



TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

**TUM School of Life Sciences**

Forschungsdepartment Life Science Engineering

**Lehrstuhl für Brau- und Getränketechnologie**

Univ.-Prof. Dr.-Ing. Thomas Becker

**Bachelor's Thesis**

**Einfluss der pH-Abhängigkeit des Wheat  $\alpha$ -  
Amylase/Subtilisin Inhibitors (WASI) und deren  
Auswirkung auf Amylasen**

**Influence of pH-dependence of wheat  $\alpha$ -amylase/subtilisin  
inhibitor (WASI) and its effect on amylases**

zur Erlangung des akademischen Grades Bachelor of Science (B. Sc)

**Eingereicht von** Mielchen, Mike, 03736995, Lebensmitteltechnologie

**Betreut von** Carina Stoll, Lehrstuhl für Brau- und Getränketechnologie

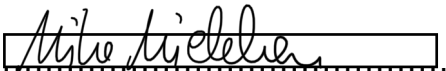
**Eingereicht am** 24.10.2023

## Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere hiermit, dass ich, Mike Mielchen, die hier vorliegende Arbeit selbständig, nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel sowie ohne fremde Hilfe, angefertigt habe. Des Weiteren erkläre ich mich damit einverstanden, dass meine Bachelorarbeit in das Archivsystem des Lehrstuhls für Brau- und Getränketechnologie aufgenommen und bei Bedarf zu weiteren Forschungs- und Lehrzwecken sowie zur Öffentlichkeitsarbeit verwendet werden darf.

Diese Arbeit wurde bisher noch keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Freising, den 24.10.2023



Mike Mielchen

## **Danksagung**

Die vorliegende Bachelorarbeit wurde von Juni bis Oktober 2023 am Lehrstuhl für Brau- und Getränketechnologie erstellt.

Für die Überlassung des Themas und für die Bewertung als 1. Prüfer will ich mich zu Beginn bei Herrn Prof. Dr. Thomas Becker bedanken.

Besonderer Dank gilt auch Frau M. Sc. Carina Stoll für die Betreuung meiner Bachelorarbeit. Die Arbeit bei dir schreiben zu dürfen, hat mir besonders deswegen so viel Spaß gemacht, da du offen für viele meiner Ideen warst und ich diese Themen auch umfänglich mit dir diskutieren konnte.

Des Weiteren möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Lehrstuhls für Brau- und Getränketechnologie bedanken, die mich in vielfältiger Art unterstützt haben.

Bedanken möchte ich mich auch bei meiner Familie für Unterstützungen jeglicher Art.

# Inhaltsverzeichnis

<b>Eidesstattliche Erklärung.....</b>	<b>III</b>
<b>Danksagung .....</b>	<b>IV</b>
<b>Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>V</b>
<b>Liste der Formelzeichen und Abkürzungen .....</b>	<b>VIII</b>
<b>Abkürzungen.....</b>	<b>IX</b>
<b>1 Zusammenfassung.....</b>	<b>1</b>
<b>2 Einleitung und Aufgabenstellung .....</b>	<b>4</b>
<b>3 Material und Methoden .....</b>	<b>8</b>
3.1 Materialien.....	8
3.2 Methoden .....	12
3.2.1 Herstellung des Wheat $\alpha$ -Amylase/Subtilisin Inhibitors (WASI).....	12
3.2.1.1 Kultivierung von <i>Escherichia coli</i> ( <i>E. coli</i> ) MBP WASI .....	12
3.2.1.2 Zellaufschluss zur Proteingewinnung .....	13
3.2.1.3 Proteinaufreinigung mittels Metallionen- Affinitätschromato-graphie – IMAC 1 .....	14
3.2.1.4 Bradford-Assay zur Bestimmung der Proteinkonzentration .....	15
3.2.1.5 Einsatz der TEV-Protease zur Entfernung der His-Tags .....	17
3.2.1.6 Proteinaufreinigung mittels Metallionen-Affinitätschromatographie – IMAC 2 .....	17
3.2.1.7 Reinigung der IMAC-Säule.....	18
3.2.2 Untersuchung der $\alpha$ -Amylase Aktivität des Standardmalzes .....	19
3.2.3 Untersuchung der inhibierenden Wirkung von WASI auf die $\alpha$ -Amylase Aktivität des Standardmalzes.....	22
3.2.4 Rheologische Untersuchung der inhibierenden Wirkung vom WASI im Backprozess von Teigen .....	23
3.2.5 Untersuchung der Maltosebildung im Backprozess unter der inhibierenden Wirkung von WASI.....	26
3.2.6 Untersuchung der inhibierenden Wirkung von WASI auf die $\alpha$ -Amylasen des menschlichen Speichels .....	28
3.3 Statistische Analyse der Datensätze .....	31

3.3.1	Statistische Methodik der Herstellung von WASI .....	31
3.3.2	Statistische Methodik zur Auswertung der $\alpha$ -Amylase Assays .....	31
3.3.3	Statistische Methodik zur Auswertung der Rheologischen Versuche..	32
3.3.4	Statistische Methodik zur Auswertung der Maltosebildung.....	32
<b>4</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>34</b>
4.1	Quantifizierung der Proteinherstellung .....	34
4.2	Inhibierende Wirkung von WASI auf die $\alpha$ -Amylase Aktivität des Standardmalzes .....	35
4.2.1	pH-Wert abhängige $\alpha$ -Amylase Aktivität des Standardmalzes .....	35
4.2.2	pH-Wert abhängige Inhibierung der $\alpha$ -Amylase durch WASI.....	37
4.3	Rheologisches Verhalten von Teigen während des Backprozesses mit WASI .....	39
4.4	Maltosebildung im Backprozess unter dem Einfluss von WASI.....	41
4.5	Verhalten der $\alpha$ -Amylase Aktivität des menschlichen Speichels unter dem Einfluss von WASI .....	43
4.5.1	Findung einer Verdünnungsstufe des menschlichen Speichels für den $\alpha$ -Amylase Assay .....	44
4.5.2	Haltbarkeit der $\alpha$ -Amylase Aktivität des menschlichen Speichels.....	44
4.5.3	Inhibierung der $\alpha$ -Amylase des menschlichen Speichels .....	45
<b>5</b>	<b>Schlussfolgerung und Ausblick.....</b>	<b>49</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>51</b>
<b>7</b>	<b>Liste der Abbildungen und Tabellen.....</b>	<b>55</b>
7.1	Tabellenverzeichnis.....	55
7.2	Abbildungsverzeichnis.....	55
7.3	Formelverzeichnis .....	56

<b>8</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>57</b>
8.1	Reaktion von Blocked-p-Nitrophenyl-Methoheptaoside (BPNPG7) in der Ceralphe-Methode.....	57
8.2	Inhibierende der $\alpha$ -Amylases des menschlichen Speichels.....	58
8.3	Temperaturverlauf während des Backprozesses .....	60
8.4	Liste der Proben entnahmen am Rheometer im Zusammenhang mit der Temperatur.....	61
8.5	Ergebnisse der Personenbefragung zu deren Essensaufnahmen .....	62
8.6	Code zum Extrahieren der CSV-Dateien.....	62
8.7	Code zur Differenzierung der Amylasen.....	64
8.8	Faltbeispiel der nachempfundenen Gärkammer.....	66

## Liste der Formelzeichen und Abkürzungen

### Lateinisches Alphabet und Einheiten

°C	Grad Celsius
cm	Zentimeter
E	Extinktion
g	Gramm
Hz	Hertz
L	Liter
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
nm	Nanometer
OD <sub>600</sub>	Optische Dichte bei der Wellenlänge 600 nm
T	Temperatur
Pa	Pascal
s	Sekunde

---

## Abkürzungen

abs.	Absolut
Arg	Arginin
ASBC	American Society of Brewing Chemists
ATI	$\alpha$ -Amylase/Trypsin bifunctional Inhibitor
BASI	Barley $\alpha$ -Amylase/Subtilisin Inhibitor
BPNPG7	Blocked-p-Nitrophenyl-Methoheptaoside
BSA	Rinderserumalbumin
Ca	Calcium
CaCl	Calciumchlorid
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia Coli</i>
EDTA	Ethylendinitrilotetraessigsäure
HCl	Salzsäure
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IMAC	Immobilisierte Metallionen-Affinitätschromatographie
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
IS	Interner Standard
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
MBP	Maltose binding protein
n	Stichproben
N	Grundgesamtheit
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
pH-Wert	Kehrwert des dekadischen Logarithmus vom Potential des Wasserstoffs
PHS	Pre-havest Sprouting (Vorernte-Auskeimung)
pI	Isoelektrischer Punkt
Pro	Prolin
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
TEV-Protease	Tabakätzvirus-Protease
Tris-HCl	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethanhydrochlorid
rpm	Runden pro Minute
WASI	Wheat $\alpha$ -Amylase/Subtilisin-Inhibitor



# 1 Zusammenfassung

In diesem Dokument wurden die Untersuchungen zusammengefasst, die den Einfluss des pH-Werts auf Wheat  $\alpha$ -Amylase/Subtilisin-Inhibitor (WASI) und den daraus resultierenden Einflüssen auf die  $\alpha$ -Amylasen des Malzes sowie den daraus ableitbaren rheologischen Einflüssen auf Teige untersucht.

Die pH-Wertabhängigkeit von WASI wurde mithilfe der Ceralpha-Methode bestimmt. Malzmehl wurde eingesetzt, um daraus die für Getreide typischen  $\alpha$ -Amylasen zu gewinnen. Um Vergleichswerte zwischen dem System ohne WASI und mit WASI zu gewinnen, wurden Pufferlösungen mit und ohne WASI auf verschiedene pH-Werte eingestellt. Durch die Umsetzung eines Substrats wurde eine chromophore Gruppe frei, welche fotometrisch detektiert werden konnte. Es wurde gezeigt, dass WASI im gesamten Testbereich zwischen den pH-Werten 4.00 und 11.00 inhibierend auf  $\alpha$ -Amylasen im Malz wirken kann.

Die WASI-Lösungen wurden weiterführend in Teigsystemen mit Malz eingesetzt. Das rheologische Verhalten wurde in einem Rheometer bestimmt. Ein typisches Temperatur-Zeitprofil wurde gewählt, um die Prozesse im realen Backprozess darzustellen. Alle halbe Minute wurde das Speichermodul [Pa] gemessen. Unterschieden wurde zwischen Teigen mit Malz und ohne Malz. Zudem wurden Teige mit Malz und WASI vermessen. Diese Teige konnten statistisch nicht signifikant von den Teigen mit Malz differenziert werden, obwohl die Mittelwerte die erwarteten Tendenzen zeigten. Aus den rheologischen Versuchen wurden zu verschiedenen Zeitpunkten Proben zur Maltosebestimmung gewonnen. Mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie wurde der Maltosegehalt bestimmt. Die durchschnittlichen Maltosewerte durch den Einsatz von Malz und WASI lagen unter den Teigen, in denen ausschließlich Malz zum Einsatz gekommen ist. Signifikant ließ sich dies nicht differenzieren.

Acht Probanden lieferten zur Bestimmung, ob WASI auch gegen die  $\alpha$ -Amylase menschlichen Speichels inhibieren kann, Proben ab. Durch den  $\alpha$ -Amylase Assay nach der Ceralpha-Methode wurde festgestellt, dass durch Zugabe von WASI die durchschnittliche  $\alpha$ -Amylase Aktivität signifikant verringern werden konnte.

## Abstract

This document summarizes the studies that examined the influence of pH-value on Wheat  $\alpha$ -Amylase/Subtilisin Inhibitor (WASI) and the resulting effects on the amylases in selected malt and rheological influences on the doughs.

The pH-value dependence of WASI was determined using the Ceralpha method. Malt flour was used to obtain the  $\alpha$ -amylases typical of grains. In order to obtain comparison values between the system without WASI and with WASI, buffer solutions with and without WASI were adjusted to different pH-values. The reaction of a substrate released a chromophore group, which could be detected photometrically. WASI was shown to have an inhibitory effect on  $\alpha$ -amylases in malt over the entire test range between pH-value 4.00 and 11.00.

The WASI solutions were continued in dough systems with malt. The rheological behavior was determined in a rheometer. A typical temperature-time profile was chosen to represent the processes in the real baking process. The storage module [Pa] was measured every half minute. A distinction could be made between doughs with malt and without malt. In addition, doughs with malt and WASI were measured, which could not be statistically significantly differentiated from doughs with malt, although the mean values showed the expected tendencies. Samples for maltose determination were obtained from the rheological experiments at various times. The maltose content was determined using high-performance liquid chromatography. The average maltose values resulting from the use of malt and WASI were below the doughs in which only malt was used. This could not be differentiated significantly.

Eight persons provided samples to determine whether WASI also inhibits human salivary  $\alpha$ -amylase. Through the  $\alpha$ -amylase assay of the Ceralpha method, it was determined that adding WASI can significantly reduce the average activity.

## Highlights

- Erstmals wurde die pH-Wert Abhängigkeit von WASI über das gesamte Spektrum an pH-Wert untersucht, an denen die  $\alpha$ -Amylasen aus Malz aktiv sind.
  - Es konnte gezeigt werden, dass WASI im Bereich zwischen pH-Wert 4.00 und 11.00 einen inhibierenden Einfluss auf  $\alpha$ -Amylasen aus dem Malz haben kann.
  - Die  $\alpha$ -Amylasen des menschlichen Speichels können durch WASI inhibiert werden.
  - Es wurde damit erstmalig gezeigt, dass WASI einen Einfluss auf den Menschen haben kann.
- 
- For the first time, the pH dependence of WASI over the entire pH spectrum of  $\alpha$ -amylases was investigated.
  - It could be shown that WASI can have an inhibiting influence on  $\alpha$ -amylases from the malt in the range between pH 4.00 and 11.00.
  - The  $\alpha$ -amylases of human saliva can be inhibited by WASI.
  - It has been shown for the first time that WASI can have an impact on humans.

## 2 Einleitung und Aufgabenstellung

Ein deutlich größerer Anteil, des 2023 in Europa angebauten Getreides, als angenommen, kann nur noch als Tierfutter verwendet werden. Dies ist auf die ungünstigen Witterungsbedingungen zurückzuführen. Insbesondere Regenfälle sorgten für Probleme bei der Kornqualität [1]. Die Problematik entsteht hierbei unter anderem durch die Vorernte-Auskeimung (Pre-harvest Sprouting = PHS) von Getreide. Wünschenswert ist, dass die Keimung der Körner vor der Ernte unterdrückt wird, da es die Qualität des Getreides erheblich beeinflussen kann [2]. Vor der Ernte ausgekeimtes Getreide weist eine überdurchschnittlich hohe  $\alpha$ -Amylase Aktivität auf. Getreide mit zu hoher  $\alpha$ -Amylase Aktivität ist für die Verarbeitung in Lebensmittel oft nicht geeignet, wodurch der Markt für solches Getreide kleiner ist und dadurch die Preise geringer [3]. Da es in Europa zu klimabedingten Anhäufungen von Starkregenereignissen kommt, könnte die Vorernte-Auskeimung ein zunehmendes Problem für die Versorgung mit Getreideprodukten werden [4] [5]. Möglichkeiten, die Getreidequalität aufzuwerten, indem die  $\alpha$ -Amylase Aktivität gesenkt wird, könnten dadurch ein Schlüsselement der Ernährungssicherheit darstellen. Neben chemischen Hemmstoffen wie Acerbose, können Amylasen auch natürlich gehemmt werden [6]. In Getreide liegen natürliche Inhibitoren bereits vor [7]. Inhibitoren binden sich spezifisch an Enzyme und unterdrücken die katalytische Aktivität dieser Proteine [8]. Diese dienen als Hemmstoffe, unter anderem um verschiedenste Stoffwechselwege zu regulieren und als Schutzfunktion in dem die Enzymaktivitäten von Fressfeinden deaktiviert wird [7].

Etwa 4.1 % der Weizenproteine werden den bifunktionellen Inhibitoren zugerechnet [9]. Im Genom wurden 19 Sequenzen für bifunktionelle Inhibitoren identifiziert. Neben einigen Inhibitoren gegen exogene  $\alpha$ -Amylasen wurden auch zwei endogene  $\alpha$ -Amylasen Inhibitoren identifiziert, wovon einer WASI (Wheat  $\alpha$ -Amylase/Subtilisin-Inhibitor) ist [10]. WASI konnte sowohl auf der äußeren Schicht von Getreidesamen nachgewiesen werden, als auch im Endosperm des Weizenkornes [11]. Die Synthese von WASI ist in der Kornentwicklung besonders hoch. Höchstwerte wurden bei voller Reife festgestellt [12].

Inzwischen sind schon einige physikalische Eigenschaften von WASI ermittelt worden. Das Wirkungsmaximum liegt zwischen den pH-Werten 7.8 und 8.0 [12] [11]. Der isoelektrische Punkt wird mit 7.0 [12] [11] und 7.2 angegeben [13]. WASI ist zudem sehr Hitzestabil, da es bei einem pH-Wert von 8.0 nach einer Wärmbehandlung von

90 °C für 10 min. immer noch aktiv ist [12] [11]. Zudem wurde das Molekulargewicht bestimmt. Die Ergebnisse dazu reichen von 19600 kD [14] über 20500 kD [13] bis hin zu 21500 kD [12] [11].

Die räumliche Struktur von WASI wurde von Zemke analysiert [14]. Dieser beschreibt, dass die Struktur durch mehrere  $\beta$ -Stränge ausgebildet ist, die annähernd parallel verlaufen. Hierdurch entsteht die Struktur eines  $\beta$ -Fasses. Im Fall von WASI ist diese Struktur allerdings verzerrt. Die Gesamtstruktur wird durch zwei Disulfidbrücken stabilisiert. Diese Bindungen sind kovalent. Zudem wird vermutet, dass eine Bindungsstelle von WASI auf der Außenseite dieses  $\beta$ -Fasses zwischen den Aminosäuren 66 und 67 liegt. Es wird beschrieben, dass wenn der Inhibitor an eine Protease bindet, eine Peptidbindung gespalten wird, die zwischen den Aminosäuren 75 und 76 liegt [14]. Es konnte zudem gezeigt werden, dass WASI gegen Protease K inhibiert [14] [15]. Hier wird beschrieben, dass WASI an die Aminosäure Tyr86 (Tryrosin) von Protease K bindet [15].

In der Literatur wird nicht selten ein Vergleich zwischen WASI und dem äquivalent aus Gerste, dem BASI (Barley  $\alpha$ -Amylase/Subtilisin-Inhibitor), hergestellt. Dies liegt daran, dass die Sequenzidentität zwischen WASI und BASI bei 92 % liegt und dadurch Ähnlichkeiten zu erwarten sind [16]. Wie auch WASI hat BASI zwei unterstützende Disulfidbrücken, welche die Tertiärstruktur stützen. BASI soll zudem eine  $\beta$ -Trefoil-Topologie aufweisen, welche eine Form des  $\beta$ -Fasses ist, diese besteht wie bei WASI aus  $\beta$ -Faltblättern [17]. BASI kann auch mit  $\alpha$ -Amylasen aus Weizen Komplexe bilden [18]. Es konnte zudem gezeigt werden, dass BASI gegen die Gersten- $\alpha$ -Amylase 2 eine hohe inhibierende Wirkung hat, gegen die Gersten- $\alpha$ -Amylase 1 hingegen eine sehr geringe inhibierende Wirkung. Die Aminosäuren Arg128 (Arginin) und Pro129 (Prolin) aus Gersten- $\alpha$ -Amylase 2 konnten zudem in Gersten- $\alpha$ -Amylase 1 eingebaut werden, welche die Sensitivität von BASI gegenüber Gersten- $\alpha$ -Amylase 1 um ein Hundertfaches steigern kann. In Betrachtung der räumlichen Struktur wurde daraus abgeleitet, dass BASI die Gersten- $\alpha$ -Amylase 2 nicht kompetitiv hemmt [17]. Zudem wird beschrieben, dass für einen stabilen Enzym-Inhibitor-Komplex Wasserstoffbrückenbindungen eine entscheidende Rolle spielen [15].

Die Anwendungsforschung von WASI brachte auch schon einige erkenntnisreiche Ergebnisse. So konnte Schuster ein Verfahren entwickeln, welches ermöglicht WASI mithilfe des rekombinanten *Escherichia coli Shuffle T7 express MBP WASI* biotechnologisch herzustellen. Dadurch hat sie die Möglichkeit geschaffen, zukünftig

WASI in größeren Mengen herzustellen und einzusetzen [19]. Linner untersuchte daraufhin den rekombinanten *Escherichia coli Shuffle T7 express MBP WASI* und konnte feststellen, dass eine Inaktivierung der  $\alpha$ -Amylasen bei einem pH-Wert von 5.4 bis zu 84 % betragen kann [20]. Loder konnte zudem zeigen, dass ein Einsatz von WASI in der Brotmatrix zu einer Hemmung der  $\alpha$ -Amylase Aktivität führt. Dazu wurde gekeimtes Getreide in Form von Malzmehl eingesetzt. Es wurde damit gezeigt, dass WASI die Problematiken, die in Gebäcken mit zu hoher  $\alpha$ -Amylase Aktivität entstehen, abdämpfen kann [21].

Wenn WASI in Teigen in größeren Maßstäben eingesetzt werden soll, muss der Einfluss von WASI im Gesamtsystem des Teiges betrachtet werden. Amylasen spalten Stärke in kürzere Polysaccharide. Kurzkettige Zucker können wiederum von Milchsäurebakterien und Hefen verarbeitet werden [22]. Durch die Milchsäuregärung entsteht Milchsäure im Teigsystem. Bei einer übermäßig starken Milchsäuregärung verlässt der pH-Wert den optimalen Arbeitsbereich der Amylasen. Dadurch kommt es auf natürlichem Weg zu einem geringeren Abbau von Polysacchariden [23]. WASI könnte diesem System eine andere Ausprägung verleihen. Angenommen WASI würde besonders gut im sauren oder nahe dem neutralen Bereich inhibieren, so würden die  $\alpha$ -Amylasen schon bei einem pH-Wert, der näher am neutralen Bereich liegt, aufhören zu Arbeiten und sehr niedrige pH-Werte könnten im Teig nicht mehr erreicht werden. Wenn aber WASI die maximale Aktivität eher im alkalischen Bereich aufweisen würde, könnte WASI möglicherweise kein direkter Lösungsansatz für Teige mit hoher  $\alpha$ -Amylase Aktivität sein oder WASI müsste entsprechend in höheren Mengen eingesetzt werden. In den Vorgängen im Teigsystem spielt der pH-Wert eine essenzielle Rolle. Um das Reaktionssystem im gesamten abzubilden, wird demnach die pH-Werte-Abhängige Aktivität der  $\alpha$ -Amylasen im Teigsystem und die pH-Wert abhängige Inhibierungsleitung von WASI benötigt. Die pH-Wert abhängige Inhibierung von WASI gegenüber  $\alpha$ -Amylasen wurde bisher nicht über die erforderliche Bandbreite an pH-Werten bestimmt. Da hier folglich dringender Handlungsbedarf besteht, ist diese Lücke mit dieser Arbeit zu schließen. Die zu untersuchende Theorie war, dass WASI nur in bestimmten Bereichen eine inhibierende Wirkung auf  $\alpha$ -Amylasen haben könnte. Hierzu wurden Pufferlösungen, welche den Inhibitor WASI beinhalteten, auf verschiedene pH-Werte eingestellt. Diese Pufferlösungen wurden im Anschluss eingesetzt, um  $\alpha$ -Amylase Assays nach der Ceralpha-Methode durchzuführen. Beim Vergleich mit Puffern ohne WASI konnte, in Abhängigkeit vom pH-Wert, die

Inaktivierung beobachtet werden.

Ein weiterer entscheidender Punkt bei WASI im Teigsystem, stellt die Temperaturabhängigkeit da. Wie bereits beschrieben wurde, behält WASI selbst nach einer Hitzeeinwirkung von 10 min. für 90 °C immer noch seine Inhibierungsfähigkeit [11] [12]. Der Backprozess ist aber kein Prozess, welcher durch einen linearen Verlauf zwischen Temperatur und Zeit definiert werden kann. Im Kontext der Inaktivierung bei Organismen in der Milch kann sowohl eine sehr hohe Temperatur mit sehr kurzer Zeit gewählt werden als auch eine sehr lange Zeit bei niedrigerer Temperatur, um Organismen abzutöten [24]. Bei einer Untersuchung, ob WASI auch in Teigwaren eingesetzt werden kann, ist deswegen die Kombination aus Zeit und Temperatur entscheidend, die beim Backen im Teig erreicht wird. Die Fragestellung, ob WASI nur bis zu einem bestimmten, für den Backprozess typischen, Punkt im Temperatur-Zeitverhältnis seine Aktivität behält, sollte in dieser Arbeit untersucht werden. Um dies zu untersuchen, wurden rheologische Messungen angestellt, welche den Temperatur-Zeitverlauf berücksichtigen. Von diesen rheologischen Messungen wurden zudem Proben auf ihren Maltosegehalt untersucht. Wenn WASI die  $\alpha$ -Amylasen im Backprozess hemmt, sollte dies durch die Entwicklung des Maltoseverlaufs im Backprozess ersichtlich sein.

Für ein breiteres Anwendungsgebiet von WASI wurden einige Überlegungen zum menschlichen Speichel angestellt. Der Speichel spielt bei der Ansiedelung von Mikroorganismen im Mund eine entscheidende Rolle. Es wurden inzwischen über 50 Makromoleküle festgestellt, welche die Speicheldrüsen absondern [25]. Eines dieser Makromoleküle sind Speichel- $\alpha$ -Amylase. Diese startet die Vorverdauung von stärkehaltigen Lebensmitteln schon im Mundraum. Amylasen können sich zudem im Zahnbelag oder auf der Schmelzoberhaut, eine hornartige Schicht auf der Zahnoberfläche, festsetzen. Die Amylasen katalysieren den Abbau von Stärkeprodukten zu niedermolekularen Zuckern. Dies führt dazu, dass an allen Stellen, an denen sich Amylasen anlagern, ausreichen Nahrungssubstrat für Bakterien vorliegt. Der Grund, warum stärkehaltige Produkte als kariogen angesehen werden, ist der, dass die niedermolekularen Zucker von den Bakterien unter anderem zu Säuren verstoffwechselt werden. Diese Säuren demineralisieren den Zahnschmelz, indem ein Entzug von Calcium und Phosphat stattfindet [26].

Die Hypothese das WASI auch  $\alpha$ -Amylasen des menschlichen Speichels inhibieren kann, wird hier untersucht.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Materialien

In den nachfolgenden Tabellen sind die Geräte, Materialien und Chemikalien aufgeführt, die für diese Arbeit verwendet wurden.

**Tabelle 1 Verwendete Geräte / Materialien**

Bezeichnung	Spezifizierung	Hersteller
Amicon Ultra-15 Zentrifugen-Filtereinheit (1000 MWCO)	15 ml	Merck KGaA (Darmstadt, DE)
Analysewaage	Kern PCB 2500-2	Kern & Söhne GmbH (Balingen, DE)
Analysewaage	Kern PCB 100-3	Kern & Söhne GmbH (Balingen, DE)
Analysewaage	LA 314i	VWR International GmbH
Autoklav	Standautoklav VX- 75	System GmbH & Co. KG (Linden, KG)
Einmalspritzen	2 ml	B. Braun Melsungen AG (Melsungen, DE)
Falcon Tube	15 ml	VWR International GmbH (Darmstadt, DE)
Falcon Tube	50 ml	VWR International GmbH (Darmstadt, DE)
Feuchtebestimmer	Kern DAB 100-3	Kern & Söhne GmbH (Balingen, DE)
Flüssigkeitschromatograph ÄKTA pure	ÄKTA pure mit 1-ml- HisTrap™-excel- Säule und 5-ml- HisTrap™-excel- Säule	Cytivia (Marlborough, USA)
HPLC	Dionex U3000	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Inkubationsschüttler	Innova 42 Incubator Shaker Series	Eppendorf SE (Hamburg)



Magnetrührplatte	RCT basic	IKA-Werk GmbH & Co. KG (Staufen, DE)
Mehrkanalpipette	300 µl	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Mehrkanalpipette	200 µl	Eppendorf SE (Hamburg)
Mikroreaktionsgefäß	1.5 ml	SARSTEDT AG & Co.KG (Nürnberg, DE)
Mikrotiterplatte	96-Wells	Thermo Fischer Scientific (Waltham, US)
Multidetektionsreader	BioTek Synergy H1	BioTek (Santa Clara, USA)
Multidetektionsreader	Cytation 5 Imaging Reader	Agilent Technologie, Inc. (Santa Clara, USA)
pH-Meter	pHenomenal	VWR International GmbH (Darmstadt, DE)
pH-Meter	Testo 206	Testo SE & Co. KGaA. (Tritsee-Neustadt, DE)
Pipettenspitzen	10 µl, 200 µl, 300 µl, 1000 µl	SARSTEDT AG & Co.KG (Nürnberg, DE)
Pipettenspitzen	5000 µl	Th. Geyer GmbH & Co.KG (Rennigen, DE)
Kolbenhubpipette 0.5 bis 10 µl	Eppendorf Research plus	Eppendorf SE (Hamburg, DE)
Kolbenhubpipette 10 bis 100 µl	Eppendorf Research plus	Eppendorf SE (Hamburg, DE)
Kolbenhubpipette 100 bis 1000 µl	Eppendorf Research plus	Eppendorf SE (Hamburg, DE)
Kolbenhubpipette bis 5000 µl		VWR International GmbH (Darmstadt, DE)
Rheometer		Anton Paar GmbH (Graz, AUT)
Spiralknetter	SPA12-4	DIOSNA DIERKS & Söhne GmbH (Osnabrück, DE)
Skalpell	Karbonstahl	Schreiber Instrumente
Ultra-Turax	Ultra-Turrax T25	JANKE & KUNKEL GmbH & Co. KG

Ultraschallbad	USC-TH	VWR International GmbH (Darmstadt, DE)
Vortex-Mischer	Vortex Genie 2	Bender & Hobein GmbH (Bruchsal, DE)
Vials mit Kappen		Wagner & Munz GmbH, (München, DE)
Zentrifuge	Centrifuge 5810/5810 R	Eppendorf SE (Hamburg, DE)

**Tabelle 2 Verwendete Chemikalien und Rohstoffe**

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
2-Deoxy-D-Glucose	Sigma-Aldrich & Co, (St. Louis, US)
3-Morpholinopropansulfonsäure (MPS)	Merck KGaA (Darmstadt, DE)
Albumin, fettsäurefrei (98%)	Carl Roth GmbH & Co KG (Karlsruhe, DE)
Acetonitril	VWR International GmbH (Darmstadt, DE)
Calciumchlorid-Dihydrat ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ )	Merck KGaA (Darmstadt, DE)
di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Merck KGaA (Darmstadt, DE)
DL-Äpfelsäure	Merck KGaA (Darmstadt, DE)
Fructose	Sigma-Aldrich & Co, (St. Louis, US)
Glucose	Sigma-Aldrich & Co, (St. Louis, US)
Hefeextrakt	CHEMSOLUTE (Th. Geyer GmbH, Rennigen DE)
Imidazol (99 %)	Thermo Fisher Scientific (Waltham, US)
Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Carl Roth GmbH & Co KG (Karlsruhe, DE)
Kanamycin-Sulfat	Thermo Fisher Scientific (Waltham, US)
L(+)-Milchsäure (90 %)	AppliChem GmbH (Darmstadt, DE)
Lysozym	Merck KGaA (Darmstadt, DE)
Maltose	Sigma-Aldrich & Co, (St. Louis, US)
Maltotriose	Sigma-Aldrich & Co, (St. Louis, US)

Malz (Quintus Keimungsbedingung: 18°C fallend auf 14 °C)	M. Sc. Carina Stoll, Lehrstuhl für Brau- und Getränketechnologie (Freising, DE)
Methanol (99,9 %)	VWR International GmbH (Darmstadt, DE)
Natriumchlorid (NaCl)	VWR International GmbH (Darmstadt, DE)
Natriumhydroxid (NaOH) (>99%)	Carl Roth GmbH & Co KG (Karlsruhe, DE)
Natriumhydroxid	Avantor Performance Materials Poland S.A.,
Nickel-(II)-Sulfat-6-Hydrat	Sigma-Aldrich & Co, (St. Louis, US)
Paraffin öl	Sigma-Aldrich & Co, (St. Louis, US)
Pepton aus Casein	CHEMSOLUTE (Th. Geyer GmbH, Rennigen DE)
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	AppliChem GmbH (Darmstadt, DE)
Pufferlösung (pH-Wert 4.01 und 7.00)	Carl Roth GmbH & Co KG (Karlsruhe, DE)
Reinstwasser aus TKA MicroPure	Thermo Fisher Scientific GmbH, (Dreieich, DE)
Roti-Quant	Carl Roth GmbH & Co KG (Karlsruhe, DE)
Saccharose	Sigma-Aldrich & Co, (St. Louis, US)
Salzsäure	VWR International GmbH (Darmstadt, DE)
TEV-Protease	Merck KGaA (Darmstadt, DE)
Tris-(hydroxymethyl)-amino- methanhydrochlorid (Tris-HCl)	Merck KGaA (Darmstadt, DE)
Urea (Harnstoff)	VWR International GmbH (Darmstadt, DE)
WASI (Wheat $\alpha$ -Amylase/Subtilisin Inhibitor)	M. Sc. Carina Stoll, Lehrstuhl für Brau- und Getränketechnologie (Freising, DE)
Weizenmehl Typ 550	Rosenmühle GmbH, (Ergolding, DE)

---

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Herstellung des Wheat $\alpha$ -Amylase/Subtilisin Inhibitors (WASI)

Die Produktion von WASI fand gemäß dem Verfahrensprotokoll statt, welches von Schuster für die Expression von WASI in *Escherichia coli* (*E. coli*) ausgearbeitet wurde [19]. Im Folgenden werden die einzelnen Arbeitsschritte dargestellt:

#### 3.2.1.1 Kultivierung von *Escherichia coli* (*E. coli*) MBP WASI

Die Kultivierung der Bakterienzellen erfolgte in zwei Teilschritten. Zu Beginn wurde eine Vorkultur erstellt, mit welcher im Anschluss die Hauptkultur angeimpft wurde.

Für die Vor- und Hauptkultur wurde LB-Medium hergestellt. Hierfür wurden Hefeextrakt, Natriumchlorid und Pepton in den aus Tabelle 3 ersichtlichen Mengenverhältnissen in vollentsalztem Wasser gelöst. Mittels Salzsäure und Natriumhydroxid wurde der pH-Wert auf 7.00 eingestellt. Anschließend wurde das LB-Medium autoklaviert (121 °C für 15 min.). Kanamycin-Sulfat wurde in einem Mikroreaktionsgefäß gelöst. Für einen Liter LB-Medium wurde das Kanamycin-Sulfat in einem ml vollentsalztem Wasser gelöst. Das gelöste Kanamycin-Sulfat wurde unter einer sterilen Werkbank durch ein Sterilfilter mit einer Porengröße von 0.45  $\mu$ m in das LB-Medium gegeben.

**Tabelle 3 Zusammensetzung des LB-Mediums**

Reagenz	Menge in g/l
Hefeextrakt	5.000
Natriumchlorid (NaCl)	10.000
Pepton	10.000
Kanamycin-Sulfat	0.036

Für die Vorkultur wurde in einen sterilen 500 ml Erlenmeyerkolben ungefähr 200 ml LB-Medium gegeben. Zudem wurden zwei Tropfen der von Carina Stoll bereitgestellten Zellkultur des *E. Coli Shuffle T7 Express MBP WASI* in den Erlenmeyerkolben gegeben. Diese Vorkultur wurde für etwa 18 Stunden bei 30 °C im Inkubationsschüttler bei 150 rpm inkubiert.

Von dieser Vorkultur wurde eine Probe im Spektralfotometer bei einer Wellenlänge von 600 nm gegen einen Blindwert in Form von sterilem LB-Medium mit Kanamycin-Sulfat vermessen. Um ein stabiles Wachstum der Hauptkultur zu gewährleisten, sollte die Hauptkultur so angeimpft werden, dass die darin enthaltenen Kulturen eine optische Dichte von 0.1 bei einer Wellenlänge von 600 nm aufweisen. Hierfür wurde die Formel 1 zur Berechnung der Zugabe der Vorkulturmenge in die

Hauptkultur verwendet. Für die Hauptkultur wurden wiederum sterile Erlenmeyerkolben verwendet, welche mit 200 ml LB-Medium befüllt wurden.

**Formel 1: Berechnung der Zugabe der Vorkultur in die Hauptkultur**

$$\text{Zugabe der Vorkultur in Milliliter} = \frac{\text{LB - Medium im Erlenmeyerkolben}}{\text{optische Dichte}_{600} \cdot \text{Verdünnungsfaktor} \cdot 10}$$

Die Hauptkulturen wurden wieder im Inkubationsschüttler bei 150 rpm und 30 °C inkubiert, bis die Kulturen so stark angewachsen sind, bis eine optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm zwischen 0.4 und 0.8 erreicht wurde. Ein Wachstum bis zu einer optischen Dichte von 0.6 wurde als optimal angesehen. Beim Erreichen dieser Bakterienkonzentration wurden in jedem Erlenmeyerkolben unter der sterilen Werkbank 800 µl einer IPTG-Lösung hinzugegeben, um die Proteinsynthese zu starten. In der Kultivierungsphase würde die Proteinsynthese das Wachstum behindern und es würde vermehrt zum Absterben von Zellen kommen. Die IPTG-Lösung bestand aus vollentsalztem Wasser mit einer IPTG-Konzentration von 23.825 g/L.

Nach der Zugabe der IPTG-Lösung wurden die Kulturen für ungefähr 68 Stunden bei 16 °C und 150 rpm inkubiert.

### 3.2.1.2 Zellaufschluss zur Proteingewinnung

Die Zellernte, der aus 3.2.1.1 entstandenen Kulturen, erfolgte in der Zentrifuge bei 4000 rpm für 25 Minuten und 4 °C. Hierfür wurden die Kulturen in 50 ml Falcon Tubes überführt. Der Überstand, der durch die Phasentrennung beim Zentrifugieren entstand, wurde verworfen. In den zurückbleibenden Pellets sind die Zellkulturen mit dem Zielprotein.

Um das Zielprotein extrahieren zu können, mussten die Zellen aufgeschlossen werden. Hierfür wurde Lysepuffer hergestellt, welcher aus den in Tabelle 4 ersichtlichen Bestandteilen hergestellt wurde. Zudem wurde der pH-Wert mittels Salzsäure (HCl) und Natriumhydroxid (NaOH) auf 7.5 eingestellt.

**Tabelle 4 Zusammensetzung des Lysepuffers**

Reagenzien	Menge g/l
Dinatriumhydrogenphosphat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	3.560
Natriumchlorid (NaCl)	29.240
Lysozym	0.720
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	0.087

Pro Pellet wurde in jedes Falcon Tube 10 ml des Lysepuffers gegeben. Durch vortexen wurde das Sediment vom Boden gelöst. Ab diesem Zeitpunkt begann eine Inkubationszeit von 20 min.

Im Anschluss an die Inkubation wurden die Inhalte von 4 Falcon Tubes in ein Falcon Tube vereint und auf Eis gestellt. Jedes dieser Falcon Tube wurde im Anschluss für 5 min. bei 50 % Amplitude und 50 % Zyklen mit einer Ultraschallsonde behandelt. Die Proben wurden darauffolgend bei 4000 rpm und 4 °C für 60 Minuten zentrifugiert. In den Falcon Tube ist nun ein Sediment mit einem Überstand zu sehen. Zudem bildete sich über dem Überstand noch ein fester weißer Schaum. Beim Zusammenführen der Überstände für die Proteinaufreinigung wurde immer darauf geachtet, dass der feste Schaum zurückbleibt, um bei der Proteinaufreinigung die Anlage nicht zu verstopfen.

### **3.2.1.3 Proteinaufreinigung mittels Metallionen- Affinitätschromatographie – IMAC 1**

Die Proteinaufreinigung wurde mit dem Chromatographiesystem ÄKTA™ pure durchgeführt. Diese wurde sowohl mit einer 1-ml-HisTrap™-excel-Säule betrieben als auch mit dem 5 ml äquivalent dieser Säule. Diese arbeitet mittels Metallionen-Affinitätschromatographie. Ziel ist es, dass die im Zielprotein enthaltenen Histidin-Tags mit den in der Säule enthaltenen Nickel-2-Ionen interagieren und somit in der Säule vorerst zurückbleiben. Erst durch das Auswaschen soll das Zielprotein wieder in Lösung gelangen. Zum Aufreinigen wurden ein Bindepuffer und ein Elutionspuffer benötigt. Der Inhalt dessen ist in der nachfolgenden Tabelle 5 dargestellt. Sowohl der Elutions- als auch der Bindepuffer wurden auf einen pH-Wert von 7.3 mittels Natriumhydroxids (NaOH) und Salzsäure (HCl) eingestellt.

**Tabelle 5 Zusammensetzung des Bindepuffers und des Elutionspuffer**

Reagenzien	Bindepuffer in g/l	Elutionspuffer in g/l
3-Morpholinopropansäure (MPS)	10.46	10.46
Natriumchlorid (NaCl)	17.53	5.84
Imidazol	1.36	34.14

Die Aufreinigung in der Äkta mittels IMAC 1 kann in 7 Schritte unterteilt werden. Diese wurden in Tabelle 6 dargestellt. Da die Imidazolkonzentration von entscheidender Bedeutung für das Lösen des Zielproteins ist, wurde diese in einer weiteren Spalte ergänzt. Zu sehen ist, dass die Imidazolkonzentration in den Elutionsschritten immer weiter ansteigt. Da das Zielprotein an der Säule bindet, dient das Imidazol zum Lösen

dieser Bindung. Hierdurch kann die Elution 2 aufgefangen werden, welche das Zielprotein mit dem Histidin-Tag beinhaltet.

**Tabelle 6 Aufreinigen mittels IMAC 1**

Schritt	Bezeichnung	Bindepuffer [%]	Elutionspuffer [%]	Imidazol [mM]
1	Äquilibrieren 1	100	0	20
2	Probenaufgabe	100	0	20
3	Waschen der Säule	100	0	20
4	Elution 1	90	10	68
5	Elution 2	50	50	260
6	Elution 3	25	75	380
7	Äquilibrieren 2	100	0	20

### 3.2.1.4 Bradford-Assay zur Bestimmung der Proteinkonzentration

Von dem Zielprotein muss der Histidin-Tag entfernt werden. Da dies mit einer Protease durchgeführt wurde, muss zum einen der Proteingehalt ermittelt werden, aber auch das Milieu für die Protease angepasst sein. Um das Milieu zu ändern, wurde ein Pufferwechsel durchgeführt. Hierfür wurde die Lösung mit dem aufgereinigten Protein in eine Amicon Ultra-15 Zentrifugen-Filtereinheit gegeben. Anschließend wurde diese Einheit bei 4000 rpm und 4 °C für 30 Minuten zentrifugiert. Das Ziel hierbei ist, dass die Flüssigkeit durch den Filter hindurch dringt, das Protein in der Filtereinheit aber zurückbleibt. Anschließend kann das Protein mit dem neuen Puffer wieder aus der Filtereinheit gewaschen werden. In diesem Fall wurde das Protein mit 5 ml des Tris-HCl-Puffer gelöst. Dieser Puffer besteht aus den in der Tabelle 7 bestehenden Komponenten. Zudem wurde noch der pH-Wert auf 7.5 mit Natriumhydroxid (NaOH) und Salzsäure (HCl) eingestellt.

**Tabelle 7 Zusammensetzung des Tris-HCl Puffers**

Reagenzien	Menge in g/l
Tris-HCl	1.461
Natriumchlorid (NaCl)	17.336

Nach dem der Tris-HCl-Puffer in die Amicon Zentrifugeneinheit gegeben wurde, wurde anschließend mit einer Pipettenspitze und einer entsprechenden Kolbenhubpipette die Flüssigkeit in Bewegung gebracht, um das Protein von der Filtereinheit zu lösen.

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde der Bradfordassay nach dem Protokoll von der Carl Roth GmbH & Co. KG (2022) eingesetzt. Hierfür wurden zwei

BSA-Lösungen, welche das Referenzprotein beinhalten, mit zwei unterschiedlichen Proteinkonzentrationen (100 µg/ml und 400 µg/ml) eingesetzt. Das Protokoll sieht vor, dass eine Ausgleichsgerade mit dem Referenzprotein und eine Verdünnungsreihe mit dem Zielprotein erstellt wird. Als Puffer wurde in beiden Fällen der Tris-HCl-Puffer verwendet. Im Folgenden wurde das Pipettierschema der Verdünnungsreihe mit dem Referenzprotein und das Pipettierschema der Probe, von der die Proteinkonzentration bestimmt werden sollte, dargestellt.

**Tabelle 8 Pipettierschema der BSA-Verdünnungsreihe**

BSA-Konzentration [µg/ml]	Volumen aus der BSA-Verdünnung	Puffervolumen [µl]
0	0	110
20	40 µl aus 100 µg/ml	160
30	45 µl aus 100 µg/ml	105
40	80 µl aus 100 µg/ml	120
50	100 µl aus 100 µg/ml	100
60	120 µl aus 100 µg/ml	80
80	160 µl aus 100 µg/ml	40
100	200 µl aus 400 µg/ml	600

**Tabelle 9 Pipettierschema für die Verdünnungsreihe der Probe**

Verdünnung	Volumen aus der Probenkonzentration [µl]	Puffervolumen [µl]
1:2	100	110
1:5	40	160
1:10	20	180
1:20	10	190
1:30	6.7	193.3

Die Proteinkonzentration wurde anschließend mittels eines einfachen linearen Regressionsmodells berechnet. Die Gleichung der einfachen linearen Regression setzte sich dabei folgendermaßen zusammen:

$$Extinktion_{595\text{ nm}} = \beta_0 + \beta_1 \cdot \text{BSA-Konzentration } (\mu\text{g/ml})$$

$\beta_0$  steht für den Achsenabschnitt, also für die Extinktion, bei der die BSA-Konzentration 0 µg/ml entspricht. Damit wurde die Grundextinktion berücksichtigt.  $\beta_1$  gibt die Steigung an, also die Extinktion, um welche die Gesamtextinktion steigt, wenn die Proteinkonzentration um 1 µg/ml steigt.



Mittels des Pipettierschemas der BSA-Verdünnung konnte die Koeffizienten  $\beta_0$  und  $\beta_1$  bestimmt werden. Im Anschluss wurde von den Extinktionswerten der Probe jeweils der Durchschnitt pro Konzentration bestimmt. Anhand der durchschnittlichen Extinktion und den berechneten Koeffizienten konnte nun der Proteingehalt zurückgerechnet werden. Es wurde lediglich die Extinktionen berücksichtigt, welche innerhalb der Extinktionen der BSA-Referenzreihe lagen.

### 3.2.1.5 Einsatz der TEV-Protease zur Entfernung der His-Tags

Mittels der im Kapitel 3.2.1.4 ermittelten Proteinkonzentration konnte im Anschluss die Menge an TEV-Protease bestimmt werden, welche für das Abspalten des Histidin-Tags vom Zielprotein verantwortlich ist. Hierzu wurden pro 100 mg bestimmter Proteinmenge 1 mg der TEV-Protease hinzugegeben. Nach einer Inkubationszeit von ungefähr 16 h bei 4 °C wurde die Proteinaufreinigung 2 (Kapitel 3.2.1.6) durchgeführt.

### 3.2.1.6 Proteinaufreinigung mittels Metallionen-Affinitätschromatographie – IMAC 2

In der zweiten Proteinaufreinigung sind nur noch Zielprotein und der Histidin-Tag vorhanden. Das Ziel ist es nun, dass wieder die Histidin-Tags binden und das Zielprotein einfach durchfließt. Demnach bietet sich ein vereinfachtes Aufreinigungsverfahren, im Vergleich zur ersten Proteinaufreinigung, an. Im Prinzip fallen die ehemaligen Schritte der Elution 1 und 2 weg und es wurde nur noch der dritte Elutionsschritt durchgeführt. Dies führt dazu, dass die Probe verwendet wurde, die bei der Probenaufgabe nicht binden. Der Rest konnte verworfen werden.

**Tabelle 10 Aufreinigung mittels IMAC 2**

Schritt	Bezeichnung	Bindepuffer [%]	Elutionspuffer [%]	Imidazol [mM]
1	Äquilibrieren 1	100	0	20
2	Probenaufgabe	100	0	20
3	Waschen der Säule	100	0	20
4	Elution	25	75	380
5	Äquilibrieren 2	100	0	20

Nach der zweiten Proteinaufreinigung erfolgte wieder ein Pufferwechsel. Auch diesmal wurde wieder mittels der Amicon Ultra-15 Zentrifugen-Filtereinheit die alte Lösung abzentrifugiert. Dieses Mal wurde statt dem Tris-HCl-Puffer (Tabelle 7) der  $\alpha$ -Amylasepuffer (Tabelle 14) eingesetzt, welcher in den weiteren Versuchen verwendet wurde. Im Anschluss wurde wieder ein Bradford-Assay durchgeführt. Der

einzigste Unterschied bestand darin, dass anstelle des Tris-HCl-Puffer auch für die BSA-Verdünnungsreihe der  $\alpha$ -Amylasepuffer verwendet wurde. Die Inhaltsstoffe des  $\alpha$ -Amylasepuffers sind in Tabelle 14 dargestellt. Jede dieser Durchgänge bekam eine Chargennummer. Durch diese Chargennummer konnten im späteren Verlauf Batches erstellt werden. Diese Batches sahen so aus, dass immer Chargen ausgewählt wurden, dessen Proteinkonzentrationen nach dem Zusammengeben identisch waren.

### 3.2.1.7 Reinigung der IMAC-Säule

Nachdem die Proteinaufreinigung durchgeführt wurde, musste die Säule in einen sauberen Zustand gebracht werden. Dies wurde zu Beginn der Arbeit mit den Schritten in der folgenden Tabelle umgesetzt.

**Tabelle 11 Alte Reinigungsvorschrift der Äkta**

Reinigungsschritt	Reinigungsmittel	Reinigungslänge
Pump Wash 1	Wasser	Systembedingt
Säule 1	Wasser	10 Säulenvolumen
Säule 2	Ethanol	10 Säulenvolumen
Pump Wash 2	Ethanol	Systembedingt

Im Verlauf der Erstellung dieser Arbeit erwies es sich als Problem, dass die gewonnenen Proteinmengen nachgelassen haben. Zudem trat das Problem auf, dass der Druck innerhalb der Säule auch beim Reinigen immer weiter angestiegen ist. Hierdurch ergab sich der Rückschluss, dass eventuell Proteinbestandteile in der Säule zurückbleiben. Um dieser Erscheinung entgegenzuwirken, wurde eine neue Reinigungsvorschrift entwickelt. Die optimierte Reinigungsvorschrift wurde in der nachfolgenden Tabelle dargestellt. Für die Nickel-(II)-Sulfat-Lösung wurden hierbei 20.06 g Nickel-(II)-Sulfat-6-Hydrat in einem Liter vollentsalztem Wasser gelöst.

**Tabelle 12 Neue Reinigungsvorschrift der Äkta**

Reinigungsschritt	Reinigungsmittel	Reinigungslänge
Pump Wash 1	Wasser	Systembedingt
Säule 1	Wasser	10 Säulenvolumen
Säule 2	1 molare NaOH-Lösung	10 Säulenvolumen
Säule 3	Wasser	10 Säulenvolumen
Säule 4	4 molare Harnstofflösung	10 Säulenvolumen
Säule 5	Wasser	10 Säulenvolumen
Säule 6	Nickel-(II)-Sulfat-Lösung	10 Säulenvolumen
Säule 7	Wasser	10 Säulenvolumen
Säule 8	Ethanol	10 Säulenvolumen
Pump Wash 2	Ethanol	Systembedingt

Die Äkta Pure wurde während der Aufreinigung mit einer 1-ml-HisTrap<sup>TM</sup>-excel-Säule sowie dessen 5 ml äquivalent betrieben. Diese Säule beinhaltet Nickelionen in der Matrix, welche mit der Nickel-(II)-Sulfat-Lösung wieder erneuert werden, nachdem diese durch die Beanspruchung der Aufreinigung und des Reinigungsablaufs herausgewaschen sein könnten.

### 3.2.2 Untersuchung der $\alpha$ -Amylase Aktivität des Standardmalzes

Da aus vorherigen Ausarbeitungen ersichtlich war, dass die  $\alpha$ -Amylase des Malzes durch WASI gehemmt wird, sollte in diesem Abschnitt der genaue pH-Wert Bereich untersucht werden, in dem eine Inhibierung eintritt. Hierzu wurde zu Beginn untersucht, in welchem Bereich das ausgewählte Malz überhaupt seine  $\alpha$ -Amylase Aktivität aufweist. Diese Untersuchung erfolgte mit einem Enzymkit von Megazyme nach der Ceralpha-Methode.

Diese Methode beruht im Wesentlichen darauf, dass die  $\alpha$ -Amylase das Substrat Blocked p-Nitrophenyl Maltoheptasoside spaltet und anschließend durch die im Reagenz vorhandene  $\alpha$ -Glucosidase und Glucoamylase die p-Nitrophenyl Maltosaccharide zu Glucose und p-Nitrophenol abbaut. P-Nitrophenol kann dann bei einer Wellenlänge von 400 nm im Fotometer vermessen werden. Im Anhang (Abbildung 1) wurde eine entsprechende Abbildung der Reaktionen hinterlegt.

Das Prüflabor des Lehrstuhls für Brau- und Getränketechnologie der TU München hat die entsprechenden Reagenzien bereitgestellt. Dies war zum einen der Extraktionspuffer, welcher zum Extrahieren der  $\alpha$ -Amylase aus dem Malz benötigt wurde. Dieser bestand aus den in der Tabelle 13 dargestellten Inhaltsstoffen. Die

Herstellung des Extraktionspuffers erfolgte laut dem Prüflabor, indem zu Beginn das Natriumchlorid und das Calciumchlorid in 4 Litern vollentsalztem Wasser gelöst wurden. Im Anschluss wurde das Natriumazid hinzugegeben und die Lösung wurde auf 5 Liter ergänzt. Diese Lösung wurde bei Raumtemperatur gelagert.

**Tabelle 13 Reagenzien für den Extraktionspuffer**

Reagenzien	Menge in g/L
Natriumchlorid (NaCl)	10,00
Calciumchlorid-Dihydrat ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ )	0,20
Natriumazid ( $\text{NaN}_3$ )	0,20

Von dem Malz wurden 5 g in einem Becherglas abgewogen und mit 100 ml Extraktionspuffer für 15 min bei 200 U/min extrahiert. Anschließend wurde das Extrakt durch einen Faltenfilter gegeben, um die größeren Malzbestandteile abzufangen. Das Extrakt wurde zudem 1:2 verdünnt, um in den optimalen Bereich der fotometrischen Bestimmung zu gelangen.

Diese Verdünnung erfolgte mit der Gebrauchslösung des Verdünnungspuffers, welcher wieder vom Prüflabor bereitgestellt wurde. Dieser Bestand aus dem in Tabelle 14 dargestellten Reagenzien. Der pH-Wert wurde mit Salzsäure (HCl) und Natriumhydroxid (NaOH) auf den pH-Wert 5.2 eingestellt. Von dieser Stammlösung wurden 50 ml in 800 ml vollentsalztem Wasser gelöst, um die Gebrauchslösung zu erhalten. Bei Bedarf wurde der pH-Wert nochmal auf 5.2 angepasst.

**Tabelle 14 Reagenzien für die Stammlösung des Verdünnungspuffers**

Reagenzien	Menge für 1 L
DL-Äpfelsäure	134.10 g
Natriumhydroxid (NaOH)	70.00 g
Natriumchlorid (NaCl)	58.40 g
Calciumchlorid-Dihydrat ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ )	5.90 g
Natriumazid ( $\text{NaN}_3$ )	1.00 g

Da die pH-Wertabhängigkeit untersucht werden sollte, wurde in 50 ml Falcon Tubes Verdünnungspuffer gefüllt. Jeder Verdünnungspuffer wurde auf einen pH-Wert mittels Milchsäure und Natriumhydroxid (NaOH) auf zwei Nachkommastellen genau eingestellt. Der pH-Wert wurde deswegen mit Milchsäure eingestellt, da diese Proben im weiteren Verlauf auch noch für Backversuche im Rheometer verwendet werden sollten und die Milchsäure eine für den Stoffwechsel, von im Brot vorkommenden Mikroorganismen, typische Säure ist. Zwischen den pH-Werten 3.40 bis 4.00 wurden alle 0.2 pH-Wert-Intervalle ein pH-Wert eingestellt. In dem Bereich zwischen den

pH-Werten 4.00 und 5.20 wurden alle 0.1 pH-Wert Abstände ein pH-Wert Messpunkt gesetzt. Ein engerer Abstand wurde in diesem Bereich gewählt, um genauere Untersuchungen anzustellen. Dies wurde auf der Grundlage der Ergebnisse aus Kapitel 4.2.1 entschieden, um die Erkenntnisse zu überprüfen. Zwischen den pH-Werten 5.20 und 8.00 wurde wieder auf der frühere pH-Wert Abstand von 0.2 zurückgekehrt. Da im stark alkalischen Bereich die pH-Werte schwerer einzustellen waren, wurde hier ein Abstand von 0.5 gewählt. Dies wurde im Bereich zwischen 8.00 bis 11.00 durchgeführt. Ein stärkerer alkalischer Verdünnungspuffer wurde nicht verwendet, da das Stoppreagenz selbst einen pH-Wert von 11.00 hat.

In ein Mikroreaktionsgefäß wurden 6.7 µl der  $\alpha$ -Amylase-Extrat-Verdünnung und 193.3 µl des  $\alpha$ -Amylasepuffers zu einer Extrakt-Puffer-Lösung mit den verschiedenen pH-Werten vermengt. Dies wurde so umgesetzt, da in den weiteren Versuchen der  $\alpha$ -Amylasepuffer durch den  $\alpha$ -Amylasepuffer ersetzt wurde, welcher den Inhibitor WASI beinhaltet und WASI nur in geringen Maßstäben produziert werden konnte. In eine Mikrotiterplatte wurden 50 µl von der Extrakt-Puffer-Lösung pro Well vorgelegt. Da Mikrotiterplatten mit einer 96-Well-Matrix verwendet wurden, sind immer 4 Wells für eine pH-Wert-Gruppe verwendet worden.

Die eingefrorenen Substratplatten mit 20 µl Substrat pro Wells, welche wiederum das Prüflabor bereitgestellt hat, wurden für 18 Minuten aufgetaut. Im Anschluss konnten 20 µl aus der Mikrotiterplatte mit den verschiedenen pH-Wert-Gruppen in die Substratplatte gegeben werden. Die Substratplatte mit den dazugegebenen pH-Wert Gruppen wurde auf dem Vortexer kurz in leichte Bewegung gebracht, um eine Vermischung der Substanzen zu gewährleisten, allerdings wurde darauf geachtet, dass keine Flüssigkeit die Substratplatte verlässt. Im Anschluss wurde die Mikrotiterplatte für 20 min. bei Raumtemperatur inkubiert.

Die Herstellung der Substratplatte wurde wiederum durch das Prüflabor durchgeführt. Für Substratplatten wurden 10 ml auf 20 °C temperiertes doppelt destilliertes Wasser in eine Ceralpha-Flasche gegeben, die das Substrat beinhaltet. Im Anschluss wurde mit einem Handstepper pro Well 20 µl des gelösten Substrates hineingegeben. Die Platte wurde vor dem weiteren Gebrauch bei - 40 °C eingefroren.

Nachdem die 20 min. der Inkubationszeit vorüber waren, wurden 300 µl des Stoppreagenzen in jede Wells der Substratplatte gegeben und diese Platte bei einer Wellenlänge von 400 nm vermessen. Die Enzymaktivität dieser Messung muss im Anschluss mit der folgenden Formel bestimmt werden:

**Formel 2: Berechnung der  $\alpha$ -Amylase Aktivität in ASBC/g**

$$\text{Aktivität in ASBC pro Gramm} = \frac{\Delta E_{400 \text{ nm}}}{\text{Inkubationszeit}} \cdot \frac{\text{Probenvolumen}}{\text{Extraktvolumen}} \cdot \frac{1}{E \text{ mM}} \cdot \frac{\text{Extraktvolumen}}{\text{Einwaage}}$$

\*E mM steht für Molarer Extinktionskoeffizient

### **3.2.3 Untersuchung der inhibierenden Wirkung von WASI auf die $\alpha$ -Amylase Aktivität des Standardmalzes**

Als untersucht werden sollte, ob WASI bei bestimmten pH-Werten die  $\alpha$ -Amylasen inhibiert, wurde auf die Problematik gestoßen, dass durch das Einstellen des pH-Wertes der Lösungen diese dadurch verdünnt werden und dadurch nicht mehr in jeder Lösung dieselbe Proteinkonzentration vorhanden wäre. Um diese Problematik zu lösen, musste ein etwas komplizierterer Weg gewählt werden, um sowohl die gewollten pH-Werte zu erreichen als auch überall dieselbe Proteinkonzentration zu haben.

In Kapitel 4.1 wurde dargestellt, welche Batches, also Zusammenschlüsse, von Produktionschargen, erstellt wurden. Dies funktionierte so, dass alle Chargen, welche einer Batch angehörten in ein 50 ml Falcon Tube gegeben wurden. Aus diesem Falcon Tube wurden dann 25 Mikroreaktionsgefäße mit demselben Volumen befüllt. Jedes dieser Mikroreaktionsgefäße wurde einem pH-Wert zugewiesen. Im Anschluss wurde der Inhalt dieses Mikroreaktionsgefäßes in ein Becherglas gegeben und der entsprechende pH-Wert eingestellt. Da festgestellt werden konnte, dass nach einigen Tagen der pH-Wert sich wieder dem ursprünglichen pH-Wert angenähert, wurde an drei Tagen mit jeweils zwei Tagen Abstand den pH-Wert erneut eingestellt.

Nachdem der pH-Wert entsprechend eingestellt war, wurde von jeder pH-Wert-Gruppe ein Bradford-Assay angefertigt. Dies wurde wie im Kapitel 3.2.1.4 durchgeführt, mit dem Unterschied, dass lediglich die Verdünnungen der Probe mit 1:10, 1:20 und 1:30 angefertigt wurden. Dies erfolgte auf der Grundlage der ursprünglichen Bradford Assays, da bereits die ungefähre Konzentration abgeschätzt werden konnte und zudem an dem Zielprotein gespart werden sollte.

Auf Grundlage dieser Bradford Assays wurde die pH-Wert-Reihe, mit dem Verdünnungspuffer des  $\alpha$ -Amylase Assays, auf die niedrigste Konzentration, welche mit dem Bradford Assay festgestellt wurde, verdünnt. Dafür wurden die Verdünnungen mit den aus Kapitel 3.2.2 hergestellten Verdünnungspuffern durchgeführt, welche die entsprechenden pH-Werte der jeweiligen Gruppe bereits hatten. Hierdurch konnte

erreicht werden, dass sowohl die Proteinkonzentration als auch der pH-Wert den gewünschten Werten entsprach. Da durch das Verdünnen mit dem  $\alpha$ -Amylase-Verdünnungspuffer aber trotzdem eine gewisse pH-Wertveränderung vorliegt, wurde vor jedem  $\alpha$ -Amylase-Assay der pH-Wert individuell nochmal bestimmt.

Da bei dem Assay zur Bestimmung der  $\alpha$ -Amylase-Aktivität eine nicht unerhebliche Menge des Zielproteins WASI verwendet werden musste, wurde bei dem Assay mit Inhibitor einige Punkte abgeändert. Die Extraktion der  $\alpha$ -Amylase mit dem Extraktionspuffer bis zur entsprechenden 1:2 Verdünnung blieb gleich. Bei der Befüllung der Mikroreaktionsgefäße wurden erste Änderungen vorgenommen. Während im Kapitel 3.2.2 insgesamt 200  $\mu$ l des Reaktionsgemisches von  $\alpha$ -Amylase-Extrakt und Verdünnungspuffer hergestellt wurden, wurde in diesem Abschnitt nur noch 100  $\mu$ l hergestellt. Dies sah in der Praxis so aus, dass 3.36  $\mu$ l des verdünnten Malzextrates verwendet wurden und 96.4  $\mu$ l des  $\alpha$ -Amylasepuffers. Für jeden pH-Wert wurden immer 2 verschiedene Lösungen angesetzt. Zum einen wurde der Verdünnungspuffer ohne den Inhibitor verwendet und zum anderen der Verdünnungspuffer mit dem Inhibitor. Dies führte im weiteren Verlauf dazu, dass bei der Berechnung der Inhibierung immer der Referenzwert auf derselben Platte verwendet werden konnte.

Nachdem der entsprechende Verdünnungspuffer mit der  $\alpha$ -Amylase aus dem Malzextrakt versetzt war, wurde zudem eine 15 min. lange Inkubationszeit eingehalten. Nach der Inkubationszeit wurden 24.6  $\mu$ l aus dem Mikroreaktionsgefäß in die Wells einer Mikrotiterplatte gegeben. Auch hier wurde wieder eine Vierfachbestimmung durchgeführt. Diese Mikrotiterplatte wurde so auf eine andere Mikrotiterplatte gestellt, dass diese nicht mehr waagrecht steht. Dadurch hat sich die Flüssigkeit in der eine Kante gesammelt. Nachdem die Substratplatte 18 min. lang aufgetaut war, wurden 20  $\mu$ l der Enzym-Inhibitor/Enzym-Verdünnungs-Lösung in die Substratplatte pipettiert. Der weitere Prozess verlief im Kapitel 3.2.2 bereits beschrieben ab.

#### **3.2.4 Rheologische Untersuchung der inhibierenden Wirkung vom WASI im Backprozess von Teigen**

Bei den rheologischen Untersuchungen wurden Teige sowohl mit Malz als auch ohne Malz vermessen. Die Teige ohne Malz wurden als Standard bezeichnet. Zudem wurden Teige mit Malz und Inhibitor vermessen. Der entsprechende Arbeitsprozess wurde im Folgenden beschrieben.

Unterteil werden können die rheologischen Untersuchungen zum einen in den Teil, in dem der linear-viskoelastische Bereich bestimmt wurde und zum anderen in den Teil, in dem die Messungen des Speichermoduls [Pa] während des Backprozesses durchgeführt wurden.

Die Teige bestanden aus Mehl und dem  $\alpha$ -Amylase-Puffer des  $\alpha$ -Amylase Assays. Der Verdünnungspuffer wurde dabei auf einen pH-Wert von 5.60 mit Natriumhydroxid (NaOH) und Milchsäure eingestellt. Bei den Teigen, in denen Malz zum Einsatz gekommen ist, wurde zudem der  $\alpha$ -Amylase-Puffer mit dem Malz für 15 min unter mehrmaligem Aufrühren bei Raumtemperatur inkubiert. Die inhaltliche Zusammensetzung wurde in der folgenden Tabelle dargestellt.

**Tabelle 15 Zusammensetzung des Teigsysteme**

Zutaten	Standard-Teig	Malz-Teig	WASI-Teig
Mehl	100 g	97 g	97 g
$\alpha$ -Amylase-Puffer	60 g	60 g	-
$\alpha$ -Amylase-Puffer mit WASI	-	-	60 g
Malz	-	3 g	3 g

Der Knetvorgang lief folgendermaßen ab. Zuerst wurde das Mehl für eine Minute gemischt, um eine homogene Verteilung zu erreichen. Im Anschluss wurde die Flüssigkeit in Form von  $\alpha$ -Amylase-Puffer oder in Form des inkubierten  $\alpha$ -Amylase-Puffers mit dem Malz hinzugegeben und für sechs Minuten geknetet. Nach dem Knetvorgang wurde der Teig in 3 g (bei Teigen mit WASI nur 2.8 g) schwere Stücke portioniert und nach einem kurzen Rollen in der Hand auf den Deckel eines Bechers platziert. Der Becher wurde im Anschluss auf den Deckel geschraubt. Es wurde darauf geachtet, dass diese Vorgänge die zehn Minuten nicht übersteigen. Im Anschluss wurden die Becher mit den Teigen bei -20 °C eingefroren.

Zu Beginn der Versuchsreihe wurde versucht, den natürlichen Temperaturverlauf beim Backprozess nachzuempfinden. Hierfür wurden bereits von Loder Messungen durchgeführt, bei denen immer nach einer Minute im Backprozess die Temperatur gemessen und notiert wurde [21]. Dieses Temperaturprofil sollte nun adaptiert werden. Der Temperaturverlauf von Loder wurde im Anhang in Tabelle 20 dargestellt.

Dieser Temperaturverlauf wurde nun im Rheometer nachgebildet, indem die Temperaturen immer von dem vorherigen auf die nächste Temperatur angehoben wurde.



Nach der Überprüfung des Temperaturverlaufs wurde der linear-viskoelastische Bereich bestimmt. Dies geschah bei vier Proben des Teiges mit Malz und bei vier Proben des Standardteiges. Auf Grundlage der inhibierenden Wirkung von WASI wird der Teig mit WASI und Malz definitiv zwischen den Kurven des Standardteiges und des Teiges mit Malz liegen. Da die Grenzen des linear-viskoelastischen Bereichs von den anderen beiden Systemen bestimmt wurde, würde ein Teig mit WASI keine zusätzlichen Erkenntnisse liefern. Da WASI zudem in der Produktion sehr aufwändig ist, wurde deswegen auf die zusätzliche Feststellung des linear-viskoelastischen Bereichs des WASI-Teiges verzichtet. Zur Feststellung des linear-viskoelastischen Bereichs wurden die Teige für 50 Minuten in der Gare bei 30 °C vorbehandelt. Die Gare wurde hierbei im Trockenschrank umgesetzt. Um das Austrocknen der Oberfläche zu vermeiden, wurde ein Papiertuch mit 5 ml Wasser getränkt und dieses Papiertuch schräg und gefaltet in den Becher geklemmt. Zur besseren Vorstellung wurde im Anhang ein Foto hinterlegt (Abbildung 10). Das Papier wurde deswegen so gefaltet, um auszuschließen, dass der tiefste Punkt direkt über dem Teig liegt und es damit zu möglichen Tropfen auf dem Teig kommt. Wenn es also zu Anstauungen von Wasser gekommen wäre, so würde dieses Wasser zur Seite abfließen. Die Entscheidung für diese Methode wurde auf der Grundlage getroffen, dass in der Gärkammer selbst bei 80 % Luftfeuchtigkeit eine Krustenbildung stattfand, welche das System inhomogen gestalten würde. Um zudem noch den Temperaturverlauf der Gare zu verifizieren, wurde stichprobenartig die Temperatur bestimmt.

Nach der Gare wurde der Teig in die Geometrien des Rheometers eingespannt. Das Einspannen zwischen die Geometrien erfolgt, indem das Teigbällchen auf die untere Geometrie gelegt und die obere Geometrie auf 2.525 mm heruntergefahren wurde. Anschließend wurde der überstehende Teig mittels Skalpell entfernt und die Kante des Teiges mit Paraffin-Öl eingestrichen. Dies sollte ein Austrocknen der Probe verhindern. Durch das Starten des Amplituden-Sweeps wurde die Geometrien auf 2.500 mm angenähert. Da das Malzmehl auf 250 µm vermahlen wurde und es damit den größten Bestandteil des Systems darstellt, liegt damit das 10-Fache des größten Bestandteils als Spaltmaß vor.

Beim Amplituden-Sweep wurden die Scherdehnung sowie das Speichermodul gemessen und gegeneinander aufgetragen. Von dem Anton Paar Rheometer wurde nun die Grenzen des linear-viskoelastischen Bereichs bestimmt. Da eine vierfache Bestimmung durchgeführt wurde, ist der durchschnittlichen Grenzwert des linear-

viskoelastischen Bereichs berechnet und davon 25 % davon abgezogen worden. Diese 25 % dienen als Sicherheitspuffer, damit auf keinen Fall außerhalb des linear-viskoelastischen Bereiches arbeitet wurde. Zusätzlich wurde sichergestellt, dass die vier einzeln berechneten Grenzwerte oberhalb des berechneten Grenzwertes lagen. Die daraus gewonnenen Erkenntnisse wurden nun für die Temperatur-Profilmessungen verwendet. Es wurde mit einer Scherdehnung von 0.008019 % gearbeitet. Zudem wurde mit 1 Hz gemessen. Diese Messungen wurden alle 30 sec. durchgeführt. Neben diesen fixen Einstellungen gab es noch die Variable der Temperatur. Dieses Temperatur-Profil wurde aus der Tabelle 20 von Loder übernommen [21]. Nachdem der Teig zwischen den Geometrien eingespannt wurde, begann zudem eine weitere Teigentspannungszeit von 10 min. Im Anschluss startete das Messprogramm.

### **3.2.5 Untersuchung der Maltosebildung im Backprozess unter der inhibierenden Wirkung von WASI**

Auch für die Bestimmung der Maltosebildung wurden die Einstellungen des Rheometers, wie im vorherigen Kapitel dargestellt, verwendet. Um die Maltose zu verschiedenen Zeitpunkten zu quantifizieren, wurde das Backen an bestimmten Zeitpunkten und damit auch bei bestimmten Temperaturen abgebrochen, um daraus eine Probe zu entnehmen. Proben wurden direkt nach dem Garende sowie nach 4 min. entnommen. Danach erfolgten weitere Probennahmen jede Minute bis zur 12. min. und im Anschluss noch bei den Minuten 14, 16 und 21. Eine Tabelle mit den Probenentnahmen im Zusammenhang mit der zu diesem Zeitpunkt herrschenden Temperaturen wurde im Anhang hinterlegt (Tabelle 21).

Bei den Teigen mit WASI wurde eine geringere Anzahl an Messpunkten gewählt. Die verringerte Anzahl an Proben sind darauf zurückzuführen, dass die Menge an WASI, welcher zur Verfügung gestanden hatte, sehr begrenzt war. Es wurde deswegen für den Teig mit WASI ein geringerer Bereich gewählt. Die Entscheidung für diesen Bereich wurde auf der Grundlage der Maltosebestimmungen von Backversuchen getroffen, welche von Loder beschrieben wurden [21]. Der Standard- und Malz-Teige wurden auch nur deswegen weitergeführt, um zu zeigen, dass die Maltosebildung nicht weiter zunimmt.

Nach den entsprechenden Zeitpunkten wurde die Heizkammer des Rheometers geöffnet und von der Hälfte der Teigprobe die Feuchtigkeit bestimmt. Von der anderen Hälfte wurde die Masse bestimmt und diese in ein 50 ml Falcon Tube mit 5 ml 50 %

Methanol gegeben. Mittels Ultra Turax wurde im Anschluss die Probe zerkleinert. Nach einer Inkubationszeit von mindestens 40 min. wurden die Proben bei 3000 rpm für 10 min. zentrifugiert. Der dadurch entstandene Überstand wurde im Anschluss in Mikroreaktionsgefäße abgefüllt und bei -20 °C eingefroren.

Der Maltosegehalt der einzelnen Proben wurde mit der HPLC (Dionex U3000) bestimmt. Um den Maltosegehalt zu quantifizieren, wurde eine Kalibriergerade angefertigt. Diese bestand aus dem internen Standard, der Stammlösung und dem Eluenten. Im Folgenden wird zunächst auf die Herstellungen der einzelnen Reagenzien eingegangen.

Für die Herstellung des internen Standards wurden 150 mg 2-Deoxy-D-Glucose in 1.5 ml doppelt destilliertem Wasser in einem Mikroreaktionsgefäß gelöst. Diese Lösung wurde anschließend noch 1:10 mit Eluent A verdünnt. Der Eluent A wurde hergestellt, indem 800 ml Acetonitril und 200 ml doppelt destilliertes Wasser vermischt wurde und diese Mischung für 10 min. im Ultraschallbad behandelt wurde. Das dritte Reagenz, welches hergestellt wurde, war die Kalibrierstammlösung. Hierfür wurde jeweils von Glucose, Fructose, Saccharose und Maltotriose 150 mg und von Maltose 225 mg in ein Mikroreaktionsgefäß abgewogen. Die genauen Einwaagen wurde notiert. Jeder dieser Zucker wurde in 1.5 ml doppelt destilliertem Wasser gelöst. Von diesen Lösungen wurde je 1 ml in ein 10 ml Messkolben gegeben. Dieser Messkolben wurde im Anschluss auf 10 ml mit dem Eluent A aufgefüllt.

Die genaue Zusammensetzung der Standardkalibrierlösung wurde in der folgenden Tabelle dargestellt:

**Tabelle 16 Kalibrierstandard für die HPLC zur Bestimmung der Maltose**

Kalibrierung	1	2	3	4	5	6	7
Interner Standard [µl]	50	50	50	50	50	50	50
Stammlösung [µl]	10	50	100	200	300	400	500
Eluent A [µl]	940	900	850	750	650	550	450

Im Anschluss an die Kalibrierung erfolgte die Bereitstellung der Proben. Hierfür wurde 950 µl der Probe mit 50 µl in ein Mikroreaktionsgefäß gegeben. Diese wurden im Anschluss mit dem Vortexer vermengt. Alle Proben wurden nun durch einen Spitzenvorsatzfilter in der Größenordnung 0,45 µm gefiltert und in Glas-Vials gegeben. Die Glas-Vials wurden mit nicht geschlitzten Septen verschlossen, um den Austritt des Methanols zu vermeiden. Die Proben wurden im Anschluss in den Autosampler der HPLC positioniert. Mittels dem Steuerprogramm Chromeleon wurde der Ablauf der

Chromatografie definiert. Hierbei wurde immer nach 10 Maltosebestimmungen 1 Blank eingefügt. Dieser Blank bestand nur aus dem Eluent A.

Bei der HPLC wurde mit einer Durchflussrate von 1 ml/min an Eluent A gearbeitet. Ein Probendurchlauf dauert 28 min. Die verwendete Säule ist hierbei die Phenomenex Luna Omega 3  $\mu\text{m}$  Sugar 100 Å. Es wurde das Versuchsprotokoll „20230228\_Zucker\_1,0mLmin\_28min“ des Lehrstuhls für Brau- und Getränketechnologie verwendet. Die Zuordnung der Peak erfolgte über die Retentionszeiten.

Die Auswertung der Retentionszeiten und das Integrieren der Peaks erfolgten mit dem Programm Chromeleon. In Chromeleon wurden die Kurve, die durch die jeweiligen Zucker entstanden, integriert. Da ein interner Standard verwendetet wurde, dessen Konzentration genau bekannt war, wurde in der Berechnung immer Bezug auf diesen Wert genommen. Demnach wurde nicht nur der entsprechende Peak der Maltose integriert, sondern auch der des internen Standards. Über die Kalibriergerade konnte nun der Gehalt an einzelnen Zuckern aus dem Programm in Chromeleon bestimmt werden.

### **3.2.6 Untersuchung der inhibierenden Wirkung von WASI auf die $\alpha$ -Amylasen des menschlichen Speichels**

Zu Beginn der Versuche mit Speichel wurden zwei Untersuchungen angestellt. Zum einen sollte bestimmt werden, ob die  $\alpha$ -Amylase Aktivität des Speichels über einen längeren Zeitraum annähernd konstant bleibt, zum anderen sollte aber auch untersucht werden, wie stark der Speichel verdünnt werden muss, damit diesen sinnvoll im Fotometer vermessen werden kann. Diese Vorversuche zielten am Ende darauf ab, möglichst gute Bedingungen zu schaffen, um zu überprüfen, ob WASI auch gegen die  $\alpha$ -Amylasen des menschlichen Speichels inhibiert.

Hierzu wurde zuerst eine Speichelprobe einer Person genommen. Dies geschah, in dem der Proband aufgefordert wurde, Speichel im Mundraum zu sammeln und diesen in ein Becherglas zu geben. Dieser Vorgang wurde einige Male wiederholt, um eine ausreichende Menge an Speichel zu sammeln. Das entsprechende Becherglas sollte zwischen den Spuckvorgängen von den Probanden immer mit Alufolie abgedeckt werden.

Die  $\alpha$ -Amylase Aktivität wurde wieder mit der Ceralpha-Methode bestimmt. Hierbei wurde allerdings das Malz gegen die entsprechende Speichelverdünnung ausgetauscht. Dafür wurde die Speichelverdünnung mit dem  $\alpha$ -Amylasepuffer

zusammen in ein Mikroreaktionsgefäß pipettiert und im Anschluss mit dem Vortexer vermischt. Um die Probe wieder auf den Boden des Mikroreaktionsgefäßes zu drücken, wurde eine Tischzentrifuge eingesetzt. Es erfolgte eine Inkubationszeit von 15 min., in denen die  $\alpha$ -Amylasen mit WASI interagieren können. Das Pipettierschema dieser Bestimmung wurde im Folgenden dargestellt:

**Tabelle 17 Pipettierschema der Ceralpha-Methode zur Bestimmung der  $\alpha$ -Amylase Aktivität des Speichels**

Reagenz	Referenzwert ohne WASI	Probe mit WASI
Speichelverdünnung in $\mu\text{l}$	3.4	3.4
$\alpha$ -Amylasepuffer ohne WASI in $\mu\text{l}$	96.6	-
$\alpha$ -Amylasepuffer mit WASI in $\mu\text{l}$	-	96.6

Im Anschluss an die Inkubationszeit wurde eine Mikrotiterplatte auf den Deckel einer anderen Mikrotiterplatte gestellt, aber so, dass diese nur mit der einen Seite darauf lag und somit schräg stand. Somit wurde gewährleistet, dass es in den Wells der Mikrotiterplatte einen tiefsten Punkt gab. In diesen tiefsten Punkt wurde nun je 24.6  $\mu\text{l}$  des Reaktionsgemisch pipettiert. Aus einem Mikroreaktionsgefäß wurden immer 4 Wells entsprechend bestückt.

Zur fotometrischen Bestimmung wurden wieder die eingefrorenen Substratplatten des Prüflabors verwendet. Diese wurden für 18 min. aufgetaut. Nach dem Ablauf der Zeit wurden 20  $\mu\text{l}$  aus der schrägen Mikrotiterplatte in die Substratplatte mittels Multikolbenhubpipette gegeben. Der Umweg über die schräge Mikrotiterplatte wurde gewählt, um möglichst wenig Zeit zwischen den Hinzugaben des Enzyms zum Substrat zu haben. Im Anschluss wurde die Platten leicht auf die rotierende Oberfläche eines Vortexers gelegt, um eine optimale Vermischung zu erzielen. Ab dem Zeitpunkt, an dem das Substrat mit dem Amylase-Pufferreagenz in Kontakt gekommen ist, wurden 20 min. Reaktionszeit eingehalten.

Nach dem Ablauf der Reaktionszeit wurden 300  $\mu\text{L}$  des Stoppreagenz des  $\alpha$ -Amylase Assays vom Prüflabor in die Mikrotiterplatte gegeben und die Platte bei einer Wellenlänge von 400 nm fotometrisch vermessen.

Die Berechnung der  $\alpha$ -Amylase Aktivität wurde mit der Formel 2 durchgeführt.

Der erstere Vorversuch bestand darin, die optimale Verdünnung zur fotometrischen Bestimmung zu ermitteln. Hierbei wurden noch keine Assays mit WASI gemacht, sondern nur mit den Referenzwerten. Von einer der gewonnenen Speichelproben wurde eine Verdünnung erstellt, indem 1 ml der Speichelprobe zu 1 ml destilliertem Wasser in ein 15 ml Falcon Tube gegeben wurde und diese mittels Vortexens

vermengt wurden. Dies war die 1:1-Verdünnung. Von dieser Verdünnungsstufe wurde 1 ml in einen 10 ml Messkolben gegeben und dieser bis zu der entsprechenden Markierung mit destilliertem Wasser aufgefüllt. Die nächsthöhere Verdünnung wurde dann mit dem Inhalt der zweiten Verdünnungsstufe erstellt, sodass immer eine 1:10 Verdünnung des vorherigen Kolbens entstand. Nach diesem Schema entstanden Verdünnungen von 1:10, 1:100 und 1:1000. Diese wurden mittels Natriumhydroxids (NaOH) und Milchsäure auf einen pH-Wert von 5.2 eingestellt, da der  $\alpha$ -Amylase Assay diesen pH-Wert vorsieht. Im Anschluss erfolgte der  $\alpha$ -Amylase Assay von dem die entsprechenden Extinktionswerte für die Bestimmung der Verdünnungsstufe verwendet wurden. Durch das Lambert-Beer'schen Gesetzes ist eine Verdünnungsstufe als optimal anzusehen, welche eine Extinktion zwischen 0.2 und 1 aufweist. Die Ergebnisse der ersten Verdünnungsreihe legten eine Verdünnungsstufe von 1:400 nahe, mit der auch ein  $\alpha$ -Amylase Assay durchgeführt wurde, um diese Verdünnungsstufe zu verifizieren. Die aus diesem Versuch ermittelte sinnvolle Verdünnungsstufe wurde im Anschluss bei den weiteren Versuchen immer wieder verwendet.

Der zweite Vorversuch bestand darin zu überprüfen, wie haltbar die  $\alpha$ -Amylasen im Speichel sind. Hierfür wurde eine Speichelprobe in der ermittelten Verdünnungsstufe angefertigt und die  $\alpha$ -Amylase Aktivität wurde bestimmt. Dieser Zeitpunkt wurde als Tag 0 definiert. Nach einem Tag wurde erneut die  $\alpha$ -Amylase Aktivität bestimmt, dies war der Punkt Tag 1. Dies wurde zudem noch an den Tagen 8 und 28 durchgeführt. In der Zwischenzeit wurden die Verdünnungen bei 4 °C im Kühlschrank aufbewahrt. Daraus entstand dann die Ableitung, wie schnell die verdünnten Speichelproben vermessen werden mussten, um keine starken Verluste der  $\alpha$ -Amylase Aktivität zu erhalten.

Für den Hauptteil dieses Versuches wurden von 8 Personen Speichelproben eingesammelt. Es wurden von vier männlichen und vier weiblichen Personen Proben gesammelt. Es wurde zudem notiert, ob die Personen an diesem Tag schon etwas gegessen hatten und wenn dies der Fall war, was diese gegessen hatten. Von den abgegebenen Proben wurde eine 1:400 Verdünnung erstellt. Die Verdünnung konnte aus den Ergebnissen im Kapitel 4.5.1 abgeleitet werden. Im Anschluss wurde der  $\alpha$ -Amylase Assay durchgeführt. Als Pufferlösung mit WASI konnte zum einen die Puffer der Chargen 5 und 6 verwendet werden, welche auf eine Proteinkonzentration

von 352 µg/mL verdünnt wurde und zum anderen ein Teil der Batches 2 und 3, die eine Proteinkonzentration von 503 µg/ml aufgewiesen haben.

### **3.3 Statistische Analyse der Datensätze**

Da verschiedene Verfahren angewendet wurden, war es auch nötig je nach Aufbau des Versuches andere statistische Verfahren zu wählen. Die Methodik im Einzelnen wurde im Folgenden dargestellt. Die Auswertungen wurden immer mit dem Statistikprogramm OriginPro 2021b (Lehre) durchgeführt. Als Signifikanzniveau wurde 0.05 festgelegt.

#### **3.3.1 Statistische Methodik der Herstellung von WASI**

In diesem Abschnitt soll überprüft werden, ob durch die veränderte Reinigungsvorschrift eine Erhöhung der Gesamtproteinmenge stattgefunden hat. Hierzu wurde die Gesamtproteinmenge untersucht. Die beiden Gruppen, mit und ohne die neuen Reinigungsvorschrift, wurden mittels Dixon Q-Test auf Ausreißer untersucht. Zudem wurde untersucht, ob die Gruppen homogen verteilte Varianzen haben und nach Shapiro-Wilk normalverteilt sind. Im Anschluss wurde ein t-Test durchgeführt.

#### **3.3.2 Statistische Methodik zur Auswertung der $\alpha$ -Amylase Assays**

Bei der statistischen Auswertung der pH-Wert abhängigen  $\alpha$ -Amylase Aktivität wurde zu Beginn überprüft, ob die Annahme getroffen werden kann, dass alle Werte einer Gruppe nach Shapiro-Wilk normalverteilt sind. Aus rationaler Betrachtungsweise kann die Vermutung angestellt werden, dass die bestimmten  $\alpha$ -Amylase Aktivitätswerte, die fotometrisch bestimmt wurden, normalverteilt sind, da entsprechende Fehler wie Pipettieren oder das fotometrisch Vermessen dieses Muster verursachen können. Zudem wurden die Werte auf die Homogenität der Varianzen überprüft und Ausreißer mit dem Q-Test nach Dixon aussortiert.

Im weiteren Verlauf unterschieden sich die statistischen Analysen je nach Anwendungsfall. Für die Erstellung der Abbildung der  $\alpha$ -Amylase Aktivität wurde die Boxplot Darstellung gewählt. Dies hatte den Grund, dass durch die Boxplots die Grafik nicht überladen wirkt und zudem alle Informationen enthalten sind.

Eine Abbildung wurde erstellt, bei der sowohl Proben mit Malz als auch Proben mit Malz und WASI dargestellt sind. Um die Grafik nicht zu kompliziert zu gestalten, wurden immer die Mittelwerte dargestellt. Da der Datensatz normalverteilt war, konnte zudem die Abweichungen in Form der Standardabweichung aufgetragen werden.

Es wurde zudem Versuche angestellt, ein Regressionsmodell zu finden, welches die prozentuale Inhibierung zum pH-Wert darstellt.

Der vierte Abschnitt, der sich mit dem  $\alpha$ -Amylase Assay beschäftigte, war die Inhibierung der  $\alpha$ -Amylasen im menschlichen Speichel. In hier wurden die einzelnen Gruppen wieder mit einem t-Test auf Unterschiede untersucht. Die Ergebnisse wurden in zwei Abbildungen dargestellt.

### **3.3.3 Statistische Methodik zur Auswertung der Rheologischen Versuche**

Die Datenmengen, die das Rheometer ausgegeben hat, wurden in einzelnen Dateien ausgegeben. Hierdurch entstanden 84 Datensätze im csv-Format. Diese Daten waren zwar in sich strukturiert, aber konnten nicht direkt weiterverarbeitet werden, da immer nach 6 Zeilen erneut Text mit der Spaltenbeschriftung oder den Einheiten auftaucht. Außerdem gab es einige unnötige Leerzeilen. Um diese Problematik zeiteffizient zu lösen, wurden alle benötigten Informationen aller Dateisätze mit einem Pythonskript in einer Datei zusammengefasst. Das entsprechende Skript wurde im Anhang (8.7) hinterlegt.

Da nun eine gut strukturierte Datei vorlag, welche in Origin eingelesen werden konnte, wurden zu Beginn die Messwerte aller Gruppen auf Normalverteilung nach Shapiro-Wilk und Homogenität der Varianzen überprüft. Das Ergebnis dazu in dem Kapitel 4.3 dargestellt und führte zu der Entscheidung, dass der Mann-Whitney-U-Test das korrekte Testsystem darstellt, um zu überprüfen, ob es einen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen gibt. Bevor dieser durchgeführt wurde, wurden Ausreißer mit dem Ausreißertest nach Grubbs entfernt.

Zudem wurde eine Abbildung zur Veranschaulichung der Datenmengen erstellt. Das Problem hierbei bestand darin, dass die Datenmengen großen Schwankungen unterliegen. Um trotzdem eine Abbildung zu generieren, welche strukturiert erscheint, wurde der Mittelwert und das erste und dritte Quartil bestimmt. Dargestellt wurde im Anschluss, der Mittelwert mit dem ersten und dritten Quartil. Demnach ist dies vergleichbar mit der Box im Boxplot. Dies führte zwar dazu, dass nur die Hälfte der Daten eine Berücksichtigung in der Grafik fanden, allerdings hat dies einen enormen Mehrwert für den Betrachter bei nur geringer Verfälschung des Sachverhaltes.

### **3.3.4 Statistische Methodik zur Auswertung der Maltosebildung**

Mittels des Q-Tests nach Dixon wurden aus den Daten die statistischen Ausreißer entfernt. Dies ist notwendig, da es zu Fehlern beispielsweise beim Pipettieren gekommen sein könnte, die das Ergebnis maßgeblich beeinflussen würden. Da



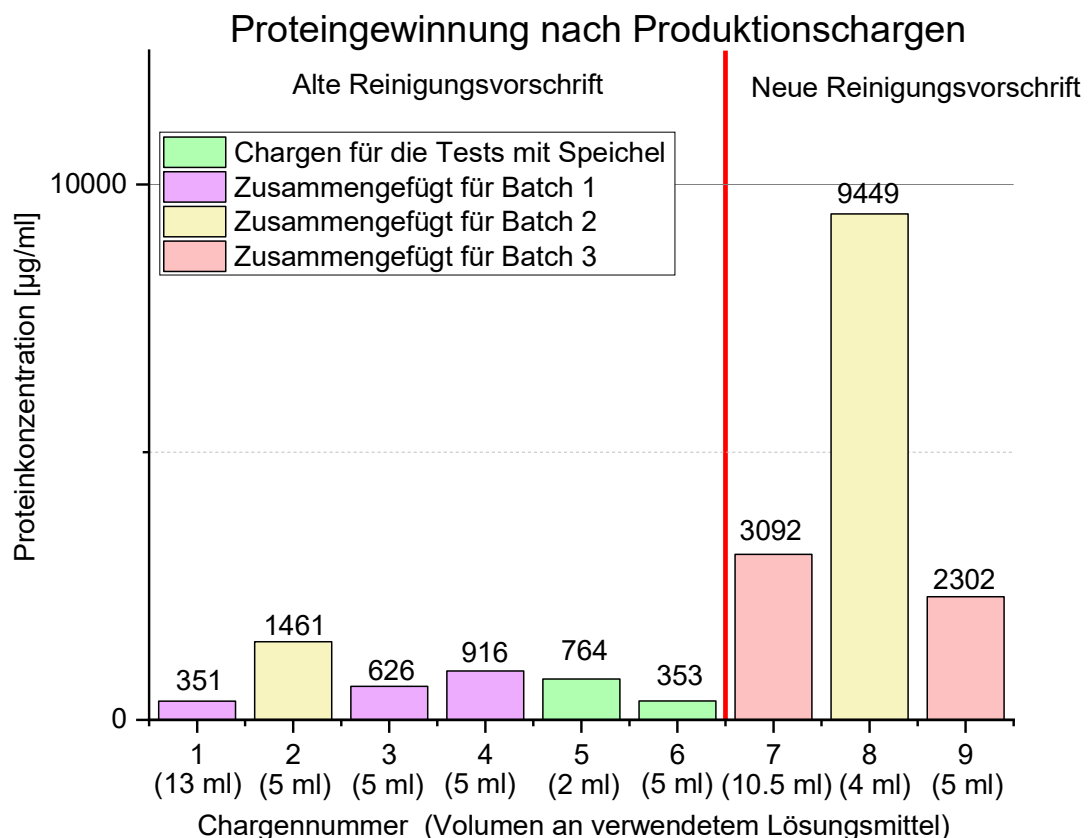
statistische Standardverfahren verwendet werden sollten, wurden die Datensätze auf Normalverteilung und die Homogenität der Varianzen überprüft. Der Test der Normalverteilung wurde mit der Methode nach Shapiro-Wilk durchgeführt. Um mögliche Unterschiede zwischen Gruppen erkennen zu können, wurde sich für einen t-Test mit Welch-Korrektur entschieden. Die Begründung für die Welch-Korrektur wurde in Kapitel 4.4 dargestellt. Mit dem Statistikprogramm Origin wurden zudem die zwei Abbildungen aus den Daten erstellt, welche ebenfalls im Kapitel 4.4 abgebildet wurden.

Zudem sollten einige Überlegungen angestellt werden, inwieweit sich die  $\alpha$ -Amylasen aus dem Speichel und dem Malz überhaupt ähneln. Als objektiver Vergleich bieten sich die Aminosäuresequenzen an. Da dies wiederum ein etwas komplizierterer Prozess ist, wurde ein Pythonskript (Anhang 8.8) entwickelt, welche diesen Vergleich angestellt hat. Dieser Code zielt darauf ab, die Proteinsequenzen zu vergleichen. In realen Proteinen gibt es oft Schleifen, welche für das Endprotein keine funktionellen Eigenschaften mehr hat. Dadurch ist es aber möglich, dass die entscheidenden funktionellen Gruppen in der Aminosäuresequenz nicht denselben Abstand haben. Deswegen muss mitbetrachtet werden, dass "Lücken" in der Proteinsequenz vorkommen können, die bei der jeweiligen Vergleichsaminosäure nicht vorkommen. Um diesen Umstand zu berücksichtigen, bietet die BLOSUM62-Matrix ein Werkzeug zu entscheiden, ob Proteine zusammenpassen und ob "Lücken" eingefügt werden, müssen. Verglichen kann dies mit dem Alignment-Score. Bei der optimalen Paarung wurde zudem überprüft, wie viel Prozent der Aminosäure in Prozent identisch sind. [27] [28]

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Quantifizierung der Proteinherstellung

Die Herstellungsmenge des Zielproteins WASI war für die Arbeit von Bedeutung, da diese darüber entscheidet, in welchem Maßstab Versuche durchführen werden konnten. Während der Arbeiten tauchte das Problem auf, dass die gewonnenen Proteinmengen immer weiter nachgelassen haben. Zudem konnte an einem Punkt die Äkta pure nicht mehr mit der normalen Durchflussrate betrieben werden, da sonst der Druck innerhalb der Säule zu groß geworden wäre. Um dieser Problematik entgegenzuwirken, wurde entschieden den Reinigungsablauf zu optimieren. Nach jedem Durchlauf wurden die gewonnene Proteinmenge mittels des Bradford Assays bestimmt. Zur Klassifizierung hat jeder dieser Durchläufe eine Chargennummer mit fortlaufender Nummer bekommen. Die gewonnenen Proteinmengen wurden in der Abbildung 1 dargestellt.



**Abbildung 1** Proteinkonzentration nach Chargennummer. Da das Flüssigkeitsvolumen, um das Protein zu lösen variiert, wurde im Anhang (Abbildung 9) ein Bild der Gesamtproteinmenge pro Charge hinterlegt. Jede Charge bestand aus 2 l LB-Medium mit der Kultur.

Die neue Reinigungsvorschrift wurde zwischen den Chargen 6 und 7 eingeführt. Es wurde immer nach einer Verwendung der Anlage diese entsprechend gereinigt. Nach

der Reinigung der Charge 8 wurde die Anlage in einem anderen Versuch einer anderen Person verwendet. Da das Aufreinigungsergebnis im Verhältnis zu den Chargen 7 und 8 deutlich geringer ist, wurde dieser Wert in der weiteren statistischen Betrachtung nicht mit einbezogen.

Die Chargennummern 1 bis 6 wurden für die Betrachtung der optimierten Reinigungsvorschrift als eine Gruppe definiert. Als zweite Gruppe wurden die Chargen 7 und 8 definiert. Die Gruppe mit den Chargen 1 bis 6 wurde mit dem Dixon Q-Test auf Ausreißer untersucht. Hierbei wurden keine Ausreißer gefunden. Eine Betrachtung der Chargen 1 – 7 ergab, dass die Charge 7 ein statistischer Ausreißer ist. Auch die Charge 8 würde als Ausreißer betrachtet werden, wenn die Chargen 1 - 6 und die Charge 8 betrachtet würden. Ein Test auf homogene Verteilung der Varianzen, bei denen die Chargen 1 bis 6 die erste Gruppe darstellen und die Chargen 7 bis 8 die zweite Gruppe darstellen, ergab, dass die Varianzen homogen verteilt sind. Demnach sind die Bedingungen für einen t-Test gegeben. Hierbei wurde festgestellt, dass es einen signifikanten Unterschied zwischen der Gruppe mit den Chargen 1 bis 6 und der Gruppe mit den Chargen 7 und 8 gibt. Unter Betrachtung der durchschnittlichen Proteinerträge kann deswegen behauptet werden, dass durch das optimierte Reinigungsverfahren die gewonnene Proteinmenge signifikant um den Faktor 9.21 erhöhen werden konnte.

Auf der Grundlage der Gesamtproteinmenge der Chargen wurden Batches erstellt. Da zudem die Proteinkonzentrationen variierten, wurde die Lösung mit der höheren Proteinkonzentration mit  $\alpha$ -Amylase Puffer runterverdünnt. Aus welchen Chargen die einzelnen Batches bestanden ist auch in der Abbildung 1 zu sehen.

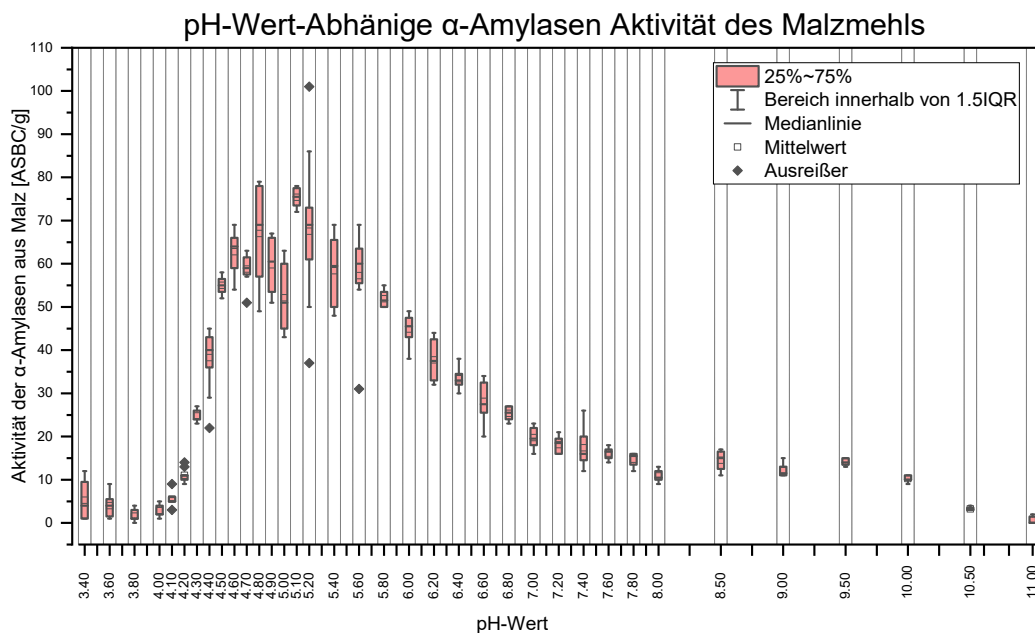
## **4.2 Inhibierende Wirkung von WASI auf die $\alpha$ -Amylase Aktivität des Standardmalzes**

In diesem Versuchsabschnitt ging es darum zu überprüfen in welchem pH-Wert Bereich der Inhibitor WASI seine inhibierende Wirkung entfaltet. In dem Vorversuch sollte deswegen die  $\alpha$ -Amylase Aktivität eines ausgewählten Malzens in Abhängigkeit zum pH-Wert bestimmt werden. Auf der Grundlage dieser Erkenntnisse wurde ein Bereich ausgewählt, in dem die Inhibierung durch WASI untersucht werden sollte.

### **4.2.1 pH-Wert abhängige $\alpha$ -Amylase Aktivität des Standardmalzes**

In dem Vorversuch wurde bei verschiedenen pH-Werten die  $\alpha$ -Amylase Aktivität bestimmt. Hierfür wurde die Ceralpha-Methode verwendet. Der höchste pH-Wert, bei dem die  $\alpha$ -Amylase Aktivität bestimmt wurde, war der pH-Wert 11.00. Dies ist der

maximal sinnvolle Wert an dem gemessen werden konnte, da das Stoppreagenz auch einen pH-Wert von 11 hat. In dem Bereich zwischen pH-Wert 8.00 und 11.00 wurde sich dazu entschieden alle 0.5 pH-Wert Abstände eine Messung durchzuführen. In dem Bereich unter 8.00 wurden alle 0.2 pH-Werte einen Messpunkt setzen. Da in dem Bereich zwischen pH-Wert 4.00 und 5.20 ein Phänomen nicht ganz zu erklären war, wurde sich dazu entschieden in diesem Bereich alle 0.1 pH-Wert Abstände eine Messung durchzuführen. In der Abbildung 2 sind die bestimmten  $\alpha$ -Amylase Aktivitäten dargestellt.



**Abbildung 2 pH-Wert-Abhängige  $\alpha$ -Amylase-Aktivität des Malzmehls (n = 8-32).** Zu sehen ist pro pH-Wert ein Boxplot. Die Box umfasst die 50 % der Werte, die zwischen dem ersten und dritten Quartil der Datenpunkte liegen.

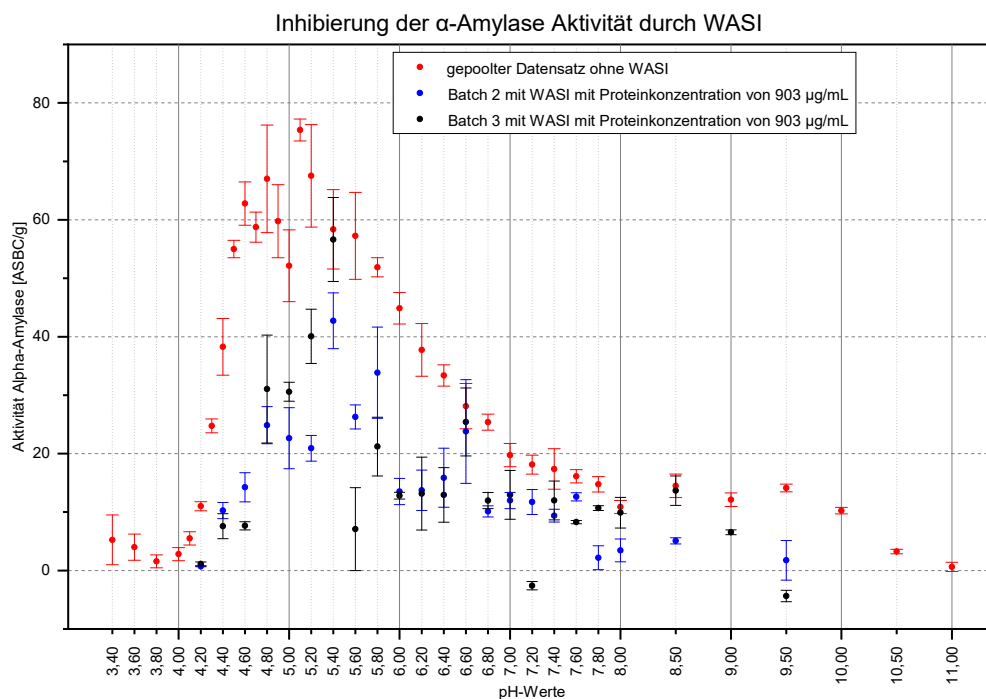
Zu beobachten ist, dass zwischen den pH-Werten 11.00 und 4.00 immer eine  $\alpha$ -Amylase Aktivität vorhanden ist. Zudem konnte festgestellt werden, dass der optimale pH-Wert der  $\alpha$ -Amylase des Malzes bei 5.10 liegt, da hier der höchste Mittelwert vorliegt. Auffällig ist ein Bruch in der kontinuierlichen pH-Wertentwicklung. Dieser Bruch liegt zwischen den pH-Werten 5.00 und 5.10. Da dieses Phänomen zuerst nicht erklärt werden konnte und ein Messfehler in Betracht gezogen wurde, ist in diesem Bereich alle 0.1 pH-Wert Abstände die  $\alpha$ -Amylase Aktivität bestimmt worden. Das beobachtete Phänomen wurde hierbei bestätigt. Es scheint einen schlagartigen Abfall der Enzymaktivität im leicht saureren Bereich des pH-Wert Optimums zu geben. Die genaue Ursache dafür ist nicht bekannt. Eine Vermutung, die diesbezüglich angestellt wurde, ist die, dass es zu einer Konformationsänderung der  $\alpha$ -Amylasen kommt. Die Aktivität von Proteinen ist im Allgemeinen sehr von der dreidimensionalen

Struktur abhängig. Die Theorie dahinter ist, dass wenn sich der pH-Wert ändert, sich Protonen ( $H^+$ -Ionen) von Aminosäuren des Enzyms entfernen. Durch den pH-Wert wird demnach der Ladungszustand der Aminosäure verändert. Dadurch haben bestimmte Gruppen die Möglichkeit, Räume einzunehmen, die zuvor durch Protonen stereometrisch blockiert waren. Wenn nun der energetische Zustand günstig ist, könnte das zu einer Konformationsänderung führen [29]. Allerdings würde dies ein erneutes Ansteigen des pH-Wertes nicht erklären. Diese Beobachtung wurde zwar als im äußersten Maße interessant befunden, allerdings wurde sich dazu entschlossen diese Beobachtung nicht mehr weiterzuverfolgen, da keine Behinderung der geplanten Versuche dadurch absehbar war und der Fokus eher auf die Inhibierung durch WASI gelegt wurde.

#### 4.2.2 pH-Wert abhängige Inhibierung der $\alpha$ -Amylase durch WASI

In dem zweiten Abschnitt dieses Versuches wurde die  $\alpha$ -Amylase Assays mit dem Inhibitor durchgeführt. Hierbei wurde nur noch der Bereich betrachtet, bei dem eine  $\alpha$ -Amylase Aktivität des Malzes festzustellen war. Um sicherzustellen, dass nicht nur ein Batch aus zufälligen Gründen gegen WASI inhibiert, wurde sich dazu entschieden, mit zwei verschiedenen Batches die  $\alpha$ -Amylasen zu inhibieren.

In der folgenden Abbildung wurde die Inhibierung der Batches 2 und 3 dargestellt.



**Abbildung 3 Inhibierung der  $\alpha$ -Amylasen des Malzes durch WASI ( $n_{\text{Blau}} = 4$ ;  $n_{\text{Schwarz}} = 4$ ;  $n_{\text{Rot pH 3.40-3.80; 4.10; 4.30; 4.50; 4.70; 4.90; 5.10; 5.40-11.00}} = 8$ ;  $n_{\text{Rot pH 4.00; 4.20; 4.40; 4.60; 4.80; 5.00}} = 16$ ;  $n_{\text{Rot pH 5.20}} = 32$ ; Proteinkonzentration von 903 µg/ml)**

In der Abbildung wurde drei Datensätze dargestellt. Der erste Datensatz ist der Standarddatensatz in Rot. Dieser Datensatz ist mit dem aus Abbildung 2 identisch, nur die grafische Aufarbeitung unterscheidet sich. Außerdem wurden die Datensätze mit den Batches 2 und 3 in den Farben Schwarz und Blau hinzugefügt.

Zu sehen ist, dass die Mittelwerte der Datensätze in den Farben Blau und Schwarz, welche mit WASI inhibiert wurden, in allen Fällen unter den Mittelwerten der Standardgruppe ohne WASI lagen. Der Vergleich, ob die beiden verwendeten Batches identisch sind, ergab kein klares Ergebnis. In 11 Fällen konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden in weiteren 11 Fällen waren die Batches signifikant unterschiedlich. Auch ein Trend ließ sich optisch nicht erkennen.

Es wurden zudem Versuche unternommen ein Regressionsmodell zu finden welches die Inhibierung in Verhältnis zum pH-Wert beschreibt. Neben dem linearen Regressionsmodell wurden auch Modelle mit Polynomen bis zum 4. Grad angestellt. Zur jeder Regressionsgeraden wurde das Bestimmtheitsmaß ermittelt. Dieses lag immer zwischen 0.167 und 0.227. Damit konnte kein Modell ermittelt werden, mit welchem eine Inhibierung aus dem pH-Wert berechnet werden kann. Demnach wirkt es so, als wenn die Inaktivierung von Malz durch WASI bei verschiedenen pH-Werten annähert, zufällig verteilt ist.

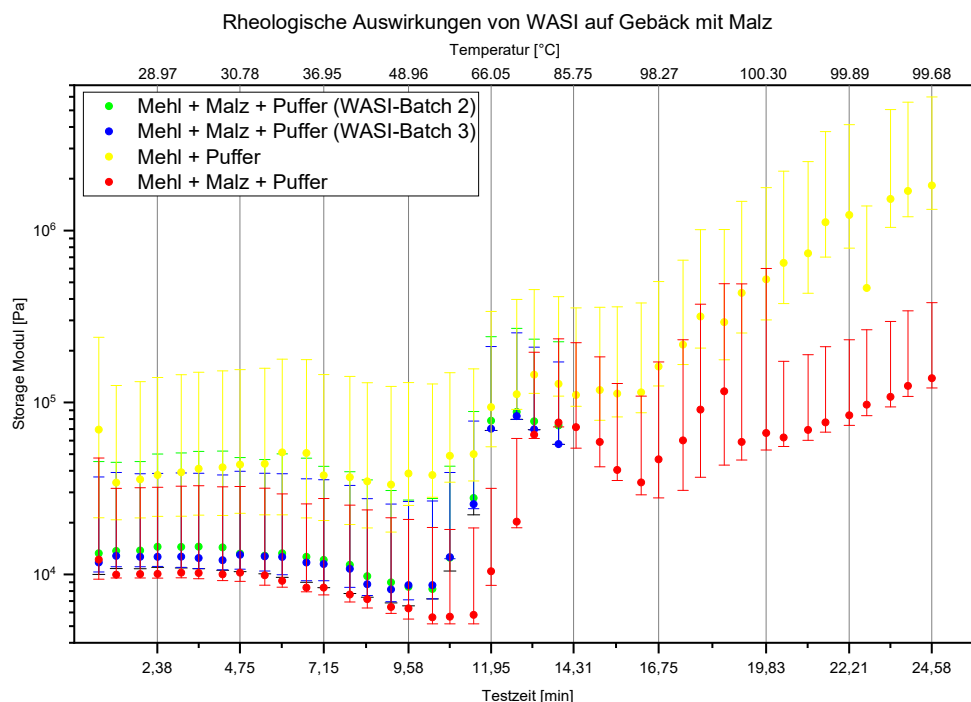
In der Literaturrecherche wurde zudem von Kuzovlev dargestellt, das WASI eine optimale Inhibierungsfähigkeit bei einem pH-Wert zwischen 7.80 und 8.00 hat [12]. Die in diesem Bericht dargestellten Ergebnisse zeigen im pH-Wert-Bereich 7.80 bis 8.00 zwar nur 2 Messpunkte, die keine signifikanten Ausreißer sind, allerdings sind die Mittelwerte der einzelnen Gruppen der Inhibierungsfähigkeit im Bereich 4.20 und 4.60 alle höher als die Mittelwerte im Bereich zwischen 7.80 und 8.00. Auch die Regressionsmodelle zeigen bei steigendem pH-Wert eher auf eine geringere Inhibierung hin. Ein Unterschied zwischen den Ermittlungen zwischen Kuzovlev und dem dargestellten Versuch bestand allerdings darin, dass Kuzovlev den WASI aus der pflanzlichen Quelle gewonnen hat und in dem hier dargestellten Versuch ein rekombinant hergestellter WASI verwendet wurde. Es könnte darauf hindeuten, dass Kuzovlev die pH-Werte im sauren nicht untersucht hat oder ein Unterschied zwischen den beiden WASI-Stämmen der pflanzlichen und rekombinanten Quelle existiert, welche die pH-Wert Abhängigkeit maßgeblich beeinflusst. Schuster beschrieb, dass bei dem verwendeten WASI einige Punktmutationen vorkommen [19]. Es wurde bereits gezeigt, dass durch eine Punktmutation in cAMP-abhängigen Kinasen zur

Veränderung der  $pK_a$ -Werte kommen kann [30]. Durch die Henderson-Hasselbalch-Gleichung lässt sich zudem der Zusammenhang zwischen dem pH-Wert und dem  $pK_a$ -Wert herstellen, wodurch die Aussage getroffen werden kann, dass sich auch der pH-Wert durch eine Punktmutation verändern kann [31]. Sollte es diesen Unterschied beim pH-Wert Optimum geben, so gebe es eine kausale Begründung dafür.

### 4.3 Rheologisches Verhalten von Teigen während des Backprozesses mit WASI

In diesem Abschnitt wurden im Rheometer Teigsysteme gebacken, um die rheologischen Eigenschaften näher zu untersuchen. Nach bestimmten Zeiten wurde der Backverlauf abgebrochen, um Proben für die Maltosebestimmung zu gewinnen. Der Prozess dazu wurde im Kapitel 3.2.5 dargestellt.

Da der Backverlauf immer nach einer bestimmten Zeit abgebrochen wurde, entstand der Effekt, dass die Stichprobenanzahl kontinuierlich abnimmt. Selbst durch den Einsatz statistischer Werkzeuge sind die Fragmente dieser Behandlung in der grafischen Aufarbeitung immer noch zu sehen. Um die Übersicht zu erhöhen, wurde nur von jeder Gruppe der Median mit dem ersten und dritten Quartil der Datenpunkte nach dem Ausreißertest dargestellt. Dies ist demnach äquivalent zur Box im Boxplot. Die zu diesem Versuch erhobenen Daten wurden in der folgenden Abbildung dargestellt.



**Abbildung 4** Rheologische Auswirkungen von WASI auf Weizenbrot. Die Puffer der Teige mit WASI hatten eine Konzentration von 503  $\mu\text{g/ml}$ . Gemessen wurde bei einem pH-Wert von 5.60

Selbst die schon sehr vereinfachte Darstellung der Messpunkte hat ein eher unübersichtliches Bild ergeben. Das Problem, das entsteht, wenn einzelnen Messpunkte plötzlich Fehlen, da diese für die Zuckerbestimmung verwendet wurden, kann gut in dem Bereich um die Minute 19.83 beobachtet werden. Ungefähr 2 Messpunkte (ca. 1 Minute) vorher sieht es so aus, als würde der Median wieder ansteigen. Es kommt dann aber zu einem absacken. Dies liegt daran, dass beide Werte, die nicht mehr weitergeführt wurden, direkt unter dem Median lagen und durch das Wegfallen dieser Punkt findet plötzlich eine starke Korrektur des Medians statt. Dieses Phänomen lässt sich aus dem gewonnenen Datensatz nicht mehr ohne Verfälschung entfernen und ist beispielsweise auch bei den Fehlerbalken sichtbar, wie zwischen dem Messpunkt bei Minute 19.83 und dem darauffolgenden Messpunkt.

Bei der Untersuchung der signifikanten Unterscheidung der Gruppen konnte festgestellt werden, dass es in keinem Punkt einen signifikanten Unterschied zwischen den zwei WASI-Batches gibt. Zudem unterscheiden sich die beiden Gruppen der WASI-Teige in jedem Punkt von den Standardteigen ohne Malz und WASI. Im Bereich der Backzeiten 2.38 Minuten bis 7.15 (Temperaturen 28.97 °C bis 36.95 °C) unterscheiden sich die Teige mit WASI statistisch signifikant von den Teigen mit Malz. In den letzten 11 Punkten gibt es keine klare Tendenz. In 6 Fällen liegt kein statistisch signifikanter Unterschied vor, in den 5 anderen Fällen schon.

Auffallend ist allerdings, dass die durchschnittlichen Messpunkte von den Teigen mit WASI und Malz meistens zwischen den Teigen des Standards und den Teigen mit dem Malz ohne WASI lagen. Es könnte demnach sein, dass WASI inhibiert hat, dies aber lediglich nicht statistisch signifikant nachweisbar ist. Um Signifikanz zu erreichen könnte man Teige mit einem höheren Einsatz an Proteinen backen.

Ein wesentliches Problem bestand darin, dass die Messwerte insgesamt auch schwer zu erklären waren. Unter der subjektiven Perspektive der Person, welche die Teige im Rheometer platziert hat, gab es einen enormen Unterschied in der Haptik der Malz- und der Standard-Teige. Allerdings fühlten sich die Teige einer Gruppe ähnlich an. Es ist schwer nachzuvollziehen, dass Teigsysteme, die sich ähnlich weich anfühlen, dann im Rheometer um den Faktor 10 unterscheiden und gleichzeitig ähnliche Speichermodule aufweisen wie die anderen Teige.

Der Kurvenverlauf der in dem hier dargestellten Proben scheint korrekt zu sein. Bloksma beschrieb, eine Abnahme des Speichermodul zwischen den Temperaturen 25 °C bis 40 °C. Zwischen den Temperaturen 45 °C und 60 °C wurde eine starke

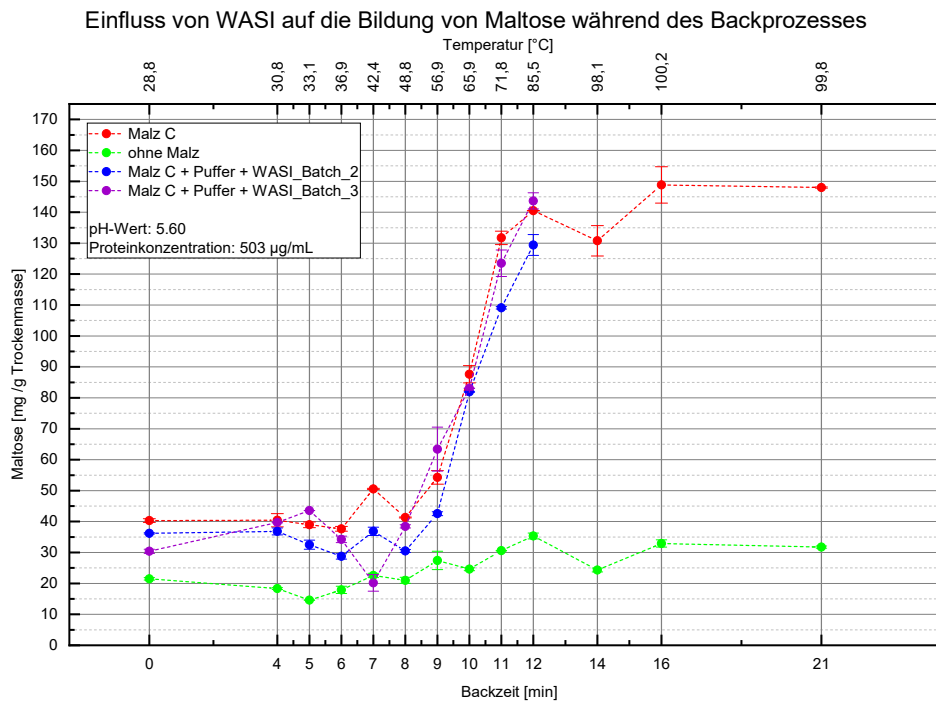


Zunahme des Speichermodul festgestellt. Dies ist auf die Stärkeverkleisterung zurückzuführen. Nach 60 °C ist es wieder zu geringeren Speichermodul gekommen. Erklärt wurde dies, mit der Spannungsrelaxation. Hierbei kommt es bei Objekten, welche sowohl unter hohe Spannung als auch unter hohe Temperaturen gestellt werden zu einer Entspannung des Objektes [32]. Die beschriebenen Charakteristika stimmen in ihren wesentlichen Punkten mit den Messungen überein, welche in dieser Arbeit beschrieben wurden.

#### **4.4 Maltosebildung im Backprozess unter dem Einfluss von WASI**

In diesem Abschnitt wurde untersucht wie stark die Maltosebildung durch WASI inhibiert werden kann. Hierfür wurden Teige gebacken, welche nur aus Mehl und Wasser bestanden, aber auch Teige in denen Malz oder Malz und WASI zugesetzt wurde. Die Maltosemenge zu unterschiedlichen Zeitpunkten im Backprozess konnte im Anschluss mittels HPLC (Dionex U3000) bestimmt werden.

In der statistischen Auswertung der gewonnenen Daten wurden 45 der 48 Gruppen als normalverteilt klassifiziert. Bei den anderen 3 wurde eine Normalverteilung abgelehnt. Da in jeder Gruppe nur 4 Messwerte liegen und ein Test auf Normalverteilung anfällig gegenüber kleinen Stichproben ist, könnte dies die drei nicht normalverteilten Datensätze erklären. Durch den zentralen Grenzwertsatz lässt sich vermuten, dass auch diese Proben bei einer entsprechend großen Messreihe normalverteilt sind. Demnach wurde im weiteren Verlauf angenommen, dass alle Daten normalverteilt sind. Der Test auf Homogenität der Varianzen ergab, dass bei 12 von 16 Vergleichen der Versuchsreihe mit einer Proteinkonzentration von 352 µg/mL keine gleichen Varianzen vorlagen. Bei der Proteinkonzentration von 501 µg/mL wurde bei 8 von 16 Vergleichen keine Homogenität der Varianzen festgestellt. Dadurch ist die Homogenität der Varianzen abzulehnen und statistische Verfahren wie ANOVA, die dieses Kriterium benötigen konnten, nicht umgesetzt werden. Es wurde ein t-Test mit Welch-Korrektur durchgeführt, da dieser die ungleichen Varianzen berücksichtigt. Die Daten wurden nach dieser statistischen Analyse grafisch dargestellt. In der Folgenden Abbildung wurde der Maltosegehalt in mg/g Trockenmasse des Teiges visualisiert.



**Abbildung 5 Einfluss von WASI auf die Maltosebildung während des Backprozesses. (n=2, Proteinkonzentration: 503 µg/ml, pH-Wert: 5.60)**

Jeder Datenpunkt in den Abbildungen besteht aus 2 Werten. In Grün ist der Standardteig zu sehen. Die roten Punkte stellen den Teig mit Malz da. In Blau und Lila sind die Teige mit Malz und dem Inhibitor WASI dargestellt.

In allen Messpunkten gibt es einen signifikanten Unterschied zwischen dem Teig mit Malz und dem Standardteig ohne Malz. Die Teige mit WASI und Malz unterscheiden sich, bis auf Minute 7 bei Batch 3, in allen Punkten signifikant von der Standardgruppe. Zwischen den Proben mit Malz und mit Malz und WASI gibt es ein eher uneindeutiges Bild. Zu Beginn bei Minute 0 unterschieden sich alle drei genannten Gruppen signifikant voneinander. Im späteren Verlauf kann an den meisten Messpunkten beobachtet werden, dass alle drei Proben mit Malz keinen signifikanten Unterschied zueinander aufgewiesen haben. Dies ist beispielsweise bei den Minuten 10 und 4 der Fall, es gibt aber wiederum Punkte wie bei Minute 7 in denen alle drei Punkte signifikante Unterschiede zueinander aufweisen.

Insgesamt ist keine statistisch signifikante Aussage in Bezug auf die Inhibierung von  $\alpha$ -Amylasen durch WASI aus diesem Versuch ableitbar, da die Gesamtzahl der signifikanten und nicht signifikanten Punkte zwischen den Malzteigen und den Teigen mit Malz und WASI annähernd zufällig verteilt sind. Trotz fehlender statistischer Korrelation der Daten zur Forschungsthese, wird der kausale Zusammenhang der Funktionsweise von WASI davon gestützt, dass die Messpunkte von Malz und WASI

in den meisten Fällen zwischen dem Standardteig und dem Teig mit Malz gelegen haben.

Im Vergleich mit einem ähnlichen Versuchsaufbau von Loder, wurden Differenzen bei den Ergebnissen festgestellt. Bei Loder wurden zwar bei dem Teigsystem mit Malz mehr Maltose gebildet als bei dem Teig ohne Malz, aber die Teige mit Malz und WASI sind im Besonderen im Temperaturbereich zwischen 41 °C und 70 °C (vgl. mit Minuten 7 bis 11 in der Abbildung 5) nahezu identisch. Erst bei 86 °C (vgl. mit Minute 12 in Abbildung 5) wurde ein starker Anstieg der Maltose Bildung festgestellt, welcher in dieser Stärke von der Autorin auch nicht vollständig zu erklären war, da angegeben wurde, dass die Malz- $\alpha$ -Amylasen zwischen 70 °C und 80 °C bereits inaktiviert sein müssten. Die Vergleichbarkeit der beiden Versuche wird dadurch beeinträchtigt, dass Loder ein anderes Malz eingesetzt hat [21].

Verglichen wurden außerdem die eingesetzten Komponenten. Loder verwendetet eine Konzentration von 708  $\mu\text{g/ml}$  während bei uns eine Konzentration von 503  $\mu\text{g/ml}$  verwendet wurden. Hierbei wurde die Malzmenge und die Verdünnungen bereits berücksichtigt. Demnach ist die erhöhte Inhibierung in Loders Versuch dadurch zu erklären. Trotzdem wäre eine stärkere Inhibierung, in den in dieser Arbeit dargestellten Versuchen, zu erwarten gewesen. Ein weiterer Unterschied bestand darin, dass Loder neben den Zutaten Mehl, Malz und Puffer auch noch andere Zutaten wie Kochsalz, Rapsöl, Natriumhydrogencarbonat und Glucono- $\delta$ -lacton verwendete. Loder hat zwar auch Teige am Rheometer gebacken, allerdings mit eine Auftauphase von 10 min neben einer Garzeit von 50 min.[21]

Da eine leichte Veränderung der Proteinkonzentration eine so starke Auswirkung hat, weist das darauf hin, dass das Verhältnis aus Inhibitor, Enzym und Substrat genau eingestellt werden muss, um die inhibierende Wirkung auszulösen.

#### **4.5 Verhalten der $\alpha$ -Amylase Aktivität des menschlichen Speichels unter dem Einfluss von WASI**

In diesem Abschnitt wurden verschiedene Versuche unternommen, um die Fragestellung zu klären, ob WASI auch gegen die  $\alpha$ -Amylasen im menschlichen Speichel inhibiert. Dies könnte von Interesse sein, um Zahnkaries entgegenzuwirken. Hierzu wurden zwei Vorversuche angestellt, in denen eine Verdünnungsstufe gesucht wurde und die Haltbarkeit der  $\alpha$ -Amylase Aktivität überprüft wurde. Im Anschluss wurden von 8 Personen Speichelproben zur Verfügung gestellt und diese zur

Bestimmung der inhibierenden Wirkung von WASI auf die  $\alpha$ -Amylase Aktivität untersucht.

#### 4.5.1 Findung einer Verdünnungsstufe des menschlichen Speichels für den $\alpha$ -Amylase Assay

Um eine geeignete Verdünnung des Speichels zu bestimmen, wurden die Verdünnungen 1:1, 1:10, 1:100 und 1:1000 erstellt. Anschließend wurde zudem eine Verdünnung von 1:400 vermessen. In der folgenden Tabelle sind die entsprechenden Verdünnungsstufen und deren Extinktionen dargestellt:

**Tabelle 18 Bestimmung einer Verdünnungsstufe des Speichels für den  $\alpha$ -Amylase Assay**

Verdünnungsstufe	1:1	1:10	1:100	1:400	1:1000
Ø Extinktion	3.422	2.369	2.177	0.306	0.084

Da eine Extinktion zwischen 0,2 und 1 angestrebt wurde, erfüllte die Verdünnungsstufe 1:400 die Erwartungshaltung. Im weiteren Verlauf wurden deswegen immer Verdünnungen von 1:400 verwendet.

In einer Versuchsreihe der ETH Zürich mit 60 Probanden wurden auch Verdünnungen des Speichels zur fotometrischen Quantifizierung erstellt. In dieser Studie wurde kein konkretes Testverfahren angegeben. Allerdings wurde die Reaktion eines Oligosaccharides beschrieben, wodurch p-Nitrophenol frei, welches im Anschluss fotometrisch bestimmt wurde. Dies Punkte stimmen zumindest mit der Ceralpha-Methode zur Bestimmung der  $\alpha$ -Amylase Aktivität überein. Zum Vergleich wurde die Reaktionsgleichung im Anhang dargestellt (Abbildung 7). Diese Gruppe hat eine Verdünnung von 1:324 verwendet, welche zumindest in einer ähnlichen Größenordnung liegt. [33]

#### 4.5.2 Haltbarkeit der $\alpha$ -Amylase Aktivität des menschlichen Speichels

Um mit dem menschlichen Speichel arbeiten zu können, sollte zudem die Haltbarkeit der  $\alpha$ -Amylase Aktivität des menschlichen Speichels bestimmen werden, um festzustellen, wie schnell die Proben verarbeitet werden müssen, ohne eine signifikante Abnahme der  $\alpha$ -Amylase Aktivität erwarten zu müssen. Hierzu wurde eine Speichelprobe 1:400 verdünnt und die  $\alpha$ -Amylase Aktivität bestimmt. Der Tag der Probennahme wurde hierbei als Tag 0 bezeichnet. Es wurde die  $\alpha$ -Amylase Aktivität an den Tagen 0, 1, 8 und 28 bestimmt.

**Tabelle 19 Haltbarkeit der  $\alpha$ -Amylase Aktivität im menschlichen Speichel**

Messung	Tag 0	Tag 1	Tag 8	Tag 28
Durchschnittliche $\alpha$ -Amylase Aktivität in ASCB/ml Speichel	140	140	110	55
Standardabweichung in ASCB/ml Speichel	8	7	3	15
Signifikanz mit t-Test ( $p < 0.05$ )		0.03733	6.42538	8.84923
Relative Aktivität [%]		100.16	78.56	39.28

Es konnte demnach beobachtet werden, dass sich nach einem Tag die  $\alpha$ -Amylase Aktivität nicht signifikant verändert. Nach 8 und 28 Tagen gibt es zwar einen signifikanten Rückgang der  $\alpha$ -Amylase Aktivität, allerdings ist immer noch  $\alpha$ -Amylase Aktivität vorhanden. Angenommen die  $\alpha$ -Amylase Aktivität im Speichel soll bestimmt werden, so sollte dies innerhalb von einem Tag geschehen. Da sich in den weiteren Versuchen immer auf einen relativen Wert beziehen sollten, war von Bedeutung, dass die Proben überhaupt noch  $\alpha$ -Amylase Aktivitäten haben. Bei einem Rückgang der  $\alpha$ -Amylase Aktivität ist zudem zu berücksichtigen, dass es sein kann, dass sich die Zusammensetzung der noch aktiven Proteine verändert. Beispielsweise könnte es sein, dass die  $\alpha$ -Amylase 1 früher ihre Aktivität verliert als die  $\alpha$ -Amylase 2. Bei einer veränderten Aktivität kann also nicht davon ausgegangen werden, dass der Inhibierungsanteil durch WASI derselbe ist, wie in einer frischen Probe. Demnach wurden die Speichelproben immer innerhalb eines Tages verarbeitet.

Auch mit der Haltbarkeit der  $\alpha$ -Amylase Aktivität hat sich die Gruppe der ETH Zürich beschäftigt. In dieser Versuchsreihe wurden die Speichelproben eingefroren und nach einer nicht beschriebenen Zeit wieder aufgetaut. Anschließend wurden einige Proben bis zu 150 Minuten gelagert. Zumindest in diesen 150 Minuten konnte keine signifikante Abnahme der  $\alpha$ -Amylase Aktivität beobachtet werden. [33]

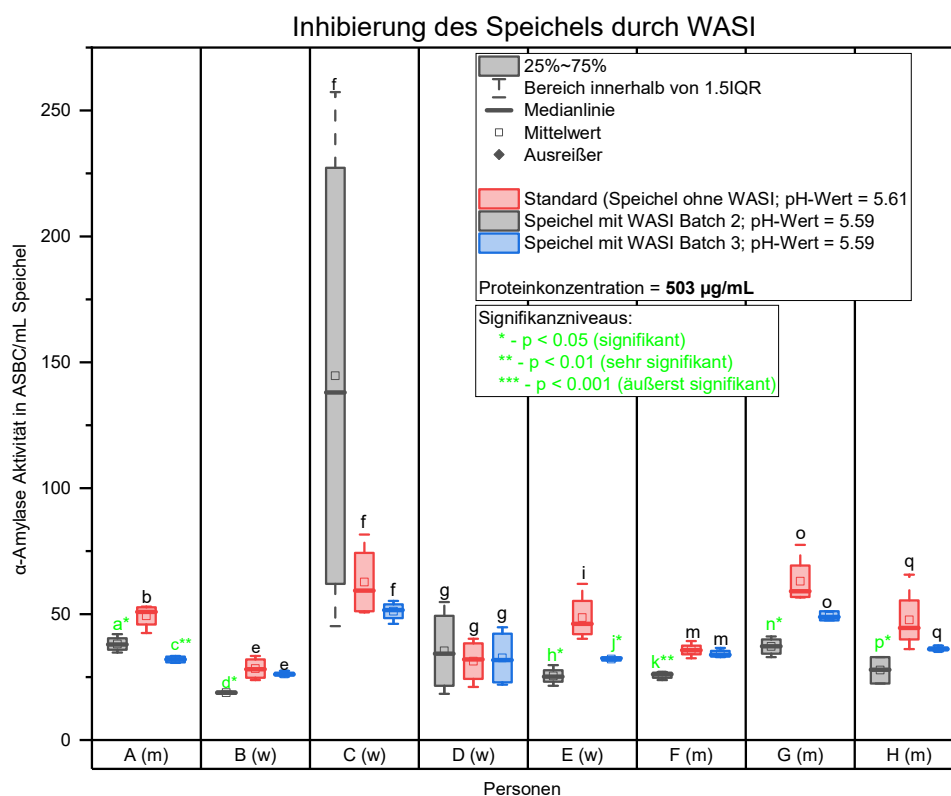
#### **4.5.3 Inhibierung der $\alpha$ -Amylase des menschlichen Speichels**

Nach den Ergebnissen der Vorversuche zur Verdünnungsstufe und zur Haltbarkeit wurden nun Speichelproben von 4 Frauen und 4 Männern gesammelt. Hierbei wurde neben dem Geschlecht auch noch notiert, was die entsprechenden Personen vorher gegessen hatten. Eine Übersicht dazu wurde im Anhang in Die Personen, welche Speichelproben abgegeben haben, wurden nach der Essenaufnahme befragt. Die Ergebnisse dieser Befragung wurde im folgenden dargestellt. Das Geschlecht "m" steht hierbei für männlich und das Geschlecht "w" für weiblich.

Tabelle 22 dargestellt. Das Geschlecht „w“ ist hierbei als weiblich und das Geschlecht „m“ als männlich zu verstehen.

Insgesamt wurden zwei  $\alpha$ -Amylase Assays mit Speichelproben erstellt. Die erste Reihe hatte eine Proteinkonzentration von 352  $\mu\text{g/ml}$ , die zweite Reihe eine Proteinkonzentration von 501  $\mu\text{g/ml}$ . Da der erste Versuch nicht eindeutig ausgefallen ist, wurde dieser Versuch mit einer höheren Proteinkonzentration wiederholt. Eine entsprechende Abbildung der Daten aus dem ersten Datensatz wurde im Anhang hinterlegt.

Die Ergebnisse des zweiten Versuchs mit einer höheren Proteinkonzentration sind in der Abbildung 6 dargestellt.



**Abbildung 6 Inhibierung der  $\alpha$ -Amylase Aktivität des Speichels durch WASI mit einer Proteinkonzentration von 503  $\mu\text{g/ml}$  bei pH-Wert 5.60 In der Mitte ist der Standard ohne Speichel.**

Im der Abbildung ist zu sehen, dass 14 der 16 Mittelwerte der Proben mit WASI unterhalb der Mittelwerte der Proben ohne WASI liegen. Zudem ist bei 8 der 16 Proben mit WASI ein signifikanter Unterschied zu den Proben zu erkennen, in denen kein WASI vorhanden war. In zwei Fällen sogar ein sehr signifikanter Unterschied.

Interessant ist die Probe der Person C. Diese Person hat angegeben eine Waffel/Donat gegessen zu haben, welche eine eher stärkehaltige Mahlzeit ist auch Person G hat erhöhte  $\alpha$ -Amylase Aktivität im Speichel. Da Kaugummis oft mit Zucker versetzt werden, könnte es sein, dass diese Person ein derartiges Dragee gegessen

hat. Auch die Personen B, F und H haben stärkehaltige Lebensmittel konsumiert. Bei diesen Personen sind aber keine Auffälligkeiten gegenüber der Gruppe an Personen, die nichts gegessen haben, zu sehen. Da der Abstand zwischen der Speiseaufnahme und der Probennahme nicht dokumentiert ist, könnte es sein, dass es kurzzeitig nach einer stärkehaltigen Mahlzeit zur erhöhten  $\alpha$ -Amylase Aktivitäten gekommen ist, welche im Anschluss wieder nachlässt.

Aufgrund dieser Ergebnisse ist deutlich geworden, dass WASI die  $\alpha$ -Amylasen im menschlichen Speichel inhibieren kann. Anders sind die häufigen auftretenden signifikanten Unterschiede nicht mehr zu erklären. Gerade in der zweiten Abbildung ist ersichtlich, dass bei Personen wie A oder E WASI in beiden Vergleichen gewirkt hat. Interessant sind noch die Proben von C und D. Hier konnte keine Inhibierung festgestellt werden. Gerade bei Person D ist es auffällig, dass die Proben mit WASI überhaupt keinen Einfluss auf die  $\alpha$ -Amylase Aktivität hat. Eine Ursache dafür könnte die biologische Variabilität sein. Eventuell haben die entsprechenden Personen andere Zusammensetzungen der Mikroorganismen im Mundmilieu. Auch die Ernährung könnte eine entscheidende Rolle gespielt haben, da es für Enzyme von entscheidender Bedeutung sein kann, wie viel Substrat vorliegt und diese durch die Aufnahme von stärkehaltigen Lebensmitteln beeinflusst werden kann. Hierbei musste sich auf die persönlichen Angaben der Probanden verlassen werden. Eine Unsicherheit stellt aber auch die geringe Stichprobengröße dar. Unter anderem könnte es sein, dass die Auswahl der Probanden nicht repräsentativ war und daher der Gesamteindruck verzerrt dargestellt wurde. Eine weitere Erklärung könnte aber auch sein, dass WASI nur partiell inhibiert und dadurch einige Proben nicht ausreichend vermessen werden konnten. Es ist an dieser Stelle zu betonen, dass der Assay zur Bestimmung der  $\alpha$ -Amylase Aktivität nicht für diesen konkreten Zweck, der Feststellung einer Inhibierung, konzipiert worden ist. Da beispielsweise die Einheit ASBC pro ml Speichel keine Nachkommastellen mitberücksichtigt, ist dadurch auch eine Aussage über die Genauigkeit des Verfahrens abzuleiten. Um häufigere Signifikanzen messen zu können, wäre es demnach sinnvoll ein Testverfahren zu wählen, welches weniger störanfällig ist.

Da WASI sowohl die  $\alpha$ -Amylasen im menschlichen Speichel inhibieren kann als auch die von Malz wurde ein Vergleich der  $\alpha$ -Amylasen angestellt. Aus drei verschiedenen Quellen konnte die Aminosäuresequenz der  $\alpha$ -Amylasen aus dem menschlichen Speichel gewonnen werden [34] [35] [36]. Zudem konnte aus weiteren drei Quellen die

Aminosäuresequenz von den  $\alpha$ -Amylasen aus dem Weizen gewonnen werden [37] [38] [39]. Des Weiteren wurde noch eine Aminosäuresequenz einer  $\alpha$ -Amylase aus der Bauchspeicheldrüse des Menschen verwendet [40]. Es zeigte sich, dass die drei Aminosäuresequenzen des menschlichen Speichels identisch waren. Die drei Datensätze von der Aminosäuresequenzen aus dem Weizen wiesen klare Unterschiede auf. Der Datensatz der  $\alpha$ -Amylasen aus dem Speichel wurde, mit dem aus der Bauchspeicheldrüse verglichen. Von den 511 Aminosäuren stimmten 495 miteinander überein (96.87 %, Alignment-Score: 2755.00). Dies bedeutet das sich die  $\alpha$ -Amylasen aus der Bauchspeicheldrüse des Menschen mit den  $\alpha$ -Amylasen des menschlichen Speichels sehr ähnlich sind. Da diese sehr starke Ähnlichkeit auch von Horri beschrieben wurde, könnte davon ausgegangen werden, dass der Algorithmus funktioniert [40]. Als im Folgenden die  $\alpha$ -Amylasen des menschlichen Speichels mit denen von Weizen verglichen wurde, wurde festgestellt, dass sich die  $\alpha$ -Amylasen grundlegend unterscheiden. Der Vergleich des Speichel Datensatzes mit dem ersten Datensatz aus Weizen zeigte eine Übereinstimmung in 113 Aminosäuren (20.04 %) und einen Alignment-Score von 119. Der Vergleich mit dem zweiten Datensatz ergab, dass 109 Aminosäuren identisch waren (17.25 %). Hier wurde ein Alignment-Score von 92 erreicht. Im dritten Datensatz stimmten 98 Aminosäuren überein (17.44 %) und ein Alignment-Score von 79.5 wurde erzielt. Der Vergleich der Aminosäuren aus den  $\alpha$ -Amylasen aus dem Weizen ergab prozentuale Übereinstimmungen zwischen 56.25 % und 61.96 %, während der Alignment-Score zwischen 1276 und 1530.5 lag. Wenn WASI die beiden  $\alpha$ -Amylasen trotz der genetischen Vielfalt inhibiert, könnte das an den genetisch identischen Stellen liegen.

Das Ergebnis dieser Analyse zeigt also, dass zwei in ihren Aufbau grundlegend unterschiedliche Proteine, welche lediglich dieselben katalytischen Funktionen haben, durch WASI gehemmt werden können und zeigt damit auf, dass WASI einen Einfluss auf Eukaryoten haben kann, was die Vermutung von Khakimzhanov widerlegt, [11]. Da auch Loder die Vermutung anstellte, dass neben den  $\alpha$ -Amylasen auch die  $\beta$ -Amylasen inaktiviert werden könnten [21] und auch eine Inhibierung von Subtilisin von WASI ausgeht, könnte sich ein sehr vielfältiges Feld an Inaktivierungen durch WASI ergeben.



## 5 Schlussfolgerung und Ausblick

Ein Ausgangspunkt der Untersuchung der pH-Wert Abhängigkeit von WASI war die Forschungshypothese, dass WASI nur in bestimmten pH-Wert Bereichen eine Inaktivierung der  $\alpha$ -Amylasen bewirkt. Die pH-Wertabhängigkeit von WASI wurde mit der Ceralpha-Methode untersucht. Um Getreide typische  $\alpha$ -Amylasen zu gewinnen, wurden diese aus Malzmehl extrahiert. Es wurden Pufferlösungen auf ein breites pH-Wertspektrum eingestellt, um festzustellen, in welchem pH-Wert Bereich die  $\alpha$ -Amylasen aktiv sind. Über den kompletten pH-Wert Bereich, in dem die  $\alpha$ -Amylase des Malzmehles aktiv sind, wurden Pufferlösungen mit dem Inhibitor WASI auf die jeweiligen pH-Werte eingestellt und fotometrisch vermessen worden. Es konnte gezeigt werden, dass WASI über den kompletten  $\alpha$ -Amylase Aktivitätsbereich eine inhibierende Wirkung hat. Die aufgestellte Forschungshypothese konnte damit widerlegt werden.

Die zweite Hypothese war, dass WASI die Aktivität der  $\alpha$ -Amylasen nur bis zu einem bestimmten Verhältnis aus Temperatur und Zeit des Backprozesses inhibieren kann. Um dies festzustellen, wurde Teige im Rheometer gebacken und sowohl deren rheologische Eigenschaften als auch die Maltosebildung untersucht. Ein typisches Temperatur-Zeitprofil für den Backprozess wurde gewählt und das Speichermodul [Pa] der Teige während des Backprozesses bestimmt. Zu ausgewählten Zeitpunkten wurden Proben für die Maltosebestimmung genommen. Differenziert wurde zwischen Teigen mit Malzeinsatz und ohne Malzeinsatz. Außerdem wurden Teige mit Malz und WASI gebacken. Die rheologischen Untersuchungen des Storage Moduls zwischen den Teigen mit Malz und den Teigen mit Malz und WASI konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede aufzeigen. Die Mittelwerte der Teige mit WASI stützen die Vermutung, dass WASI inhibierend auch im Teigsystem wirkt insofern, als das diese in den meisten Fällen zwischen den Teigen mit Malz und dem Standardteig ohne Malz gelegen haben. Zusammenfassend wird die Kausalität der Funktionsweise bestärkt, aber die Korrelation der Daten ist noch nicht im ausreichenden Maß vorhanden, um die Hypothese anzunehmen oder abzulehnen. Die Maltose Bestimmung der Teige wurde mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie durchgeführt. In diesem Fall zeigt sich ein ähnliches Bild wie bei den rheologischen Untersuchungen. Die Mittelwerte hatten meistens die kausal erklärbare, korrekte Tendenz, es konnte aber kein statistisch signifikanter Unterschied gezeigt werden. Demnach kann auch aus der Maltose Bestimmung die Hypothese weder abgelehnt noch angenommen werden.

Die letzte Hypothese, die untersucht wurde, war die, dass durch WASI auch die  $\alpha$ -Amylasen im menschlichen Speichel inhibiert werden können. Hierzu gaben acht Probanden Speichelproben ab. Die Speichelproben der Probanden wurden auf die Aktivität der  $\alpha$ -Amylasen untersucht. Zum Vergleich wurden Speichelproben mit WASI versetzt und die  $\alpha$ -Amylase Aktivität davon bestimmt. Der Vergleich der beiden Proben zeigte, dass die  $\alpha$ -Amylasen des menschlichen Speichels signifikant inhibiert werden konnten. Dies wurde erklärt, indem die Aminosäuresequenzen der  $\alpha$ -Amylasen des menschlichen Speichels untersucht wurden und festgestellt wurde, dass diese zu etwa 20 % die gleichen Sequenzen haben. Demnach ist es WASI wahrscheinlich möglich, an diese gleichen Stellen sowohl bei der Speichel- $\alpha$ -Amylase als auch bei der Malz- $\alpha$ -Amylase zu binden. Da sowohl ein statistischer als auch ein kausaler Zusammenhang besteht, kann die Hypothese, dass WASI auch die Speichel- $\alpha$ -Amylase inhibieren kann, angenommen werden.

Aus den aufgestellten Ergebnissen können einige weitere Forschungsfragen sowie weiterführende Untersuchungen abgeleitet werden. Durch die angestellten Untersuchungen konnte der pH-Wert abhängige Wirkungsbereich von WASI auf die  $\alpha$ -Amylasen festgestellt werden. Ein konkretes mathematisches Modell, welches die Proteinkonzentration und den pH-Wert mit einbezieht, um den Inaktivierungsgrad zu bestimmen, wäre für einen Einsatz im größeren Maßstab weiterhin sinnvoll.

Auch WASI im Backprozess bietet noch die Fragestellung, in welchem Inhibitor-Enzym-Substrat-Verhältnis WASI eingesetzt werden muss, um bei dem entsprechenden Temperaturverlauf eine inhibierende Wirkung zu haben. In der Arbeit von Loder und in dieser Arbeit wurde Anfänge in dieser Hinsicht bereits gemacht.

Die Feststellung, dass auch Speichel- $\alpha$ -Amylase inhibiert werden kann, wurde auf die ähnlichen Stellen der Aminosäuresequenzen zurückgeführt. Weitere  $\alpha$ -Amylase mit ähnlichen Aminosäuresequenzen könnten untersucht werden. Weiterführend könnte man die Überlegung anstellen, weitere Untersuchungen zu Art der Hemmung zu unternehmen. Mit dem Auftragen der reziproken maximalen Reaktionsgeschwindigkeit gegen den Kehrwert der Substratkonzentration könnte man ein Lineweaver-Burk-Diagramm erstellen, welches einen Rückschluss auf eine kompetitive oder nicht kompetitive Hemmung erlaubt. Durch derartige Überlegungen könnte der Bindungsmechanismus von WASI aufgeklärt werden.

## 6 Literaturverzeichnis

- [1] O. Dr. Zinke, „Agrarheute,“ 14 08 2023. [Online]. Available: <https://www.agrarheute.com/markt/marktfruechte/getreideernte-massiven-qualitaets-problemen-fehlt-bald-brotweizen-610059#:~:text=%23%20%E3%80%901%E2%80%A0Getreideernte%20mit%20massiven%20Qualit%C3%A4ts,Das.> [Zugriff am 23 10 2023].
- [2] S. Nakamura, „Grain dormancy genes responsible for preventing pre-harvest sprouting in barley and wheat,“ *Breed Sci* - 68(3), pp. 295 - 304, 2018.
- [3] D. Mares und K. Mrva, „Wheat grain preharvest sprouting and late maturity alpha-amylase,“ *Planta*, 2014.
- [4] J. Trandowsky, S. Y. Philip, F. Kreienkamp, S. F. Kew, P. Lorenz, J. Arrighi, T. Bettmann, S. Caluwaerts, S. C. Chan, L. De Cruz, H. de Vries, N. Demuth, A. Ferrone und E. M. Fischer, „Attribution of the heavy rainfall events leading to severe flooding in Western Europe during July 2021,“ *Climatic Change*, 2023.
- [5] DWD, „DWD - Deutscher Wetterdienst,“ 22 10 2023. [Online]. Available: [https://www.dwd.de/EN/press/press\\_release/EN/2021/20210730\\_the\\_weather\\_in\\_germany\\_in\\_july\\_2021\\_news.html](https://www.dwd.de/EN/press/press_release/EN/2021/20210730_the_weather_in_germany_in_july_2021_news.html).
- [6] N. Kaur, V. Kumar, A. K. Nayak, P. Wandhwa, P. Kaur und S. K. Sahu, „Alpha-amylase as molecular target for treatment of diabetes mellitus: A comprehensive review,“ *Chem Biol Drug Des*, pp. 539 - 560, 2021.
- [7] D. Schuppan und K. Gisbert-Schuppan, *Tägliches Brot: Krank durch Weizen, Gluten und ATI*, Berlin: Springer-Verlag GmbH, 2018.
- [8] A. Schellenberger, *Enzymkatalyse*, Heidelberg: Springer-Verlag GmbH, 1989.
- [9] F. M. Dupont, W. H. Vensel, C. K. Tanaka, W. J. Hurkman und S. B. Altenbach, *Deciphering the complexities of the wheat flour proteome using quantitative two-dimensional electrophoresis, three proteases and tandem mass spectrometry*, Albany: Proteome Sciences, 2011.
- [10] S. B. Altenbach, W. H. Vensel und F. M. Dupont, „The spectrum of low molecular weight alpha-amylase/protease inhibitor genes expressed in the US bread wheat cultivar Butte 86,“ *BioMed Central*, 2011.

- [11] A. A. Khakimzhanov, D. A. Shansharova, L. B. Umiraliyeva, L. Hřivna, V. Sottníková, S. K. Madenova und D. B. Abdraimova, Some Properties of Endogenous Alpha-Amylase Inhibitor from Wheat Grain, Almaty, Kazakhstan.: Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences , 2014.
- [12] V. Kuzovlev, Z. D. Beskempirova, D. A. Shansharova, O. Fursov und A. A. Khakimzhanov, Properties and Specific Functional Features of Wheat Grain Alpha-Amylase/Subtilisin Inhibitor, Almaty: Applied Biochemistry and Microbiology, 2017.
- [13] J. Mundy, H. J. und I. Svendsen, Characterization of a bifunctional wheat inhibitor of endogenous Alpha-Amylase and Subtilisin, Amsterdam: Elsevier Science Publishers B.V. , 1984.
- [14] K. J. Zemke, A. Müller-Fahrnow, K.-D. Juny, G. P. Pal und W. Saenger, „The three-dimensional structure of the bifunctional proteinase K/Alpha-Amylase inhibitor from wheat (PKI3) at 2.5 Å resolution,“ *Federation of European Biochemical Societies*, 1991.
- [15] P. O. Micheelsen, J. Vévodová, L. De Maria, P. R. Østergaard, E. P. Friis, K. Wilson und M. Skjøt, Structural and Mutational Analyses of the Interaction between the Barley  $\alpha$ -Amylase/Subtilisin Inhibitor and the Subtilisin Savinase Reveal a Novel Mode of Inhibition, Amsterdam: Elsevier Ltd., 2008.
- [16] B. Svensson, K. Fukuda, P. K. Nielsen und B. C. Bønsager, „Proteinaceous  $\alpha$ -amylase inhibitors,“ *Elsevier* , 2003.
- [17] O. Franco, D. J. Rigden, F. R. Melo und M. F. Grossi-de-Sa, „Plant Alpha-Amylase inhibitor and their interaction with insect Alpha-Amylases (Structure, function and potential for crop protection),“ *Federation of European Biochemical Societies*, pp. 397 - 412 , 2002.
- [18] R. Henry, V. Battershell, P. Brennan und K. Oono, „Control of Wheat Alpha-Amylase Using Inhibitors from Cereals,“ *Journal of the Science of Food and Agriculture*, pp. 281 - 284, 1992.
- [19] K. Schuster, Entwicklung eines Verfahrens zur heterologen Expression von WASI (Wheat bifunctional  $\alpha$ -Amylase/Subtilisin Inhibitor) aus Weizen in E. coli, 2021.
- [20] J. Linner, Aufklärung des Einflusses von endogener  $\alpha$ -Amylase aus Weizenmalz auf die Eigenschaften von Weizenteigen und Weizenbrot durch gezielte Inhibierung mittels des Wheat- $\alpha$ -Amylase/Subtilisin-Inhibitors (WASI), 2022.

- [21] R. Loder, Inhibierung der endogenen Alpha-Amylase aus Weizenmalz in Weizenteigen und -brot durch WASI (Wheat Alpha-Amylase/Subtilisin Inhibitor), 2023.
- [22] D. Upadhyay und P. Andhare, „A Study on Amylase: Review,“ ResearchGate, Parul, 2021.
- [23] X. Sun, S. Wu, W. Li, F. Koksel, Y. Du, L. Sun, Y. Fang, Q. Hu und F. Pei, „The effects of cooperative fermentation by yeast and lactic acid bacteria on the dough rheology, retention and stabilization of gas cells in a whole wheat flour dough system – A review,“ *Elsevier*, 2023.
- [24] A. Demirci und H. K. K. Feng, Food Safety Engineering, Cham: Springer Nature Switzerland AG, 2020.
- [25] A. Bennick, „Salivary proline-rich proteins,“ *Molecular and Cellular Biochemistry*, pp. 83 - 99, 1982.
- [26] F. A. Scannapieco, G. Torres und M. J. Levine, „Salivary Alpha-Amylase: Role in Dental Plaque and Caries Formation,“ *Oral Biology and Medicine*, pp. 301-307, 1993.
- [27] S. R. Eddy, „Where did the BLOSUM62 alignment score matrix come from?,“ *Nature Biotechnology* 22, pp. 1035 - 1036, 2004.
- [28] S. Shukla, B. Mishra, H. Avashthi und M. Chandra, „Biological sequence analysis,“ *Academic Press - Bioinformatics*, pp. 33 - 47, 2022.
- [29] T. Kriegel und W. Schnellenberg, Biochemie und Pathobiochemie - Regulation der Enzymaktivität, Heidelberg: Springer-Verlag GmbH, 2022, pp. 149 - 162.
- [30] S. Cox und S. Taylor, „Kinetic analysis of cAMP-dependent protein kinase: mutations at histidine 87 affect peptide binding and pH dependence,“ *Biochemistry*, 1995.
- [31] J. Reijenga, A. van Hoof, A. van Loon und B. Teunissen, „Development of Methods for the Determination of pKa Values,“ *Anal Chem Insights* , pp. 53 - 71 , 2013.
- [32] A. Bloksma und W. Nieman, „Rheological properties of wheat flour doughs,“ *Journal of Texture Studies* , pp. 343 - 361, 2007.
- [33] C. Leicht, „Vergleich der Alpha-Amylase-Aktivität im Speichel nach Konsum von zwei verschiedenen Müesli,“ ETH Zürich Library, Zürich, 2002.

- [34] N. Ramasubbu, P. Paloth und Y. Luo, „Structure of human salivary alpha-amylase at 1.6 Å resolution: implications for its role in the oral cavity,“ *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 1996.
- [35] S. Gregory, K. Barlow, K. McLay, R. Kaul, D. Swarbreck, A. Dunham, C. Scott, K. Howe, K. Woodfine, C. Spencer, M. Jones, C. Gillson, S. Searle, Y. Zhou, F. Kokocinski, L. McDonald, R. Evans, K. Phillips und A. Atkinson, „The DNA sequence and biological annotation of human chromosome,“ *Nature*, 2006.
- [36] T. Nishide, Y. Nakamura, M. Emi, T. Yamamoto, M. Ogawa, T. Mori und K. Matsubara, „Primary structure of human salivary  $\alpha$ -amylase gene,“ *Elsevier*, pp. 299 - 304, 1986.
- [37] D. Baulcomb, A. Huttly, M. R.A., R. Barker und M. Jarvis, „A novel wheat alpha-amylase gene (alpha-Amy3),“ *Molecular and General Genetics MGG*, pp. 33 - 40, 1987.
- [38] A. Zimin, D. Puiu, R. Hall, S. Kingan, C. B.J. und S. Salzberg, „The first near-complete assembly of the hexaploid bread wheat genome, *Triticum aestivum*,“ *GigaScience*, 21 10 2017.
- [39] J. Mieog und R. J.P., „Fast and Efficient Screening for Wheat Loss-of-Gene Mutants Using Multiplexed Melt Curve Analyses.,“ *Plos One*, 2016.
- [40] A. Horii, M. T. N. Emi, T. Nishide, M. Ogawa, T. Mori und K. Matsubara, „Primary structure of human pancreatic alpha-amylase gene: its comparison with human salivary alpha-amylase gene.,“ *Elsevier Volume 60 Issue 1*, 1987.

## 7 Liste der Abbildungen und Tabellen

### 7.1 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Verwendete Geräte / Materialien .....	8
Tabelle 2 Verwendete Chemikalien und Rohstoffe.....	10
Tabelle 3 Zusammensetzung des LB-Mediums.....	12
Tabelle 4 Zusammensetzung des Lysepuffers .....	13
Tabelle 5 Zusammensetzung des Bindepuffers und des Elutionspuffer .....	14
Tabelle 6 Aufreinigen mittels IMAC 1 .....	15
Tabelle 7 Zusammensetzung des Tris-HCl Puffers .....	15
Tabelle 8 Pipettierschema der BSA-Verdünnungsreihe .....	16
Tabelle 9 Pipettierschema für die Verdünnungsreihe der Probe .....	16
Tabelle 10 Aufreinigung mittels IMAC 2 .....	17
Tabelle 11 Alte Reinigungsvorschrift der Äkta .....	18
Tabelle 12 Neue Reinigungsvorschrift der Äkta.....	19
Tabelle 13 Reagenzien für den Extraktionspuffer.....	20
Tabelle 14 Reagenzien für die Stammlösung des Verdünnungspuffers .....	20
Tabelle 15 Zusammensetzung des Teigsysteme .....	24
Tabelle 16 Kalibrierstandard für die HPLC zur Bestimmung der Maltose .....	27
Tabelle 17 Pipettierschema der Ceralpha-Methode zur Bestimmung der $\alpha$ -Amylase Aktivität des Speichels.....	29
Tabelle 18 Bestimmung einer Verdünnungsstufe des Speichels für den $\alpha$ -Amylase Assay.....	44
Tabelle 19 Haltbarkeit der $\alpha$ -Amylase Aktivität im menschlichen Speichel.....	45
Tabelle 20 Temperaturverlauf während des Backprozesses .....	60
Tabelle 21 Zeitpunkte der Probenentnahme .....	61
Tabelle 22 Ergebnisse der Personenbefragung zu deren Essensaufnahme .....	62

### 7.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Proteinkonzentration nach Chargennummer. Da das Flüssigkeitsvolumen um das Protein zu lösen variiert, wurde im Anhang ein Bild der Gesamtproteinmenge pro Charge hinterlegt. Jede Charge bestand aus 2 Liter LB-Medium. 34

Abbildung 2 pH-Wert-Abhängige  $\alpha$ -Amylase-Aktivität des Malzmehls ( $n = 8-32$ ). Zu sehen ist pro pH-Wert ein Boxplot. Die Box umfasst die 50 % der Werte, die zwischen dem ersten und dritten Quartil der Datenpunkte liegen. 36

Abbildung 3 Inhibierung der  $\alpha$ -Amylasen des Malzes durch WASI (nBlau = 4; nSchwarz = 4; nRot pH 3.40-3.80; 4.10; 4.30; 4.50; 4.70; 4.90; 5.10; 5.40-11.00 = 8; nRot pH 4.00; 4.20; 4.40; 4.60; 4.80; 5.00 = 16; nRot pH 5.20 = 32; Proteinkonzentration von 903  $\mu\text{g/ml}$ ) 37

Abbildung 4 Rheologische Auswirkungen von WASI auf Weizenbrot. Die Puffer der Teige mit WASI hatten eine Konzentration von 503  $\mu\text{g/ml}$ . Gemessen wurde bei einem pH-Wert von 5.60 39

Abbildung 5 Einfluss von WASI auf die Maltosebildung währen des Backprozesses. (n=2, Proteinkonzentration: 503  $\mu\text{g/ml}$ , pH-Wert: 5.60) 42

Abbildung 6 Inhibierung der  $\alpha$ -Amylase Aktivität des Speichels durch WASI mit einer Proteinkonzentration von 503  $\mu\text{g/ml}$  bei pH-Wert 5.60 In der Mitte ist der Standard ohne Speichel. 46

Abbildung 7 Reaktionen während der Ceralpha-Methode 57

Abbildung 8 Inhibierung der  $\alpha$ -Amylase Aktivität des Speichels durch WASI mit einer Proteinkonzentration von 352  $\mu\text{g/ml}$  bei pH-Wert 5.2 58

Abbildung 9 Gesamtproteinmenge nach Chargennummer 59

Abbildung 10 Nachempfundene Gärkammer mittels eines Bechers und eines feuchten Tuchs welches mit 5 ml Wasser getränkt wurde. 66

### 7.3 Formelverzeichnis

Formel 1: Berechnung der Zugabe der Vorkultur in die Hauptkultur..... 13

Formel 2: Berechnung der  $\alpha$ -Amylase Aktivität in ASBC/g ..... 22



## 8 Anhang

### 8.1 Reaktion von Blocked-p-Nitrophenyl-Methoheptaoside (BPNPG7) in der Ceralphe-Methode

In dieser Abbildung wurde mittels ChemDraw die Reaktionen während des  $\alpha$ -Amylase Assays dargestellt.

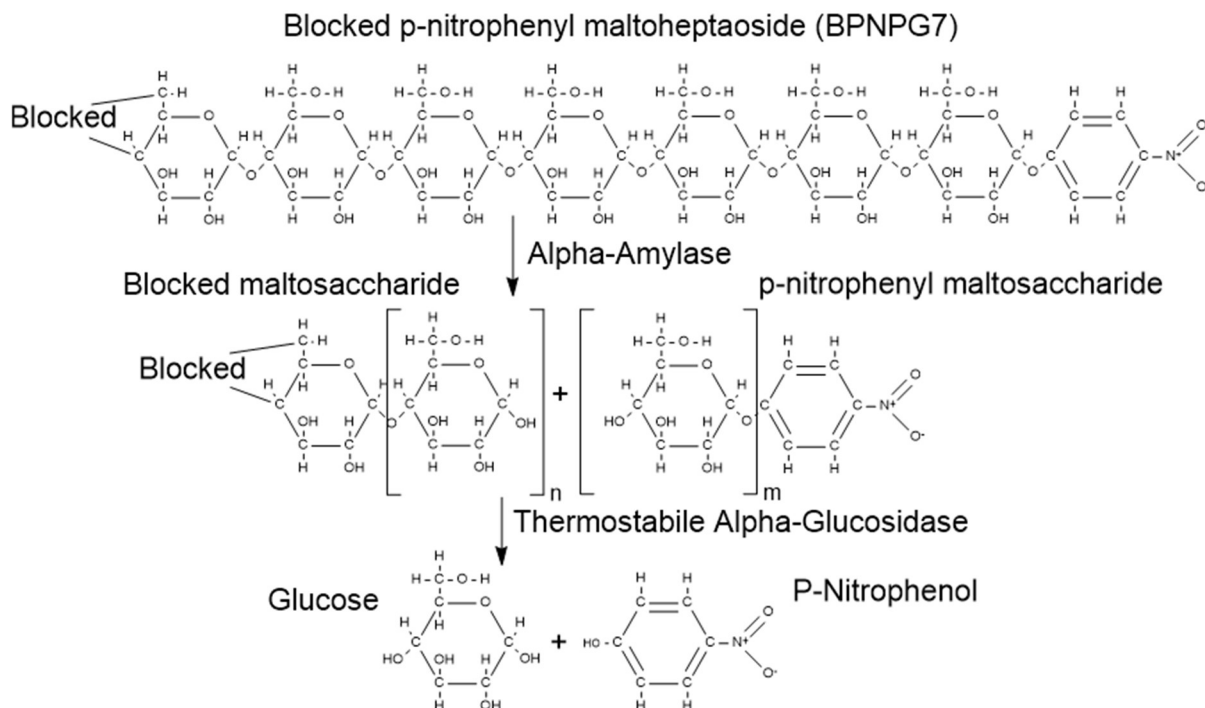
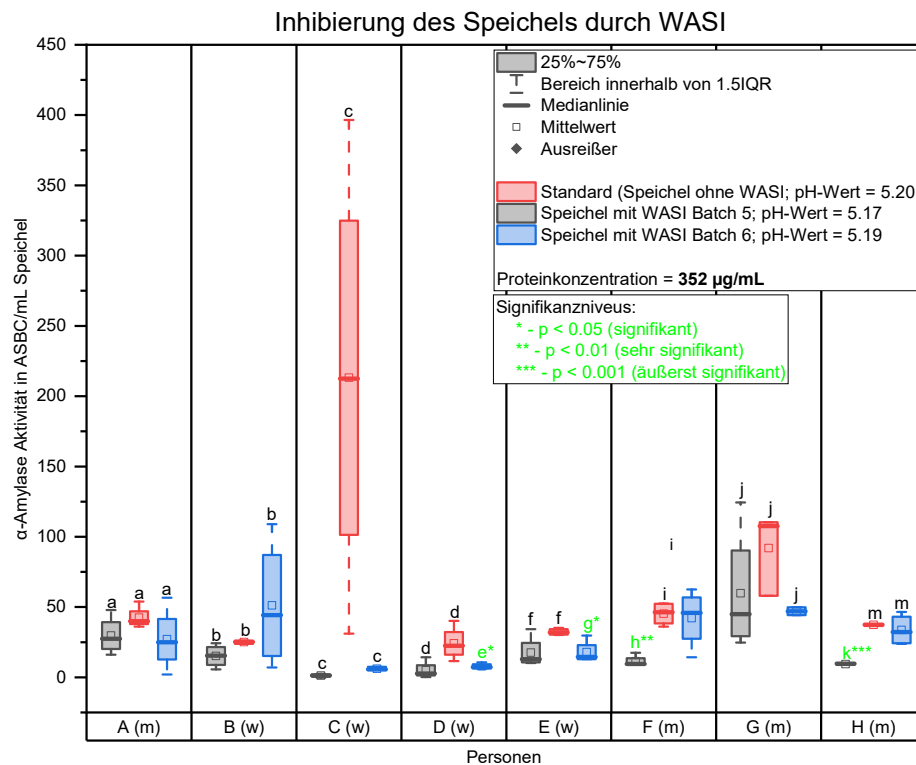


Abbildung 7 Reaktionen während der Ceralphe-Methode

## 8.2 Abbildung der Inhibierung der $\alpha$ -Amylasen des menschlichen Speichels durch WASI

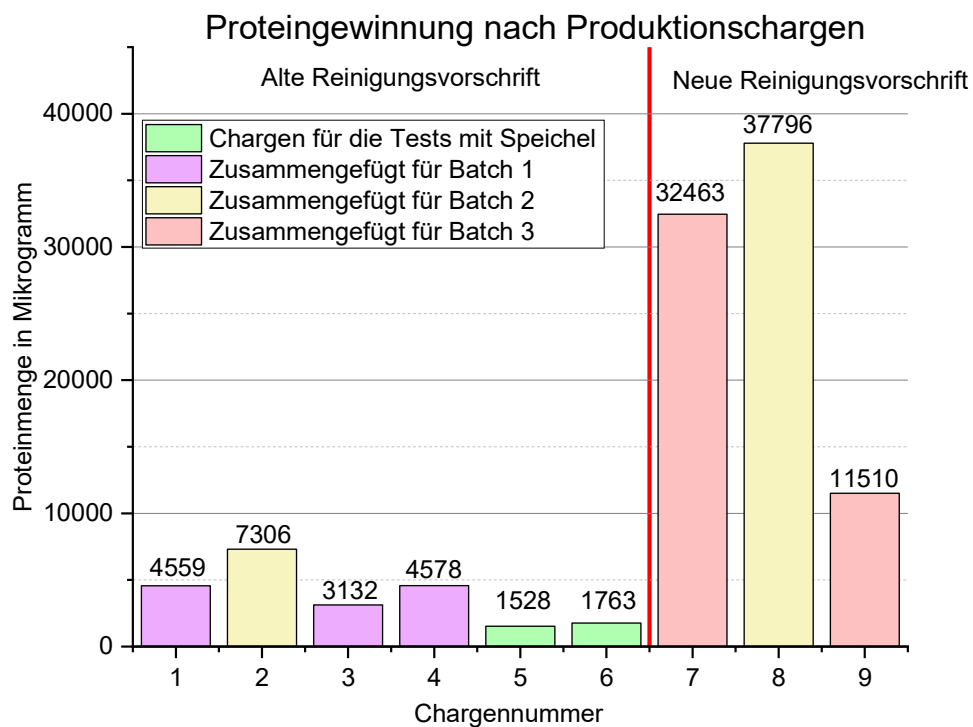
In dieser Abbildung ist die erste Messreihe der Inhibierung der  $\alpha$ -Amylasen des menschlichen Speichels durch WASI dargestellt.



**Abbildung 8 Inhibierung der  $\alpha$ -Amylase Aktivität des Speichels durch WASI mit einer Proteinkonzentration von 352  $\mu$ g/ml bei pH-Wert 5.2**

### 8.3 Abbildung der Gesamtproteingewinnung nach Chargen

In dieser Abbildung wurde die gesamte Proteinmenge pro Charge dargestellt. Zu beachten ist, dass die Menge an Lösungsmittel stark variiert und dadurch keine direkte Ableitung auf die entstehenden Konzentrationen gezogen werden kann.



**Abbildung 9 Gesamtproteinmenge nach Chargennummer**

## 8.4 Temperaturverlauf während des Backprozesses

Loder hat in ihrer Arbeit den Temperaturverlauf während des Backprozesses dokumentiert. In dieser Arbeit wurde dieser Temperaturverlauf übernommen. [21]

**Tabelle 20 Temperaturverlauf während des Backprozesses**

Zeit in Minuten	Temperaturmittelwert	Standardabweichung
1	28.83	0.111
2	28.87	0.111
3	29.23	0.496
4	30.78	1.884
5	32.90	2.889
6	37.43	5.978
7	43.80	9.699
8	50.38	11.523
9	59.48	12.140
10	68.95	10.238
11	78.45	7.647
12	86.13	5.044
13	92.32	2.647
14	96.75	1.067
15	98.23	0.568
16	98.87	0.386
17	99.25	0.269
18	99.42	0.211
19	99.50	0.200
20	99.57	0.170
21	99.57	0.170
22	99.60	0.129

## 8.5 Liste der Proben entnahmen am Rheometer im Zusammenhang mit der Temperatur

Die Tabelle zeigt die Punkte an, an denen die Proben aus dem Rheometer genommen wurden.

**Tabelle 21 Zeitpunkte der Probenentnahme**

Zeitpunkt nach Garende [min]	Temperatur [°C]	Anzahl der Probennahmen für je Standard- und Malzteig	Anzahl der Probennahmen für Teig mit WASI
0	28.8	2	2
4	30.8	2	2
5	33.1	2	2
6	36.9	2	2
7	42.4	2	2
8	48.8	2	2
9	56.9	2	2
10	65.9	2	2
11	71.8	2	2
12	85.5	2	2
14	98.1	2	0
16	100.2	2	0
21	99.8	2	0

## 8.6 Ergebnisse der Personenbefragung zu deren Essensaufnahmen

Die Personen, welche Speichelproben abgegeben haben, wurden nach der Essenaufnahme befragt. Die Ergebnisse dieser Befragung wurde im folgenden dargestellt. Das Geschlecht "m" steht hierbei für männlich und das Geschlecht "w" für weiblich.

**Tabelle 22 Ergebnisse der Personenbefragung zu deren Essensaufnahme**

Personen	Geschlecht	Essensaufnahme
A	m	Nichts gegessen
B	w	Einen Keks, danach Zähne geputzt
C	w	Eine Waffel/Donat, danach Zähne geputzt
D	w	Nichts gegessen
E	w	Zähne geputzt, danach Müsliriegel und Apfel gegessen
F	m	Butterbrezel
G	m	Nichts gegessen, Kaugummi gekaut
H	m	Brot und Spagetti gegessen

\*Person B wurde zwei Mal bezüglich der Essensaufnahmen befragt. Gegenüber der einen Person gab Sie an eine Waffel gegessen zu haben. Gegenüber der anderen Person gab Sie an einen Donat gegessen zu haben.

## 8.7 Code zum Extrahieren der CSV-Dateien

In diesem Abschnitt wurde der Code aus dem Jupyter Notebook dargestellt, der verwendet wurde, um die CSV-Dateien effizient zusammenzufügen.

```
import os
import pandas as pd
import tkinter as tk
from tkinter import filedialog

def extract_and_clean_data(file_path):
    data = pd.read_csv(file_path, delimiter=";", encoding="UTF-16", skiprows=3)
    data = data.iloc[:, 0].str.split("\t", expand=True)

    relevant_data = data.iloc[:, [2, 3, 4, 5]]
    relevant_data.columns = ['Time', 'Test Time', 'Temperature', 'Storage
Modulus']
```

```
    for col in relevant_data.columns:
        relevant_data = relevant_data[pd.to_numeric(relevant_data[col],
errors='coerce').notnull()]

    relevant_data = relevant_data.applymap(lambda x: str(x).replace('.', ','))
if isinstance(x, (int, float)) else x)

    return relevant_data

def process_and_save_to_excel(folder_path, output_file):
    writer = pd.ExcelWriter(output_file, engine='xlsxwriter')
    for filename in os.listdir(folder_path):
        if filename.endswith(".csv"):
            file_path = os.path.join(folder_path, filename)
            processed_data = extract_and_clean_data(file_path)
            processed_data.to_excel(writer,
sheet_name=os.path.splitext(filename)[0], index=False)
            writer.save()

def select_folder():
    root = tk.Tk()
    root.withdraw()
    folder_path = filedialog.askdirectory(title="Ordner auswählen")
    return folder_path

def select_file():
    root = tk.Tk()
    root.withdraw()
    file_path = filedialog.asksaveasfilename(defaultextension=".xlsx",
filetypes=[("Excel files", "*.xlsx"), ("All files", "*.*")], title="Datei zum
Speichern auswählen")
    return file_path

def main():
    folder_path = select_folder()
    output_file = select_file()
    if folder_path and output_file:
        process_and_save_to_excel(folder_path, output_file)
```

```
main()
```

## 8.8 Code zur Differenzierung der Amylasen

Hier wurde das Python-Skript dargestellt, mit dem die Aminosäureketten der Amylasen verglichen wurden.

```
import random
from Bio import pairwise2
from Bio.Align import substitution_matrices
from collections import Counter

def randomisierte_alignment_scores(seq, num_randomizations=1000): #matrix
    random_scores = []
    for _ in range(num_randomizations):
        random_seq = ".join(random.sample(seq, len(seq)))
        alignment = pairwise2.align.globalds(seq, random_seq, matrix, -10, -0.5)
        random_scores.append(alignment[0][2])
    return random_scores

def farbige_ausrichtung(align1, align2):
    farbige_seq1 = ""
    farbige_seq2 = ""
    for a, b in zip(align1, align2):
        if a == b:
            farbige_seq1 += "\033[92m" + a + "\033[0m"
            farbige_seq2 += "\033[92m" + b + "\033[0m"
        else:
            farbige_seq1 += "\033[91m" + a + "\033[0m"
            farbige_seq2 += "\033[91m" + b + "\033[0m"
    return farbige_seq1 + "\n" + farbige_seq2

def vergleiche_proteine(seq1, seq2):
    matrix = substitution_matrices.load("BLOSUM62")
    alignments = pairwise2.align.globalds(seq1, seq2, matrix, -10, -0.5)
    best_alignment = alignments[0]
```



---

```

align1, align2, score, begin, end = best_alignment

matching_bases = sum(1 for a, b in zip(align1, align2) if a == b)
prozent_übereinstimmung = (matching_bases / len(align1)) * 100

matching_positions = []
mismatching_positions_seq1 = []
mismatching_positions_seq2 = []
pos1 = pos2 = 1 # Startpositionen
for a, b in zip(align1, align2):
    if a == b:
        matching_positions.append(pos1)
        pos1 += 1
        pos2 += 1
    else:
        if a != '-':
            mismatching_positions_seq1.append(pos1)
            pos1 += 1
        if b != '-':
            mismatching_positions_seq2.append(pos2)
            pos2 += 1

kleinere_sequenz_länge = min(len(seq1), len(seq2))
print(f"Anzahl der Aminosäuren der kleineren Aminosäurenkette:
{kleinere_sequenz_länge}")
print(f"Anzahl der übereinstimmenden Punkte: {len(matching_positions)}")

print("Beste Sequenzausrichtung:")
print(farbige_ausrichtung(align1, align2))
print("\nAlignment-Score: {:.2f}".format(score))
print("Prozentuale Übereinstimmung: {:.2f}%".format(prozent_übereinstimmung))
print("\nÜbereinstimmende Positionen:", matching_positions)
print("Nicht übereinstimmende Positionen in Sequenz 1:",
mismatching_positions_seq1)

```

```
print("Nicht übereinstimmende Positionen in Sequenz 2:",  
mismatching_positions_seq2)
```

```
verteilung_seq1 = dict(sorted(Counter(seq1).items()))  
verteilung_seq2 = dict(sorted(Counter(seq2).items()))  
print("\nVerteilung der Aminosäuren in Sequenz 1:", verteilung_seq1)  
print("Verteilung der Aminosäuren in Sequenz 2:", verteilung_seq2)
```

```
if __name__ == "__main__":  
    seq1 = input("Bitte geben Sie die erste Proteinsequenz ein: ")  
    seq2 = input("Bitte geben Sie die zweite Proteinsequenz ein: ")  
    vergleiche_proteine(seq1, seq2)
```

## 8.9 Faltbeispiel der nachempfundenen Gärkammer

In diesem Bild wurde dargestellt wie die Gärkammer mittels eines Bechers nachgebaut wurde.



**Abbildung 10** Nachempfundene Gärkammer mittels eines Bechers und eines feuchten Tuchs welches mit 5 ml Wasser getränkt wurde.