoff Remazol-Brilliantblau (RBB) markiert. Das optimierte Kopplungsverfahren erlaubte die effiziente und schnelle Herstellung (innerhalb von 24 h) von Konjugat-Varianten mit unterschiedlicher Kopplungsdichte (Kopplungsverhältnis 1:10 – 1:40). Zum anderen wurden unter Verwendung eines RBB-Protein-Konjugats als Immunogen Hapten-spezifische, monoklonale Antikörper gewonnen. Auf Basis dieser Antikörper konnten anschließend Sandwich-EIAs etabliert werden, die einen hochsensitiven Nachweis der RBB-markierten Stärke(derivate) ermöglichen. Unter Verwendung dieser Testreagenzien konnte die Realisierbarkeit des hypothetischen Testansatzes bewiesen werden, d.h. bei Vorinkubation der markierten Mehrfachzucker vor dem Einsatz im Sandwich-EIA mit stärkeabbauenden Enzymen, reduzierte sich die im EIA gemessene Absorption abhängig von der eingesetzten Enzym-Konzentration. Nach Optimierung des Verfahrens, wobei insbesondere die für den enzymatischen Vorverdau wichtigen Parameter (Zuckerkettenlänge des Substrats, Substrat-Konzentration, Inkubationstemperatur/-zeit) sowie immunchemische EIA-Variablen (verwendeter mAk, Antikörper-Konzentration) überprüft wurden, konnten mit dem Testsystem amyloytische Enzyme, insbesondere α -Amylasen und CGTasen, ultrasensitiv nachgewiesen werden. Die Nachweisgrenze für CGTasen lag bei 3 pg/ml, für α -Amylasen bei bis zu 19 pg/ml (relatives Aktivitätsäquivalent 8 μ U/ml). Dies stellt im Vergleich zu herkömmlichen enzymatischen Verfahren eine Steigerung der Testsensitivität um bis zu Faktor 10000 dar.

Die unerwünschte Kontamination von stärkehaltigen Milchprodukten mit Amylasen resultiert in einer Verflüssigung, d.h. einem Verderb, der betroffenen Produkte. Modellversuche zeigten, dass dafür bereits sehr niedrige Konzentrationen von ≥ 1 ng Enzym pro g Probe ausreichen. In einer breit angelegten Studie wurde überprüft, inwieweit das entwickelte Testverfahren in der Lage ist, entsprechende relevante Enzym-Konzentrationen

in den Rohwaren bzw. den verzehrfertigen Produkten nachzuweisen. Dazu wurden die Proben ohne aufwändige Extraktion im Testsystem eingesetzt. Dies erlaubte eine schnelle, unkomplizierte und praxisorientierte Analyse. Kontrollansätze, bei denen abbaustabile, RBB-markierte Polysucrose als Substrat eingesetzt wurde, ermöglichen zudem eine zuverlässige Identifikation von hemmenden Probenmatrix-Einflüssen. Wurden verzehrfertige Produkte künstlich kontaminiert, waren mit dem neuen Testsystem aufgrund des hohen Stärke-Gehalts der Proben die amylolytischen Enzym-Aktivitäten in diesem sehr niedrigen Konzentrationsbereich nicht immer sicher nachweisbar. In den üblicherweise eingesetzten Rohwaren (Aroma-Präparation, Fruchtzubereitung, Glukose-Sirup, H-Milch, Kristallzucker) konnten hingegen relevante Enzyme im kritischen Konzentrationsbereich von bis zu 1 ng/g zuverlässig detektiert werden.

VII SUMMARY

Detection of amylolytic enzyme activities in food: Development and validation of an innovative, highly sensitive immunoassay

This thesis deals with the development of a highly sensitive, innovative test method for the detection of amylolytic enzyme activities in raw materials and dairy products. The two-step test procedure is based on (1) an enzymatic pre-digestion of hapten-labelled substrates by starch-degrading enzymes present in contaminated samples and (2) the subsequent detection of the substrate *via* hapten-specific sandwich EIA.

To generate the required test reagents (hapten-labeled substrates and hapten-specific antibodies), on the one hand, starch or starch derivatives were labeled with the low-molecular textile dye Remazol-Brilliant Blue (RBB). The optimized coupling procedure allowed the efficient and rapid production (within 24 h) of conjugate variants with different coupling densities (coupling ratio 1:10 - 1:40). On the other hand, hapten-specific monoclonal antibodies were obtained using an RBB-protein conjugate as immunogen. Based on these antibodies, sandwich EIAs could be established, which allowed a highly sensitive detection of RBB-labeled starch (derivatives). Using these test reagents the feasibility of the hypothetical test approach could be proven, i.e. if the labelled polysaccharides were pre-incubated with starch degrading enzymes before analyzed by the sandwich EIA, the absorption measured in the EIA was reduced depending on the enzyme concentration used. In order to optimize the procedure, some parameters important for the enzymatic pre-digestion (sugar chain length of the substrate, substrate concentration, incubation time and temperature) as well as immunochemical EIA variables (used mAb, antibody concentration) were modified. With the optimized test system amylolytic enzymes, especially α -amylases and CGTases, could be detected ultrasensitively. The detection limit for CGTases was 3 pg/ml, for α -amylases up to 19 pg/ml (relative activity equivalent 8 μ U/ml). Compared to conventional enzymatic methods, this represents an increase in test sensitivity of up to a factor of 10,000.

The undesired contamination of starchy dairy products with amylases inevitably results in liquefaction, i.e. spoilage, of the affected products. Model tests showed that even very low concentrations of 1 ng enzyme per g sample are sufficient to induce this effect. Therefore, a comprehensive study was conducted to verify the applicability of the developed assay procedure for the reliable detection of amylolytic enzymes at relevant concentrations in raw materials or ready-to-eat products. By applying the samples to the test system without

complex extraction, a fast, uncomplicated and practice-oriented analysis procedure could be realized. Additionally control tests in which degradation-stable, RBB-labelled polysucrose was used as substrate, enabled the secure identification of inhibitory sample matrix influences. Analyses of the artificially contaminated ready-to-eat products were hampered by their high starch content. In contrast, amylolytic enzymes could be reliably detected in the critical concentration range of up to 1 ng/g in all analyzed raw materials (flavour preparations, fruit preparation, glucose syrup, UHT milk, crystal sugar).

VIII LITERATURVERZEICHNIS

- AČKAR, Đ., BABIĆ, J., JOZINOVIC, A., MILIČEVIĆ, B., JOKIĆ, S., MILIČEVIĆ, R., RAJIĆ, M. & ŠUBARIĆ, D. 2015. Starch modification by organic acids and their derivatives: A review. *Molecules*, 20, 19554-19570.
- AL-HADDAD, K. S. H. 2003. Survival of *Salmonellae* in bio-yoghurt. *International Journal of Dairy Technology*, 56, 199-202.
- ALTING, A. C., VAN DE VELDE, F., KANNING, M. W., BURGERING, M., MULLENERS, L., SEIN, A. & BUWALDA, P. 2009. Improved creaminess of low-fat yoghurt: The impact of amylose-treated starch domains. *Food Hydrocolloids*, 23, 980-987.
- ANDERSON, J. E., ADAMS, D. M. & WALTER, W. M. 1983. Conditions under which bacterial amylases survive ultrahigh temperature sterilization. *Journal of Food Science*, 48, 1622-1631.
- ANNAMALAI, N., THAVASI, R., VIJAYALAKSHMI, S. & BALASUBRAMANIAN, T. 2011. Extraction, purification and characterization of thermostable, alkaline tolerant α -amylase from *Bacillus cereus*. *Indian Journal of Microbiology*, 51, 424-429.
- AUTIO, K., SUORTTI, T., HAMUNEN, A. & POUTANEN, K. 1992. Microstructural and physicochemical properties of oxidized potato starch for paper coating. *Starch – Stärke*, 44, 393-398.
- VALTRONI, F., BOUQUERAND, P. & NORMAND, V. 2004. Maltodextrin molecular weight distribution influence on the glass transition temperature and viscosity in aqueous solutions. *Carbohydrate Polymers*, 58, 323-334.
- BAI, Y. G., HUANG, H. Q., MENG, K., SHI, P. J., YANG, P. L., LUO, H. Y., LUO, C. L., FENG, Y. K., ZHANG, W. & YAO, B. 2012. Identification of an acidic alpha-amylase from *Alicyclobacillus* sp A4 and assessment of its application in the starch industry. *Food Chemistry*, 131, 1473-1478.
- BAREFOOT, S. F. & ADAMS, D. M. 1980. Amylase activity in sterile spoiled pudding. *Journal of Food Science*, 45, 1658-1661.
- BARNES, W. C. & BLAKENEY, A. B. 1974. Determination of cereal alpha amylase using a commercially available dye-labelled substrate. *Starch – Stärke*, 26, 193-197.
- BERNFELD, P. 1955. Amylases, α and β . *Methods in Enzymology*, 1, 149-158.
- BERSKI, W., PTASZEK, A., PTASZEK, P., ZIOBRO, R., KOWALSKI, G., GRZESIK, M. & ACHREMOWICZ, B. 2011. Pasting and rheological properties of oat starch and its derivatives. *Carbohydrate Polymers*, 83, 665-671.
- BISGAARD-FRANTZEN, H., SVENDSEN, A., NORMAN, B., PEDERSEN, S., KJAERULFF, S., OUTTRUP, H. & BORCHERT, T. V. 1999. Development of industrially important α -amylases. *Journal of Applied Glycoscience*, 46, 199-206.
- BISSWANGER, H. 2014. Enzyme assays. *Perspectives in Science*, 1, 41-55.
- BOZIC, N., RUIZ, J., LOPEZ-SANTIN, J. & VUJCIC, Z. 2011. Production and properties of the highly efficient raw starch digesting alpha-amylase from a *Bacillus licheniformis* ATCC 9945a. *Biochemical Engineering Journal*, 53, 203-209.
- CHEN, J., GAI, Y., FU, G., ZHOU, W., ZHANG, D. & WEN, J. 2015. Enhanced extracellular production of α -amylase in *Bacillus subtilis* by optimization of regulatory elements and over-expression of PrsA lipoprotein. *Biotechnology Letters*, 37, 899-906.
- CHRISTOPHERSEN, C., OTZEN, D. E., NOMAN, B. E., CHRISTENSEN, S. & SCHÄFER, T. 1998. Enzymatic characterisation of Novamyl®, a thermostable α -amylase. *Starch – Stärke*, 50, 39-45.

- CIOBANU, A., MALLARD, I., LANDY, D., BRABIE, G., NISTOR, D. & FOURMENTIN, S. 2013. Retention of aroma compounds from *Mentha piperita* essential oil by cyclodextrins and crosslinked cyclodextrin polymers. *Food Chemistry*, 138, 291-297.
- COMPTON, M. M., LAPP, S. A. & PEDEMONTE, R. 2002. Generation of multicolored, prestained molecular weight markers for gel electrophoresis. *Electrophoresis*, 23, 3262-3265.
- CORNAGGIA, C., IVORY, R., MANGAN, D. & MCCLEARY, B. V. 2016. Novel assay procedures for the measurement of α -amylase in weather-damaged wheat. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96, 404-412.
- CUI, B., LU, Y.-M., TAN, C.-P., WANG, G.-Q. & LI, G.-H. 2014. Effect of cross-linked acetylated starch content on the structure and stability of set yoghurt. *Food Hydrocolloids*, 35, 576-582.
- DE SOUZA, P. M. & DE OLIVEIRA MAGALHAES, P. 2010. Application of microbial alpha-amylase in industry – A review. *Brazilian Journal of Microbiology*, 41, 850-861.
- DEETH, H. C. & LEWIS, M. J. 2017. *High temperature processing of milk and milk products*, Chichester, John Wiley & Sons Ltd.
- DEMIR, N., ACAR, J., SARIOĞLU, K. & MUTLU, M. 2001. The use of commercial pectinase in fruit juice industry. Part 3: Immobilized pectinase for mash treatment. *Journal of Food Engineering*, 47, 275-280.
- DENNENBERG, R. J., BOTHAST, R. J. & ABBOTT, T. P. 1978. A new biodegradable plastic made from starch graft poly(methyl acrylate) copolymer. *Journal of Applied Polymer Science*, 22, 459-465.
- DJORDJEVIC, S., KOVACEVIC, S., DJORDJEVIC, D. & KONSTANTINOVIC, S. 2019. Sizing process of cotton yarn by size from a copolymer of methacrylic acid and hydrolyzed potato starch. *Textile Research Journal*, 89, 3457-3465.
- DONLON, J. 2007. Subtilisin. In: POLAINA, J. & MACCABE, A. P. (eds.) *Industrial enzymes: Structure, function and applications*. Dordrecht: Springer Netherlands.
- EGGLESTON, G., GOBER, J. & ST. CYR, E. 2013. Development of an industrial method to quantitatively measure carry-over amylase activity in raw and refined sugars. *International Sugar Journal*, 115, 123-131.
- EGGLESTON, G., MONGE, A., MONTES, B. & GUIDRY, D. 2008. Optimization of α -amylase application in raw sugar manufacture. Part I: Characterization of commercial α -amylases. *International Sugar Journal*, 110, 97-104.
- ELMORE, J. R., HEYMANN, H., JOHNSON, J. & HEWETT, J. E. 1999. Preference mapping: Relating acceptance of “creaminess” to a descriptive sensory map of a semi-solid. *Food Quality and Preference*, 10, 465-475.
- FALCH, E. A. 1991. Industrial enzymes – Developments in production and application. *Biotechnology Advances*, 9, 643-658.
- FINCAN, S. A. & ENEZ, B. 2014. Production, purification, and characterization of thermostable α -amylase from thermophilic *Geobacillus stearothermophilus*. *Starch – Stärke*, 66, 182-189.
- FUWA, H. 1954. A new method for microdetermination of amylase activity by the use of amylose as the substrate. *The Journal of Biochemistry*, 41, 583-603.
- GLÜCK, U. & THIER, H.-P. 1980. Quantitative Bestimmung einiger Dickungsmittel in Milchprodukten. *Zeitschrift für Lebensmittel – Untersuchung und Forschung*, 170, 272-279.
- GÖK, Ö., ÖZCAN, A. S. & ÖZCAN, A. 2010. Adsorption behavior of a textile dye of Reactive Blue 19 from aqueous solutions onto modified bentonite. *Applied Surface Science*, 256, 5439-5443.

- GOVINDASAMY, S., CAMPANELLA, O. H. & OATES, C. G. 1997. Enzymatic hydrolysis and saccharification optimisation of sago starch in a twin-screw extruder. *Journal of Food Engineering*, 32, 427-446.
- GOVINDASAMY, S., OATES, C. G. & WONG, H. A. 1992. Characterization of changes of sago starch components during hydrolysis by a thermostable alpha-amylase. *Carbohydrate Polymers*, 18, 89-100.
- GRANT, L. A., OSTENSON, A. M. & RAYAS-DUARTE, P. 2002. Determination of amylose and amylopectin of wheat starch using high performance size-exclusion chromatography (HPSEC). *Cereal Chemistry*, 79, 771-773.
- GUSAKOV, A. V., KONDRATYEVA, E. G. & SINITSYN, A. P. 2011. Comparison of two methods for assaying reducing sugars in the determination of carbohydrase activities. *International Journal of Analytical Chemistry*, 2011.
- HAGBERG, S. 1960. A rapid method for determining alpha-amylase activity. *Cereal Chemistry*, 37, 218-222.
- HAGBERG, S. 1961. Note on a simplified rapid method for determining alpha-amylase activity. *Cereal Chemistry*, 38, 202-203.
- HASHIDA, M. & BISGAARD-FRANTZEN, H. 2000. Protein engineering of new industrial amylases. *Trends in Glycoscience and Glycotechnology*, 12, 389-401.
- HELLAND, M. H., WICKLUND, T. & NARVHUS, J. A. 2002. Effect of germination time on alpha-amylase production and viscosity of maize porridge. *Food Research International*, 35, 315-321.
- HEYNA, J. 1962. Reaktivfarbstoffe mit Vinylsulfongruppen. *Angewandte Chemie*, 74, 966-969.
- HILL, G. A., MACDONALD, D. G. & LANG, X. 1997. α -Amylase inhibition and inactivation in barley malt during cold starch hydrolysis. *Biotechnology Letters*, 19, 1139-1141.
- HMIDET, N., BAYOUDH, A., BERRIN, J. G., KANOUN, S., JUGE, N. & NASRI, M. 2008. Purification and biochemical characterization of a novel alpha-amylase from *Bacillus licheniformis* NH1 – Cloning, nucleotide sequence and expression of amyN gene in *Escherichia coli*. *Process Biochemistry*, 43, 499-510.
- HOBBS, L. 2009. Sweeteners from starch: Production, properties and uses. In: BEMILLER, J. & WHISTLER, R. (eds.) *Starch (Third Edition)*. San Diego: Academic Press.
- HOFMAN, D. L., VAN BUUL, V. J. & BROUNS, F. J. P. H. 2016. Nutrition, health, and regulatory aspects of digestible maltodextrins. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56, 2091-2100.
- HONIGVERORDNUNG vom 16. Januar 2004 (BGBl. I S. 92), die zuletzt durch Artikel 10 der Verordnung vom 5. Juli 2017 (BGBl. I S. 2272) geändert worden ist.
- HOSTETTLER, F., BOREL, E. & DEUEL, H. 1951. Über die Reduktion der 3,5-Dinitrosalicylsäure durch Zucker. *Helvetica Chimica Acta*, 34, 2132-2139.
- HOU, X., YANG, J., TANG, J., CHEN, X., WANG, X. & YAO, K. 2006. Preparation and characterization of crosslinked polysucrose microspheres. *Reactive and Functional Polymers*, 66, 1711-1717.
- ISMAIL, O. Z. & BHAYANA, V. 2017. Lipase or amylase for the diagnosis of acute pancreatitis? *Clinical Biochemistry*, 50, 1275-1280.
- IWASA, S., AOSHIMA, H., HIROMI, K. & HATANO, H. 1974. Subsite affinities of bacterial liquefying α -amylase evaluated from the rate parameters of linear substrates. *The Journal of Biochemistry*, 75, 969-978.
- JAEGER, K.-E. & REETZ, M. T. 1998. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. *Trends in Biotechnology*, 16, 396-403.
- JESKE, L., PLACZEK, S., SCHOMBURG, I., CHANG, A. & SCHOMBURG, D. 2018. BRENDa in 2019: A european ELIXIR core data resource. *Nucleic Acids Research*, 47, D542-D549.

- JÓZEF, S. 2007. The use of starch processing enzymes in the food industry. In: POLAINA, J. & MACCABE, A. P. (eds.) *Industrial enzymes: Structure, function and applications*. Dordrecht: Springer Netherlands.
- KAMENSKY, J. 2019. *Milchzuckerunverträglichkeit* [Online]. Available: https://www.vis.bayern.de/ernaehrung/ernaehrung/ernaehrung_krankheit/milchzuckerunvertraeglich.htm#milchzuckergehalt [Accessed 25.07.2020].
- KAROW, A. R., BAHRENBURG, S. & GARIDEL, P. 2013. Buffer capacity of biologics – From buffer salts to buffering by antibodies. *Biotechnology Progress*, 29, 480-492.
- KIKANI, B. A. & SINGH, S. P. 2011. Single step purification and characterization of a thermostable and calcium independent alpha-amylase from *Bacillus amyloliquifaciens* TSWK1-1 isolated from Tulsi Shyam hot spring reservoir, Gujarat (India). *International Journal of Biological Macromolecules*, 48, 676-681.
- KONNO, A., MIYAWAKI, M., MISAKI, M. & YASUMATSU, K. 1981. Bitterness reduction of citrus fruits by β -cyclodextrin. *Agricultural and Biological Chemistry*, 45, 2341-2342.
- KONSULA, Z. & LIAKOPOULOU-KYRIAKIDES, M. 2004. Hydrolysis of starches by the action of an α -amylase from *Bacillus subtilis*. *Process Biochemistry*, 39, 1745-1749.
- KOYAMA, K., HIRAO, T., TORIBA, A. & HAYAKAWA, K. 2013. An analytical method for measuring α -amylase activity in starch-containing foods. *Biomedical Chromatography*, 27, 583-588.
- KULA, M.-R. 1980. Enzyme in der Technik. *Chemie in unserer Zeit*, 14, 61-70.
- KULICKE, W.-M. & HEINZE, T. 2005. Improvements in polysaccharides for use as blood plasma expanders. *Macromolecular Symposia*, 231, 47-59.
- LAGRAIN, B., WILDERJANS, E., GLORIEUX, C. & DELCOUR, J. A. 2012. Importance of gluten and starch for structural and textural properties of crumb from fresh and stored bread. *Food Biophysics*, 7, 173-181.
- LEEMHUIS, H., KRAGH, K. M., DIJKSTRA, B. W. & DIJKHUIZEN, L. 2003. Engineering cyclodextrin glycosyltransferase into a starch hydrolase with a high exo-specificity. *Journal of Biotechnology*, 103, 203-212.
- LIU, G., GU, Z., HONG, Y., CHENG, L. & LI, C. 2017. Structure, functionality and applications of debranched starch: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 63, 70-79.
- LUCKACHAN, G. E. & PILLAI, C. K. S. 2011. Biodegradable polymers – A review on recent trends and emerging perspectives. *Journal of Polymers and the Environment*, 19, 637-676.
- MACGREGOR, A. W. & MORGAN, J. E. 1992. Determination of specific activities of malt α -amylases. *Journal of Cereal Science*, 16, 267-277.
- MADSEN, G. B., NORMAN, B. E. & SLOTT, S. 1973. A new, heat stable bacterial amylase and its use in high temperature liquefaction. *Starch – Stärke*, 25, 304-308.
- MAMO, G. & GESSESSSE, A. 1999. Purification and characterization of two raw-starch-digesting thermostable alpha-amylases from a thermophilic *Bacillus*. *Enzyme and Microbial Technology*, 25, 433-438.
- MARCINIĄK, G. P. & KULA, M.-R. 1982. Vergleichende Untersuchung der Methoden zur Bestimmung der Aktivität bakterieller alpha-Amylasen. *Starch – Stärke*, 34, 422-430.
- MASUDA, S., KIKUCHI, K., MATSUMOTO, Y., SUGIMOTO, T., SHOJI, H. & TANABE, M. 2009. Analysis of enzyme production by submerged culture of *Aspergillus oryzae* using whole barley. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 73, 2190-2195.
- MATIKAINEN, M.-T. 1984. Effect of pH on reactivity of monoclonal antibodies to *Chlamydia*. *Journal of Immunological Methods*, 75, 211-216.

- MAURICIO, M. R., DA COSTA, P. G., HARAGUCHI, S. K., GUILHERME, M. R., MUNIZ, E. C. & RUBIRA, A. F. 2015. Synthesis of a microhydrogel composite from cellulose nanowhiskers and starch for drug delivery. *Carbohydrate Polymers*, 115, 715-722.
- MCCLEARY, B. V. & MCGEOUGH, P. 2015. A comparison of polysaccharide substrates and reducing sugar methods for the measurement of endo-1,4- β -xytanase. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 177, 1152-1163.
- MCCLEARY, B. V. & SHEEHAN, H. 1987. Measurement of cereal α -amylase: A new assay procedure. *Journal of Cereal Science*, 6, 237-251.
- MCKELLAR, R. 1981. Development of off-flavors in ultra-high temperature and pasteurized milk as a function of proteolysis. *Journal of Dairy Science*, 64, 2138-2145.
- MCKIE, V. A. & MCCLEARY, B. V. 2015. A rapid, automated method for measuring α -amylase in pre-harvest sprouted (sprout damaged) wheat. *Journal of Cereal Science*, 64, 70-75.
- MEGAZYME. 2019. *Produktinformation Amylase SD Method* [Online]. Available: https://www.megazyme.com/documents/Booklet/K-AMYLSD_DATA.pdf [Accessed 03.03.2020].
- MEHTA, D. & SATYANARAYANA, T. 2016. Bacterial and archaeal alpha-amylases: Diversity and amelioration of the desirable characteristics for industrial applications. *Frontiers in Microbiology*, 7.
- MICHAELIS, L. & MENTEN, M. L. 1913. Die Kinetik der Invertinwirkung. *Biochemische Zeitschrift*, 49, 333-369.
- MORELL, P., HERNANDO, I., LLORCA, E. & FISZMAN, S. 2015. Yogurts with an increased protein content and physically modified starch: Rheological, structural, oral digestion and sensory properties related to enhanced satiating capacity. *Food Research International*, 70, 64-73.
- MORGAN, K. R., HUTT, L., GERRARD, J., EVERY, D., ROSS, M. & GILPIN, M. 1997. Staling in starch breads: The effect of antistaling α -amylase. *Starch – Stärke*, 49, 54-59.
- NELSON, N. 1944. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. *Journal of Biological Chemistry*, 153, 375-380.
- NIELSEN, J. E. & BORCHERT, T. V. 2000. Protein engineering of bacterial α -amylases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1543, 253-274.
- NIGAM, P. & SINGH, D. 1995. Enzyme and microbial systems involved in starch processing. *Enzyme and Microbial Technology*, 17, 770-778.
- NISHA, M. & SATYANARAYANA, T. 2016. Characteristics, protein engineering and applications of microbial thermostable pullulanases and pullulan hydrolases. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100, 5661-5679.
- NORMAN, B. E. 1983. A novel *Bacillus* pullulanase – Its properties and application in the glucose syrups industry. *Journal of the Japanese Society of Starch Science*, 30, 200-211.
- NORMAN, B. E. & JØRGENSEN, S. T. 1992. *Thermoanaerobacter* sp. CGTase: Its properties and application. *Journal of the Japanese Society of Starch Science*, 39, 101-108.
- NOVOZYMES A/S. 2002a. *Produktinformation AMG® 300 L* [Online]. Available: <http://www.ebiosis.co.kr/Novozymes%20Product%20Sheet/AMG%20300L.pdf> [Accessed 09.06.2020].
- NOVOZYMES A/S. 2002b. *Produktinformation BAN® 480 L* [Online]. Available: <http://www.ebiosis.co.kr/Novozymes%20Product%20Sheet/BAN%20480L.pdf> [Accessed 07.04.2020].

- NOVOZYMES A/S. 2015. *New Novozymes' enzyme saves cash for maltose syrup producers* [Online]. Available: <https://www.novozymes.com/en/news/news-archive/2015/03/new-novozymes-enzyme-saves-cash-for-maltose-syrup-producers> [Accessed 03.03.2020].
- NWOKOCHA, L. M. 2011. Adhesive properties of cyanoethyl starch. *Journal of Adhesion Science and Technology*, 25, 893-902.
- OHBA, R. & UEDA, S. 1975. Some properties of crystalline extra- and intra-cellular pullulanases from *Aerobacter aerogenes*. *Agricultural and Biological Chemistry*, 39, 967-972.
- ÖKO-TEST AG. 2019. *Test Pudding für Kinder: Nur ein Dessert von Alete, Dr. Oetker & Co. "gut"* [Online]. Available: https://www.oekotest.de/kinder-familie/Test-Pudding-fuer-Kinder-Nur-ein-Dessert-von-Alete-Dr-Oetker-Co-gut_111608_1.html [Accessed 25.07.2020].
- ONG, M. H., JUMEL, K., TOKARCZUK, P. F., BLANSHARD, J. M. V. & HARDING, S. E. 1994. Simultaneous determinations of the molecular weight distributions of amyloses and the fine structures of amylopectins of native starches. *Carbohydrate Research*, 260, 99-117.
- OUTTRUP, H. & NORMAN, B. E. 1984. Properties and application of a thermostable maltogenic amylase produced by a strain of *Bacillus* modified by recombinant-DNA techniques. *Starch – Stärke*, 36, 405-411.
- PHADEBAS AB. 2018. *Produktinformation Phadebas® Amylase Test* [Online]. Available: <https://www.phadebas.com/wp-content/uploads/SPE9028-01-bilaga-1-IFU-Phadebas-Amylase-test.pdf> [Accessed 03.03.2020].
- RAWLINGS, N. D., MORTON, F. R. & BARRETT, A. J. 2007. An introduction to peptidases and the Merops database. In: POLAINA, J. & MACCABE, A. P. (eds.) *Industrial enzymes: Structure, function and applications*. Dordrecht: Springer Netherlands.
- REICHENBERGER, K., LUZ, A., SEITL, I. & FISCHER, L. 2020. Determination of the direct activity of the maltogenic amylase from *Geobacillus stearothermophilus* in white bread. *Food Analytical Methods*, 13, 496-502.
- RICHTER, R., SCHMIDT, R., SMITH, K., MULL, L. & HENRY, S. 1979. Proteolytic activity in ultra-pasteurized, aseptically packaged whipping cream. *Journal of Food Protection*, 42, 43-45.
- RINDERKNECHT, H., WILDING, P. & HAVERBACK, B. 1967. A new method for the determination of α -amylase. *Experientia*, 23, 805.
- RONCERO, M. B., TORRES, A. L., COLOM, J. F. & VIDAL, T. 2005. The effect of xylanase on lignocellulosic components during the bleaching of wood pulps. *Bioresource Technology*, 96, 21-30.
- ROSÉS, R. P. & GUERRA, N. P. 2009. Optimization of amylase production by *Aspergillus niger* in solid-state fermentation using sugarcane bagasse as solid support material. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25, 1929-1939.
- SAHNOUN, M., NAILI, B., ELGHARBI, F., KAMMOUN, R., GABSI, K. & BEJAR, S. 2013. Effect of *Aspergillus oryzae* CBS 819.72 α -amylase on rheological dough properties and bread quality. *Biologia*, 68, 808-815.
- SAKAKI, S., NAKABAYASHI, N. & ISHIHARA, K. 1999. Stabilization of an antibody conjugated with enzyme by 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine copolymer in enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of Biomedical Materials Research*, 47, 523-528.
- SAMIE, N., REDDY, P. R. M. & ASHOURI, M. 2012. Novel extracellular hyper acidophil and thermostable α -amylase from *Micrococcus* sp. NS 211. *Starch – Stärke*, 64, 136-144.

- SANTOS, J., SAUS, E., SMALLEY, S., CATALDO, L., ALBERTI, G., PARADA, J., GRATACÒS, M. & ESTIVILL, X. 2012. Copy number polymorphism of the salivary amylase gene: Implications in human nutrition research. *Lifestyle Genomics*, 5, 117-131.
- SARAVANAN, D., SIVASARAVANAN, S., SUDHARSHAN PRABHU, M., VASANTHI, N. S., SENTHIL RAJA, K., DAS, A. & RAMACHANDRAN, T. 2012. One-step process for desizing and bleaching of cotton fabrics using the combination of amylase and glucose oxidase enzymes. *Journal of Applied Polymer Science*, 123, 2445-2450.
- SCHADE, J., MARSH, G. & ECKERT, J. 1958. Diastase activity and hydroxy-methyl-furfural in honey and their usefulness in detecting heat alteration. *Journal of Food Science*, 23, 446-463.
- SCHÖNEBECK, J. & SÖDERBERG, M. 1971. Serum amylase in renal failure. *Scandinavian Journal of Urology and Nephrology*, 5, 257-262.
- SCHWERMANN, B., PFAU, K., LILIENSIEK, B., SCHLEYER, M., FISCHER, T. & BAKKER, E. P. 1994. Purification, properties and structural aspects of a thermoacidophilic alpha-amylase from *Alicyclobacillus acidocaldarius* ATCC 27009. Insight into acidostability of proteins. *European Journal of Biochemistry*, 226, 981-991.
- SHAFFER, P. A. & SOMOGYI, M. 1933. Copperiodometric reagents for sugar determination. *Journal of Biological Chemistry*, 100, 695-713.
- SHARMA, A. & SATYANARAYANA, T. 2010. High maltose-forming, Ca²⁺-independent and acid stable alpha-amylase from a novel acidophilic bacterium, *Bacillus acidicola*. *Biotechnology Letters*, 32, 1503-1507.
- SHIN, J.-E., SIMSEK, S., REUHS, B. L. & YAO, Y. 2008. Glucose release of water-soluble starch-related α-glucans by pancreatin and amyloglucosidase is affected by the abundance of α-1,6-glucosidic linkages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 10879-10886.
- SOMOGYI, G., POSTA, J., BURIS, L. & VARGA, M. 2006. Cyclodextrin (CD) complexes of cholesterol – Their potential use in reducing dietary cholesterol intake. *Die Pharmazie – An International Journal of Pharmaceutical Sciences*, 61, 154-156.
- STAVNSBJERG, M., HJORTKJAER, R., BILLE-HANSEN, V., JENSEN, B., GREENOUGH, R., MCCONVILLE, M., HOLMSTROEM, M. & HAZELDEN, K. 1986. Toxicological safety evaluation of a *Bacillus acidopullulyticus* pullulanase. *Journal of Food Protection*, 49, 146-153.
- STIFTUNG WARENTEST. 2017. *Zucker in Lebensmitteln Wie viel drin ist – und wie Sie das rausfinden* [Online]. Available: <https://www.test.de/Zucker-in-Lebensmitteln-Wie-viel-drin-ist-und-wie-Sie-das-rausfinden-5170484-5170491/> [Accessed 25.07.2020].
- SUMNER, J. B. & GRAHAM, W. T. A. O. V. A. 1921. Dinitrosalicylic acid: A reagent for the estimation of sugar in normal and diabetic urine. *Journal of Biological Chemistry*, 47, 5-9.
- SUN, H., ZHAO, P., GE, X., XIA, Y., HAO, Z., LIU, J. & PENG, M. 2010. Recent advances in microbial raw starch degrading enzymes. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 160, 988-1003.
- SUNDARRAM, A. & MURTHY, T. P. K. 2014. α-Amylase production and applications: A review. *Journal of Applied & Environmental Microbiology*, 2, 166-175.
- TEH, K. H., LINDSAY, D., PALMER, J., ANDREWES, P., BREMER, P. & FLINT, S. 2014. Proteolysis in ultra-heat-treated skim milk after exposure to multispecies biofilms under conditions modelling a milk tanker. *International Journal of Dairy Technology*, 67, 176-181.

- TRAN, T. T. H., DATTA, N. & DEETH, H. C. 2003. Amylases in enzyme detergents and their effects on a simulated long-life dairy dessert. *Milchwissenschaft – Milk Science International*, 58, 527-531.
- UGURU, G. C., ROBB, D. A., AKINYANJU, J. A. & SANI, A. 1997. Purification, characterisation and mutagenic enhancement of a thermoactive alpha-amylase from *Bacillus subtilis*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 19, 273-279.
- VAN DER MAAREL, M. J. E. C., CAPRON, I., EUVERINK, G.-J. W., BOS, H. T., KAPER, T., BINNEMA, D. J. & STEENEKEN, P. A. M. 2005. A novel thermoreversible gelling product made by enzymatic modification of starch. *Starch – Stärke*, 57, 465-472.
- VELTHUIS, A. G., REIJ, M. & VAN WAGENBERG, C. 2009. *Quality control of Dutch custard balanced against recall costs* [Online]. European Association of Agricultural Economists. Available: <https://core.ac.uk/download/pdf/6426077.pdf> [Accessed 19.08.2020].
- VERORDNUNG (EG) Nr. 1332/2008 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 16. Dezember 2008. Amtsblatt L 354, 31.12.2008, 7-15.
- VERORDNUNG (EG) Nr. 1333/2008 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 16. Dezember 2008. Amtsblatt L 354, 31.12.2008, 16-33.
- VERORDNUNG (EU) Nr. 1169/2011 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 25. Oktober 2011. Amtsblatt L 304, 22.11.2011, 18-63.
- VIOLET, M. & MEUNIER, J.-C. 1989. Kinetic study of the irreversible thermal denaturation of *Bacillus licheniformis* α -amylase. *Biochemical Journal*, 263, 665-670.
- VISVANATHAN, R., QADER, M., JAYATHILAKE, C., JAYAWARDANA, B. C., LIYANAGE, R. & SIVAKANESAN, R. 2020. Critical review on conventional spectroscopic α -amylase activity detection methods: Merits, demerits, and future prospects. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 100, 2836-2847.
- VUKELIĆ, B., RITONJA, A., RENKO, M., POKORNY, M. & VITALE, L. 1992. Extracellular α -amylase from *Streptomyces rimosus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 37, 202-204.
- WANG, Y.-J. & WANG, L. 2000. Structures and properties of commercial maltodextrins from corn, potato, and rice starches. *Starch – Stärke*, 52, 296-304.
- WEBER, E. J. & STICKNEY, V. C. 1993. Hydrolysis kinetics of Reactive Blue 19-vinyl sulfone. *Water Research*, 27, 63-67.
- WEPNER, B., BERGHOFER, E., MIESENBERGER, E., TIEFENBACHER, K. & N. K. NG, P. 1999. Citrate starch – Application as resistant starch in different food systems. *Starch – Stärke*, 51, 354-361.
- WEST, F., ADAMS, D. & SPECK, M. 1978. Inactivation of heat resistant proteases in normal ultra-high temperature sterilized skim milk by a low temperature treatment. *Journal of Dairy Science*, 61, 1078-1084.
- XIAO, Z., STORMS, R. & TSANG, A. 2006. A quantitative starch-iodine method for measuring alpha-amylase and glucoamylase activities. *Analytical Biochemistry*, 351, 146-148.
- YAMAGUCHI, M., WAKASUGI, J. & SAKAKIMA, J. 2008. Competitive and product inhibition-based α -amylase activity analysis method. *Clinical Biochemistry*, 41, 325-330.
- ZHANG, X. Z., XIE, S. Y., WU, X. X., JIN, F. X. & LI, X. Z. 1994. Purification and characterization of thermostable alpha-amylase II from *Bacillus*-Sp-Jf(2) Strain. *Enzyme and Microbial Technology*, 16, 985-990.
- ZOBEL, H. F. 1988. Molecules to granules: A comprehensive starch review. *Starch – Stärke*, 40, 44-50.

ZUSATZSTOFF-ZULASSUNGSVERORDNUNG vom 29. Januar 1998 (BGBI. I S. 230, 231), die zuletzt durch Artikel 23 der Verordnung vom 5. Juli 2017 (BGBI. I S. 2272) geändert worden ist.

IX ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1:	Schematische Darstellung der Stärke-Abbauwege nach den Informationen der Enzymdatenbank BRENDA.	6
Abbildung 2:	Optimierung des Phadebas® Amylase Tests.	30
Abbildung 3:	Optimierung des Megazyme-Tests.	31
Abbildung 4:	Analyse von künstlich kontaminierten Proben mit optimierten, kommerziellen Nachweisverfahren.	33
Abbildung 5:	Spektralanalysen (400 – 800 nm) der verschiedenen mit RBB markierten Mehrfachzucker.	38
Abbildung 6:	Robustheit der monoklonalen Antikörper im nicht-kompetitiven, indirekten EIA.	41
Abbildung 7:	Reaktivität verschiedener RBB-Stärke(derivate) im 3B5-Sandwich-EIA.	43
Abbildung 8:	Überprüfung der Stabilität von in PBS verdünntem RBB-Stärke-Konjugat (Kopplungsverhältnis 1:20) bei 60 °C.	44
Abbildung 9:	Vergleich der Amylase-Nachweisbarkeit unter Verwendung des 2C7- bzw. 3B5-Sandwich-EIAs.	45
Abbildung 10:	Indirekter Nachweis von Amylase-Aktivitäten mittels 2C7-Sandwich-EIA.	46
Abbildung 11:	Relative Enzym-Aktivität in Abhängigkeit vom verwendeten Inkubationspuffer.	48
Abbildung 12:	Einfluss der im Testansatz verwendeten Substrat-Konzentration auf die im 2C7-Sandwich-EIA nachweisbare Enzym-Aktivität.	49
Abbildung 13:	Nachweisbarkeit von α -Amylasen verschiedenen Ursprungs im optimierten Testsystem nach einer Inkubation von 2 h bei 60 °C.	50
Abbildung 14:	Nachweisbarkeit verschiedener amylolytischer Enzyme im optimierten Test in Abhängigkeit von den für den Vorverdau eingesetzten Inkubationszeiten.	52
Abbildung 15:	Charakterisierung von RBB-markierter Polysucrose.	53
Abbildung 16:	Robustheit des RBB-Polysucrose-Konjugats.	54
Abbildung 17:	Einfluss verschiedener Probenmatrices auf die Nachweisbarkeit des Kontroll- (RBB-Polysucrose) bzw. Analysesubstrats [RBB-(I)-Mdx (1:40)] im optimierten Test.	55

Abbildung 18:	Analyse komplexer Probenmatrices im optimierten Testsystem.	56
Abbildung 19:	Effekt stärkehaltiger Proben auf die nachweisbare Amylase-Aktivität im optimierten Test.	57
Abbildung 20:	Analyse einer auffälligen Aroma-Präparation unter Verwendung des optimierten Testsystems mit 2 h bzw. 18 h Vorverdau.	61
Abbildung 21:	Untersuchung von potenziell amylasehaltigen Lebensmitteln mittels optimiertem Amylase-Nachweis.	63
Abbildung 22:	Relative Nachweisempfindlichkeit verschiedener Testsysteme im Vergleich zum kommerziellen Phadebas-Test.	71

X TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Laut Anlage 4 (zu § 5 Abs. 1 und § 7) Teil A der Zusatzstoff-Zulassungsverordnung als Zusatzstoff zugelassene modifizierte Stärken.	4
Tabelle 2: Beispielhafte Aufstellung verschiedener hitzestabiler, bakterieller α -Amylasen.	9
Tabelle 3: Zusammenstellung üblicher Einsatzbereiche von technischen Enzymen.	11
Tabelle 4: Einsatzbereiche ausgewählter, kommerzieller Enzympräparationen des Herstellers Novozymes A/S in der Lebensmittelindustrie.	13
Tabelle 5: Immunisierung von Mäusen mit RBB-KLH-Konjugaten.	25
Tabelle 6: Verflüssigung von stärkehaltigen Milchprodukten durch kommerziell eingesetzte, amylolytische Enzyme.	35
Tabelle 7: Temperaturabhängige Verflüssigung eines künstlich mit der α -Amylase-Präparation Termamyl® 300L kontaminierten, stärkehaltigen Puddings.	36
Tabelle 8: Relative Affinität der monoklonalen Antikörper 2C7 bzw. 3B5 im nicht-kompetitiven, indirekten EIA.	39
Tabelle 9: Charakteristika der monoklonalen Antikörper 2C7 bzw. 3B5.	40
Tabelle 10: Reaktivität verschiedener RBB-Stärke(derivate) im 2C7-Sandwich-EIA.	42
Tabelle 11: Überprüfung der Testsensitivität.	51
Tabelle 12: Anwendbarkeit des optimierten Nachweisverfahrens zur Untersuchung von stärkefreien Rohwaren.	58
Tabelle 13: Anwendbarkeit des optimierten Nachweisverfahrens zur Analyse von stärkehaltigen Milchprodukten.	60
Tabelle 14: Untersuchung von diversen im Handel erhältlichen Aromen mittels optimiertem Amylase-Nachweis.	62

XI DANKSAGUNG

Großer Dank gilt vor allem Herrn Univ.-Prof. Dr. Dr. h.c. Erwin Märtlbauer für die Überlassung dieses aktuellen und praxisrelevanten Themas. Die Zeit am Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch habe ich als sehr interessant und lehrreich empfunden. Es war eine Freude hier promovieren zu dürfen.

Besonders herzlich möchte ich mich bei Herrn Dr. Richard Dietrich für die kompetente Unterstützung bedanken. Durch dein breites Wissen und deinen Ideenreichtum warst du immer ein verlässlicher Ansprechpartner.

Mein herzlicher Dank gilt außerdem allen weiteren Mitarbeitern des Lehrstuhls für die fröhlichen und unterhaltsamen Momente sowie die kollegiale Zusammenarbeit. Insbesondere möchte ich mich bei Brunhilde Minich, Franziska Faber, Gaby Acar, Margit Straka und Stephanie Straßner für die Hilfsbereitschaft und die Unterstützung bedanken. Auch die gemeinsame Zeit mit meinen Mitdoktoranden habe ich sehr genossen, auch wenn in letzter Zeit aufgrund der Corona-Pandemie gemeinsame Unternehmungen leider nicht mehr in gleichem Umfang möglich waren.

Mein größter Dank gilt meiner Freundin Tori, meinen Eltern und meinen Geschwistern. Danke, dass ihr immer für mich da seid und mir Rückhalt gebt. Nur durch euch war es mir erst möglich diese Arbeit zu verwirklichen.