

**Technische Enzyme in Backwaren –
Untersuchung der technologischen Wirkung und
Entwicklung eines Multiparameterverfahrens zum quantitativen Nachweis
mittels LC-MS/MS im Spurenbereich**

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
„doctor rerum naturalium“
(Dr. rer. nat.)
in der Wissenschaftsdisziplin „Ernährungswissenschaft“

eingereicht an der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Potsdam

von
Linda Uhr (geb. Knöfel)
Potsdam, den 15. März 2016

Online veröffentlicht auf dem
Publikationsserver der Universität Potsdam:
URN urn:nbn:de:kobv:517-opus4-96432
<http://nbn-resolving.de/urn:nbn:de:kobv:517-opus4-96432>

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|-----------|
| Inhaltsverzeichnis..... | 2 |
| Abkürzungsverzeichnis | 6 |
| Zusammenfassung..... | 10 |
| Abstract | 11 |
| 1 Einleitung und Zielstellung | 12 |
| 1.1 Technische Enzyme in der Backwarenindustrie und deren technologische Wirkung ... | 12 |
| 1.1.1 Ursachen des erforderlichen Einsatzes technischer Enzyme | 13 |
| 1.1.2 Einsatz und Synthese technischer Enzyme | 14 |
| 1.1.2.1 Amylasen..... | 15 |
| 1.1.2.2 Xylanasen | 17 |
| 1.1.2.3 Lipasen | 18 |
| 1.1.3 Rechtlicher Hintergrund und Verbraucherschutz..... | 19 |
| 1.2 Protein- und Peptidanalytik mit Massenspektrometrie | 21 |
| 1.2.1 Proteinverdau..... | 22 |
| 1.2.2 Proteinidentifikation mit MALDI-TOF-MS..... | 24 |
| 1.2.2.1 SDS-PAGE | 24 |
| 1.2.2.2 In-Gel-Verdau nach elektrophoretischer Trennung..... | 24 |
| 1.2.2.3 MALDI-TOF-MS | 25 |
| 1.2.3 Qualitative und quantitative Peptid-Bestimmung mit LC-(ESI)-MS/MS-QTRAP..... | 28 |
| 1.2.3.1 Generierung von Peptid-Ionen mittels (ESI)-MS/MS..... | 28 |
| 1.2.3.2 Auswertung der MS/MS-Daten..... | 30 |
| 1.3 Methodenvalidierung für analytische Verfahren mit Massenspektrometrie..... | 34 |
| 1.3.1 Linearität | 34 |
| 1.3.2 Wiederhol- und Laborpräzision..... | 35 |
| 1.3.3 Richtigkeit | 35 |
| 1.3.4 Nachweis- und Bestimmungsgrenze | 35 |
| 1.3.5 Spezifität/Selektivität | 35 |
| 1.3.6 Robustheit..... | 36 |
| 1.3.7 Messunsicherheit..... | 36 |
| 1.4 Zielstellung | 37 |
| 2 Material und Methoden | 38 |
| 2.1 Material..... | 38 |
| 2.2 Methoden..... | 38 |
| 2.2.1 Prüfung der technologischen Wirkung von Fungamyl und Lipase FE-01..... | 38 |
| 2.2.1.1 Herstellung der Backwaren für die Analyse | 38 |
| 2.2.1.2 Prüfung des mikrobiellen Status | 39 |
| 2.2.1.3 Bestimmung des Feuchtegehaltes..... | 40 |
| 2.2.1.4 Textur-Profil-Analyse | 40 |
| 2.2.1.5 Bestimmung der Volumenausbeute..... | 40 |
| 2.2.1.6 Prüfung der Lockerheit..... | 41 |
| 2.2.1.7 Aufnahme des Fettsäurespektrums | 41 |
| 2.2.1.8 Aufnahme des Zuckerspektrums..... | 41 |
| 2.2.1.9 Einfluss auf sensorische Parameter..... | 41 |

| | | |
|---------|--|----|
| 2.2.2 | Identifikation technischer Enzyme | 42 |
| 2.2.2.1 | SDS-PAGE | 42 |
| 2.2.2.2 | In-Gel-Verdau | 42 |
| 2.2.2.3 | MALDI-TOF-MS-Messung und Proteinidentifikation | 43 |
| 2.2.3 | SDS-PAGE zur Quantifizierung technischer Enzyme in Enzymgemischen..... | 43 |
| 2.2.4 | Herstellung von Referenzmaterialien..... | 44 |
| 2.2.4.1 | Planung und Durchführung..... | 44 |
| 2.2.4.2 | Unprozessierte Referenzmatrix - Weizenmehl | 45 |
| 2.2.4.3 | Prozessierte Referenzmatrix - Toastbrot | 47 |
| 2.2.4.4 | Prozessierte Referenzmatrix - Biskuitkeks..... | 48 |
| 2.2.5 | Nachweis technischer Enzyme mittels LC-(ESI)-MS/MS-QTRAP | 49 |
| 2.2.5.1 | Auswahl geeigneter Markerpeptide..... | 50 |
| 2.2.5.2 | Scheduled MRM-Methode | 53 |
| 2.2.5.3 | Kalibrierung | 53 |
| 2.2.5.4 | Quantifizierung mit internem Standardprotein | 54 |
| 2.2.5.5 | Quantifizierung mit Matrix-Kalibrierung | 56 |
| 2.2.5.6 | Quantifizierung mit Standardadditionsverfahren | 56 |
| 2.2.5.7 | Quantifizierung mit isopenmarkierten Peptidstandards | 57 |
| 2.2.6 | Validierung der Methode | 57 |
| 2.2.6.1 | Prüfung der Linearität | 58 |
| 2.2.6.2 | Prüfung der Wiederhol- und Laborpräzision..... | 58 |
| 2.2.6.3 | Prüfung der Richtigkeit..... | 59 |
| 2.2.6.4 | Ermittlung von Nachweis- und Bestimmungsgrenzen | 59 |
| 2.2.6.5 | Prüfung der Spezifität und Selektivität..... | 59 |
| 2.2.6.6 | Ermittlung der Messunsicherheit..... | 60 |
| 2.2.7 | Statistische Auswertung..... | 61 |
| 2.2.7.1 | Anderson-Darling-Test auf Normalverteilung..... | 61 |
| 2.2.7.2 | Ausreißertest nach Dean & Dixon | 62 |
| 2.2.7.3 | Brown-Forsythe-Test auf Homogenität der Varianzen | 62 |
| 2.2.7.4 | Fisher-Test auf Linearität..... | 63 |
| 3 | Ergebnisse und Diskussion..... | 64 |
| 3.1 | Technologische Wirkung von Fungamyl und Lipase FE-01 | 64 |
| 3.1.1 | Prüfung des mikrobiellen Status | 64 |
| 3.1.2 | Einfluss auf den Feuchtegehalt | 65 |
| 3.1.3 | Einfluss auf Textur-Profilanalyse..... | 66 |
| 3.1.4 | Einfluss auf die Volumenausbeute | 70 |
| 3.1.5 | Einfluss auf die Lockerheit | 71 |
| 3.1.6 | Einfluss auf das Fettsäurespektrum | 74 |
| 3.1.7 | Einfluss auf das Zuckerspektrum..... | 78 |
| 3.1.8 | Einfluss auf sensorische Parameter..... | 79 |
| 3.2 | Identifikation der Enzyme in Fungamyl, Amylase TXL und Lipase FE-01 | 80 |
| 3.2.1 | Aminosäuresequenzidentifikation der <i>alpha</i> -Amylase und Endo-1,4-Xylanase aus Fungamyl | 80 |
| 3.2.2 | Proteinsequenzidentifikation der Lipase aus Lipase FE-01 | 83 |

| | | |
|---------|--|-----|
| 3.2.3 | Identifikation der <i>alpha</i> -Amylase aus Amylase TXL | 86 |
| 3.3 | Ermittlung und Berechnung der Proteingehalte der technischen Enzyme Fungamyl, Amylase TXL und Lipase FE-01 | 87 |
| 3.3.1 | Ermittlung der Konzentrationen der <i>alpha</i> -Amylase und Endo-1,4-Xylanase in Fungamyl mit SDS-PAGE und BSA-Standard | 87 |
| 3.3.2 | Berechnung des Lipasegehaltes in Lipase FE-01 sowie des <i>alpha</i> -Amylasegehaltes in Amylase TXL..... | 87 |
| 3.4 | Referenzmaterialien – Beurteilung nach dem Leitfaden für die Entwicklung von Referenzmaterialien..... | 88 |
| 3.5 | Nachweis der technischen Enzyme Fungamyl, Amylase TXL und Lipase FE-01 mittels LC-MS/MS-QTRAP..... | 90 |
| 3.5.1 | Auswahl der Markerpeptide für die MRM-Messung..... | 91 |
| 3.5.2 | Chromatographische Trennung der Markerpeptide..... | 93 |
| 3.5.3 | Prüfung der Massenübergänge der Markerpeptide | 96 |
| 3.5.4 | Abgrenzung zu natürlich vorkommenden Enzymen bzw. anderen Proteinen..... | 101 |
| 3.5.5 | Quantitative Bestimmung der technischen Enzyme..... | 104 |
| 3.6 | Validierung der LC-MS/MS-Multimethode zum quantitativen Nachweis der technischen Enzyme Fungamyl, Amylase TXL und Lipase FE-01 | 104 |
| 3.6.1 | Prüfung der Linearität | 105 |
| 3.6.2 | Prüfung der Wiederhol- und Laborpräzision..... | 107 |
| 3.6.3 | Prüfung der Richtigkeit (Wiederfindungsrate)..... | 108 |
| 3.6.3.1 | WFR nach Trypsin-Verdau über Nacht..... | 109 |
| 3.6.3.2 | WFR nach Trypsin-Verdau mit Temperaturprogramm | 112 |
| 3.6.3.3 | WFR nach Quantifizierung mit Matrix-Kalibrierung | 114 |
| 3.6.3.4 | WFR nach Quantifizierung mit Standardaddition..... | 116 |
| 3.6.3.5 | WFR nach Quantifizierung mit isotopenmarkierten Peptidstandards | 117 |
| 3.6.4 | Ermittlung der Nachweis- und Bestimmungsgrenzen verschiedener Matrizes | 119 |
| 3.6.5 | Spezifität und Selektivität der Messmethode..... | 120 |
| 3.6.6 | Ermittlung der Messunsicherheit der Methode | 122 |
| 4 | Schlussfolgerungen | 125 |
| 4.1 | Technologische Wirkung von Fungamyl und Lipase FE-01 | 125 |
| 4.2 | Identifikation und Quantifizierung der technischen Enzyme Fungamyl, Lipase FE-01 und Amylase TXL..... | 127 |
| | Literaturverzeichnis..... | 130 |
| | Abbildungsverzeichnis | 139 |
| | Tabellenverzeichnis | 141 |
| Anlage | | 142 |
| A1 | Lebenslauf | 142 |
| A2 | Veröffentlichungen der Dissertation | 143 |
| A3 | Auflistung verwendeter Chemikalien, Puffer, Lösungen sowie Geräte und Software | 144 |
| A4 | Daten zur technologischen Wirkung technischer Enzyme | 148 |
| A5 | Daten zur Identifikation technischer Enzyme | 156 |
| A6 | Daten zur Quantifizierung des Proteingehaltes über eine BSA-Standardreihe | 156 |
| A7 | Daten zu Referenzmaterialien | 158 |

| | | |
|-----------|---|------------|
| A8 | Daten zum qualitativen und quantitativen Nachweis technischer Enzyme mittels LC-MS/MS-QTRAP..... | 161 |
| A9 | Daten zur Validierung..... | 165 |
| | Abbildungsverzeichnis Anlage..... | 177 |
| | Tabellenverzeichnis Anlage..... | 178 |
| | Eidesstattliche Erklärung | 179 |
| | Danksagung | 180 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-----------------|---|
| AAI | <i>alpha</i> -Amylase-Inhibitoren |
| ACN | Acetonitril |
| ADA | Alanindiacetat |
| ArgC | Arginin-C-Endopeptidase |
| Art. | Artikel |
| Asp-N | Aspargin-N |
| ASU | Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren |
| ATI | <i>alpha</i> -Amylase-Trypsin-Inhibitoren |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| BAM | Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung |
| BG | Bestimmungsgrenze |
| BIPM | Internationales Büro für Maß und Gewicht (franz. <i>Bureau International des Poids et Mesures</i>) |
| BLAST | Suchprogramm zur Gegenüberstellung von DNA- oder Proteinsequenzen (engl. <i>Basic Local Alignment Search Tool</i>) |
| BNPS-Skatol | 3-Bromo-3-methyl-2-(2-nitrophenylthio)-3H-indol |
| BS | Bernsteinsäure |
| BSA | Rinderserumalbumin (engl. <i>Bovine serum albumin</i>) |
| C | Carbamidomethyl |
| CE | Kollisionsenergie (engl. <i>Collision Energy</i>) |
| CHCA | α -Cyano-4-hydroxymethylsäure |
| CO ₂ | Kohlenstoffdioxid |
| cps | Flächeneinheiten (engl. <i>counts per seconds</i>) |
| Cys | Cystein |
| DAkKS | Deutsche Akkreditierungsstelle |
| 2-DE | zweidimensionale Gelelektrophorese (engl. <i>Two-dimensional Gel Electrophoresis</i>) |
| dest. Wasser | Destilliertes Wasser |
| df | Freiheitsgrade (engl. <i>degrees of freedom</i>) |
| DHB | 2,5-Dihydroxybenzoesäure |
| DHBs | 2,5-Dihydroxybenzoesäure + 10 % 5-Methoxysalicylsäure |
| DiGE | Differenz-Gelelektrophorese (engl. <i>Difference Gel Electrophoresis</i>) |
| DIN | Deutsches Institut für Normung |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| DP | Spannung für Molekülion (engl. <i>Declustering Potential</i>) |
| DTT | 1,4-Dithiothreitol |
| EG | Europäische Gemeinschaft |
| ELISA | Antikörperbasiertes Nachweisverfahren (engl. <i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>) |
| EN | Europäische Norm |
| Engl. | Englisch |
| EPI | Erweiterter Produktionenscan (engl. <i>Enhanced Product Ion Scan</i>) |
| ER | Erweiterte Auflösung (engl. <i>Enhanced Resolution</i>) |

| | |
|----------------|--|
| ESI | Elektronenspray-Ionisation (engl. <i>Electrospray Ionization</i>) |
| ESI-MS/MS | Elektronenspray-Ionisation-Tandemmassenspektrometrie (engl. <i>Electrospray ionization-Tandem mass spectrometry</i>) |
| ESI-TRAP | Elektronenspray-Ionisation-Ionenfalle (engl. <i>Electrospray Ionization-Ion trap</i>) |
| EU | Europäische Union |
| e. V. | eingetragener Verein |
| F | Fragment |
| FID | Flammenionisationsdetektor |
| Franz. | Französisch |
| FS | Fettsäuren |
| FV | Feuchteverlust |
| FWHM | Halbwertsbreite (eng. <i>full width at half maximum</i>) |
| GC-FID | Gaschromatograph-Flammenionisationsdetektor |
| Glu-C | <i>Staphylococcus aureus</i> Protease V8 |
| GUM | Leitfaden für die Angabe der Unsicherheit beim Messen (engl. <i>Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement</i>) |
| HCCA | α -cyano-4-Hydroxycinnamsäure (engl. <i>α-Cyano-4-hydroxycinnamic acid</i>) |
| HCl | Chlorwasserstoffsäure (engl. <i>Hydrochloric acid</i>) |
| HPLC | Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (engl. <i>High Performance Liquid Chromatography</i>) |
| IAA | Iodacetamid |
| IDA | Informationsabhängige Aufnahme (engl. <i>Information Dependent Acquisition</i>) |
| IEC | Internationale Elektrotechnische Kommission (engl. <i>International Electrotechnical Commission</i>) |
| IFCC | Internationale Organisation der klinischen Laboratoriumswissenschaften (engl. <i>International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine</i>) |
| ISO | Internationale Organization für Normung (engl. <i>International Organization for Standardization</i>) |
| ISTD | Interner Standard |
| IV | Ionenverhältnis |
| KbE | Koloniebildende Einheit |
| KL | Konzentrationslevel |
| KOH | Kaliumhydroxid-Lösung |
| Konz. | Konzentration |
| KP | Kalibrierpunkt |
| LC-MS/MS | Flüssigchromatographie-Tandemmassenspektrometrie (engl. <i>Liquid-Chromatography-Tandem mass spectrometry</i>) |
| LC-(ESI)-MS/MS | Flüssigchromatographie-(Elektronenspray-Ionisation)-Tandemmassenspektrometrie (engl. <i>Liquid-Chromatography-(Electrospray Ionization)-Tandem mass spectrometry</i>) |
| LC-MS/MS-QTRAP | Flüssigchromatographie-Tandemmassenspektrometrie-Ionenfalle (engl. <i>Liquid-Chromatography-Tandem mass spectrometry-Ion trap</i>) |
| LM | Lösungsmittel |
| LMIV | Lebensmittelinformationsverordnung |

| | |
|----------------|---|
| LOD | Nachweisgrenze (engl. <i>limit of detection</i>) |
| LOQ | Bestimmungsgrenze (engl. <i>limit of quantitation</i>) |
| LysC | Lysin-C-Endopeptidase |
| MALDI | Matrix-unterstützte Laserdesorption/Ionisation (engl. <i>Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization</i>) |
| MALDI-TOF-MS | Matrix-unterstützte Laserdesorption-/Ionisation und Massenspektrometrie mit Flugzeitanalysator (engl. <i>Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization-time of flight-mass spectrometer</i>) |
| Met | Methionin |
| MRM | Multifragmentationenaufnahme (engl. <i>Multiple Reaction Monitoring</i>) |
| MW | Mittelwert |
| MS | Massenspektrometrie (engl. <i>mass spectrometry</i>) |
| MS/MS | Tandemmassenspektrometrie (engl. <i>Tandem mass spectrometry</i>) |
| m/z | Masse-zu-Ladungsverhältnis (engl. <i>mass-to-charge Ratio</i>) |
| MÜ | Massenübergang |
| N | Anzahl der Messungen (engl. <i>number</i>) |
| NG | Nachweisgrenze |
| Nr. | Nummer |
| n.n. | nicht nachweisbar |
| OIML | Internationale Organisation für das gesetzliche Messwesen (franz. <i>Organisation Internationale de Métrologie Légale</i>) |
| PCR | Polymerasekettenreaktion (engl. <i>Polymerase Chain Reaction</i>) |
| PF | Peakfläche |
| PG | Prüfgröße |
| ppm | Millionstel (engl. <i>parts per million</i>) |
| PW | Prüfwert |
| qPCR | quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (engl. <i>real-time quantitative Polymerase Chain Reaction</i>) |
| RNA | Ribonukleinsäure (engl. <i>ribonucleic acid</i>) |
| R | Auflösung (engl. <i>resolution</i>) |
| R ² | Bestimmtheitsmaß |
| RM | Referenzmaterialien |
| RT | Retentionszeit |
| RSD | relative Standardabweichung |
| SA | Sinapinsäure |
| SD | Standardabweichung (engl. <i>standard deviation</i>) |
| SDS | Natriumdodecylsulfat (engl. <i>sodium dodecyl sulfate</i>) |
| SDS-PAGE | Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (engl. <i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>) |
| sec. | Sekunden (engl. <i>seconds</i>) |
| S/N | Signal-Rausch-Verhältnis (engl. <i>Signal-to-noise Ratio</i>) |
| SPE | Festphasenextraktion (engl. <i>Solid Phase Extraction</i>) |
| SL | Stammlösung |
| TAXI | Triticum aestivum Xylanaseinhibitor |

| | |
|-------|--|
| TCEP | Tris-(2-carboxyethyl)phosphine, Hydrochloride |
| TEMED | N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin |
| TFA | Trifluoressigsäure |
| TLXI | Thaumatococcus-ähnlicher Xylanaseinhibitor (engl. <i>thaumatin-like xylanase inhibitor</i>) |
| TP | Temperaturprogramm |
| TPA | Texturprofilanalyse |
| TV | Trocknungsverlust |
| U | erweiterte Messunsicherheit |
| Vers. | Version |
| VL | Verdünnungslösung |
| VO | Verordnung |
| WFR | Wiederfindungsrate |
| XIP | Xylanaseinhibitor Protein (engl. <i>xylanase inhibitor protein</i>) |
| z | Ladung |
| z.B. | zum Beispiel |

Zusammenfassung

Die sensorisch einwandfreie, konstant gute Qualität von Backprodukten, die beim Verbraucher einen hohen Stellenwert hat, wird maßgeblich durch den Gehalt endogener Getreideenzyme beeinflusst. Seit dem Auftreten züchtungsbedingter Enzymdefizite ist der Einsatz technischer Enzyme zur Gewährleistung dieser geforderten Qualität eine feste Größe in der Backwarenindustrie. Lebensmittelrechtlich werden technische Enzyme nicht als Zutat betrachtet, da sie theoretisch während des Backprozesses umgesetzt werden und im Endprodukt keine technologische Wirkung mehr zeigen. Vor allem in gebackenen Produkten bedarf es der Prüfung, dass die eingesetzten technischen Enzyme nicht mehr als Zutat vorliegen und sich somit einer potentiellen Deklarationspflicht entziehen. Zur Gewährleistung der Wirtschaftlichkeit muss der quantitative Einsatz technischer Enzyme in der Backwarenindustrie gesteuert werden, um optimale Effekte zu erzielen und Kosten zu sparen. Ziel dieser Arbeit war daher die Entwicklung eines Analysenverfahrens, das den simultanen Nachweis verschiedener technischer Enzyme und deren Quantifizierung im Spurenbereich auch in gebackenen Produkten ermöglicht.

Für die Einschätzung der Wirkung der technischen Enzyme Fungamyl (Novozymes), Amylase TXL (ASA Spezialenzyme GmbH) sowie Lipase FE-01 (ASA Spezialenzyme GmbH) wurden Backversuche durchgeführt, die zeigten, dass Fungamyl und Amylase TXL zu einer verbesserten Brotqualität (Volumenausbeute, Feuchtegehalt, Sensorik) beitragen. Die Zugabe der Lipase FE-01 führte zu einer vermehrten Bildung freier Fettsäuren und wirkte sich negativ auf die sensorische Brotqualität aus. Dieser bisher nicht beschriebene Effekt konnte auf die Nutzung eines Spezialöls als Backzutat zurückgeführt werden, welches ausschließlich aus gesättigten Fettsäuren besteht. Dies bestätigt die Bedeutung der Auswahl eines geeigneten Fettes beim Zusatz technischer Lipase zum Backprozess.

Um die in Fungamyl und Lipase FE-01 enthaltenen Enzyme zu identifizieren, wurden SDS-PAGE und anschließender In-Gel-Verdau angewendet um die Analyse proteolytisch gespaltener Proteine mit MALDI-TOF-MS zu ermöglichen. Es konnte gezeigt werden, dass Fungamyl ein Gemisch aus 9,8 % *alpha*-Amylase (*Aspergillus oryzae*) und 5,2 % Endo-1,4-Xylanase (*Thermomyces lanuginosus*) enthält. Lipase FE-01 besteht aus der Lipase (*Thermomyces lanuginosus*), Amylase TXL wurde als *alpha*-Amylase (*Aspergillus oryzae*) identifiziert.

Zur Analyse der technischen Enzyme in Backwaren wurde aufgrund seiner Robustheit und Sensitivität das Verfahren der LC-MS/MS gewählt. Die Entwicklung einer solchen Methode zur Detektion spezifischer Peptide ermöglichte den qualitativen Nachweis der 3 Enzyme *alpha*-Amylase (*Aspergillus oryzae*), Endo-1,4-Xylanase (*Thermomyces lanuginosus*) und Lipase (*Thermomyces lanuginosus*). Durch eine lineare Kalibrierung aus synthetisch hergestellten Peptiden unter Einbeziehung eines Protein-Internen-Standards sowie isotonenmarkierter Peptidstandards erfolgte darüber hinaus die quantitative Bestimmung in selbst hergestellten Referenzmaterialien (Weizenmehl, Toastbrot und Biskuitkeks). In weniger als 20 Minuten Messzeit kann das Enzym *alpha*-Amylase ab einer Konzentration von 2,58 mg/kg (Mehl, Keks), bzw. 7,61 mg/kg (Brot) quantitativ nachgewiesen werden. Zeitgleich können die Enzyme Endo-1,4-Xylanase ab einer Konzentration von 7,75 mg/kg (Brot), 3,64 mg/kg (Keks) bzw. 15,60 mg/kg (Mehl) sowie Lipase ab einer Konzentration von 1,26 mg/kg (Mehl, Keks), bzw. 2,68 mg/kg (Brot) quantifiziert werden. Die Methode wurde nach allgemein verwendeten Richtlinien im Zuge einer Validierung statistisch geprüft und lieferte sehr robuste und reproduzierbare quantitative Werte mit Wiederfindungsraten zwischen 50 % und 122 %. Das primäre Ziel dieser Arbeit, die Entwicklung eines quantitativen Multiparameterverfahrens zum Nachweis technischer Enzyme in Backwaren, wurde somit erfolgreich umgesetzt.

Abstract

The consistent and good quality of baked products, which is of great importance for consumers, is significantly influenced by endogenous grain enzymes. Since cereal breeding techniques have caused deficits of endogenous enzymes, the use of technical enzyme alternatives became a routine process in the bakery industry to ensure the expected quality. According to food law, technical enzymes are not listed as ingredients, because theoretically, enzymes are destroyed during the baking process so that there is no more technological activity in the end product. To prevent a potentially required declaration, it has to be verified that technical enzymes are no ingredients in baking products. To secure economic viability, the quantitative application of technical enzymes should be regulated to gain optimal effects and save costs. Therefore, the aim of this thesis was the development of a quantitative analytical method with the potential to analyze several technical enzymes simultaneously and sensitively (ppm concentration) quantify them in baking products.

The effects of the use of the technical enzymes Fungamyl (Novozymes), Amylase TXL (ASA Spezialenzyme GmbH) and Lipase FE-01 (ASA Spezialenzyme GmbH) were monitored during baking experiments. The application of Fungamyl and Amylase TXL resulted in a perfect bread quality (high volume, good bread humidity, good sensory grading). The addition of Lipase FE-01 led to an increased release of free fatty acids, resulting in bread with a bad sensory quality. Reason for that previously not described negative effect is the use of an oil consisting only of saturates fatty acids as a baking ingredient. Thereby the importance of the choice of fat as a baking ingredient was demonstrated and confirmed.

To identify the enzymes contained in the technical enzymes Fungamyl and Lipase FE-01, SDS-PAGE and in-gel digestion were applied, enabling the analysis of proteolytically splitted proteins by MALDI-TOF-MS. It was shown that Fungamyl contains 9.8 % *alpha*-Amylase (*Aspergillus oryzae*) and 5.2 % Endo-1,4-Xylanase (*Thermomyces lanuginosus*). Lipase FE-01 consists of Lipase (*Thermomyces lanuginosus*) and Amylase TXL could be qualified as *alpha*-Amylase (*Aspergillus oryzae*).

Based on its robustness and sensitivity LC/MS/MS was the analytical method of choice. The development of a specific LC/MS/MS method capable of detecting characteristic peptides, allowed for the qualitative determination of the enzymes *alpha*-Amylase (*Aspergillus oryzae*), Endo-1,4-Xylanase (*Thermomyces lanuginosus*) and Lipase (*Thermomyces lanuginosus*). Quantification of self-made reference material (wheat flour, bread and cookies) was performed by linear calibration with synthetically produced peptide standards and the use of a protein internal standard as well as isotopically labeled peptide standards. Less than 20 minutes are necessary to quantify *alpha*-Amylase at a minimum concentration of 2.58 mg/kg (flour, cookies) and 7.61 mg/kg (bread). Simultaneously the enzyme Endo-1,4-Xylanase can be quantified at concentrations as low as 3.64 mg/kg (cookies), 7.75 mg/kg (bread) and 15.60 mg/kg (flour) as well as the enzyme Lipase at a minimum concentration of 1.26 mg/kg (flour, cookies) and 2.68 mg/kg (bread).

Finally the method was validated in accordance with generally accepted guidelines. It was shown that the method leads to very stable and reproducible quantitative results for the three tested enzymes with recovery rates between 50 % and 122 %. The primary aim of this thesis, developing a quantitative multi parameter method for analyzing technical enzymes in baking products, was successfully implemented.

1 Einleitung und Zielstellung

1.1 Technische Enzyme in der Backwarenindustrie und deren technologische Wirkung

Enzyme finden heutzutage aufgrund ihres technisch vorteilhaften Nutzens in den unterschiedlichsten Bereichen Anwendung und werden daher als „technische Enzyme“ bezeichnet. Haupteinsatzgebiete sind sowohl die Industrie als auch der medizinische Bereich. Im Industriesektor werden Enzyme vor allem in der Biotechnologie bei der Gewinnung von Biokraftstoffen verwendet, sind aber auch wichtiger Synthesezusatz bei der Waschmittelproduktion sowie der Lebensmittel- und Futtermittelproduktion (Tabelle 1). Im medizinischen Sektor dienen Enzyme sowohl der Krankheitsdiagnose (Glukose- oder Alkoholbestimmung) als auch der Herstellung von Medikamenten [1]. Der Haupteinsatzort technischer Enzyme ist die Lebensmittelindustrie.

Tabelle 1: Einsatzgebiete technischer Enzyme in der Industrie [1, 2]

| Einsatzgebiet | Enzyme | Wirkungsweise |
|--|---|--|
| Stärkeverarbeitung | <i>alpha</i> -Amylasen, <i>beta</i> -Amylasen | Stärkehydrolyse |
| Käseproduktion | Proteasen | Milchgerinnung |
| Brennereiindustrie | <i>alpha</i> -Amylasen | Stärkeverzuckerung |
| Brauindustrie | <i>beta</i> -Glucanasen, <i>alpha</i> -Amylasen | Hydrolyse von Glucanen und Proteinen |
| Öl- und Margarineindustrie | Lipasen | Fettspaltung, Umesterung |
| Frucht- und Gemüsesaftindustrie | Pektinasen, <i>alpha</i> -Amylasen | Hydrolyse der Pektine und Stärke |
| Backwarenherstellung | <i>alpha</i> -Amylasen, Xylanasen, Lipasen, Proteasen, Pentosanasen | Hydrolyse von Mehl- und Teiginhaltsstoffen |
| Milchverarbeitungsindustrie | Laktasen, Lipasen | Abbau von Milchzucker und Fetten |
| Lederindustrie | Proteasen | Weichen, Enthaarung und Beizen der Leder |
| Textilindustrie | <i>alpha</i> -Amylasen | Stärkehydrolyse |
| Waschmittel | Proteasen, Lipasen | Hydrolyse von Proteinen und Fetten |

Enzyme werden durch Extraktion aus pflanzlichen Produkten, wie zum Beispiel Obst und Getreide (z.B. Weizenarten mit hohem Enzymgehalt) oder aus tierischen Organen, hauptsächlich Kälbermägen, gewonnen [3]. Für optimale Produktausbeuten gewinnt die Synthese technischer Enzyme durch gentechnisch veränderte Mikroorganismen an Bedeutung [4]. Die Synthese der technischen Enzyme wird hierbei mit Bakterien- oder Schimmelpilzstämmen (hauptsächlich *Aspergillus*- oder *Trichoderma*-Arten) in Rührkesseln bei optimalen Temperaturbedingungen und pH-Werten durchgeführt. Nach der Synthese erfolgen Reinigungs- und Konzentrierungsschritte, sodass die technischen Enzyme nach Trocknung in Pulverform oder in konzentrierten und stabilisierten Lösungen für den industriellen Einsatz zur Verfügung stehen.

1.1.1 Ursachen des erforderlichen Einsatzes technischer Enzyme

Die Eigenschaften von Backerzeugnissen werden primär durch die Qualität des Rohstoffes Getreide bestimmt. Hierbei ist der Begriff der Rohstoffqualität ein komplexer Begriff, der je nach Nutzungsbereich (Landwirtschaft, Mühlen, Backwarenindustrie) unterschiedlich ausgelegt wird. Es gibt ausgewählte Prüfkriterien, die dem Anwender Aussage darüber geben, für die Herstellung welcher Backerzeugnisse (z.B. Brote, Kekse, Futtermittel) das Getreide eingesetzt werden sollte. Die wichtigsten Prüfkriterien sind der Proteingehalt sowie die Proteinqualität und die Stärke- und Enzymaktivität. Mit chemischen Standardmethoden (nach Kjeldahl bzw. Dumas) wird die Menge des im Mehlkörper vorhandenen Proteins bestimmt. In der Tendenz wirken sich steigende Proteingehalte positiv auf das Backverhalten aus. Der Sedimentationswert (nach Zeleny), welcher als Kriterium für die Eiweißqualität herangezogen wird, gibt Auskunft über die Quellfähigkeit des Proteins und wird über das Volumen des gequollenen Sediments einer Mehlsuspension in einer vorbestimmten Zeit ermittelt. Der Wert macht Voraussagen über Teigstand, Gashaltevermögen und Volumenausbeute möglich und korreliert meist positiv mit Backvolumen und Proteingehalt. Die Stärke- und Enzymaktivität wird über die Fallzahlmethode nach Hagberg geprüft, indem die Verflüssigung des Stärkegels durch die *alpha*-Amylase im Mehl nach Kochen einer wässrigen Mehlsuspension gemessen wird. Während Weizenmehle mit mittleren Fallzahlen (230-280 s) gute Qualitätseigenschaften (elastische, gutgeportete Gebäckkrume, ausreichende Triebkraft) besitzen, führen Mehle mit Fallzahlen kleiner als 200 s zu unelastischen Broten mit feuchter Krume (feuchtbackend) und erhöhter Triebkraft. In Analogie werden bei Verwendung von Weizenmehlen mit hohen Fallzahlen (> 300 s) Brote mit einer trockenen Krume sowie einem zu geringen Brotvolumen und einer geringen Triebkraft produziert. Die Fallzahl gibt abschließend Auskunft über die Widerstandsfähigkeit verkleisterter Stärke gegenüber Enzymabbau sowie die Aktivität stärkeabbauender Enzyme (Amylasen). Da auch die Stärkeschädigung durch Auswuchs zu niedrigen Fallzahlen führen kann, ist die Fallzahl nur ein Indiz für die Stärke- und Enzymaktivität. Bei gleichzeitiger Anwesenheit von guter Kleberqualität können auch Mehle mit niedrigen Fallzahlen für gute Backprodukte verwendet werden.

Abschließend kann festgehalten werden, dass zum Backprozess verwendeter Weizen einen hohen Proteingehalt und eine stabile Fallzahl benötigt [3].

Schwankende Umweltbedingungen zeigen Auswirkungen sowohl auf den Ertrag der Getreidepflanze als auch auf die Biosynthese der Stärke und deren Eigenschaften. Die wichtigsten Umwelteinflüsse sind Temperatur, Tageslänge, Lichtintensität, CO₂-Konzentration, Niederschlagsmenge sowie die Zusammensetzung des Bodens [5]. So führt z. B. Trockenheit zu einer verkürzten Kornfüllungsphase und einer damit einhergehenden geringeren Stärkeeinlagerung. Gleichzeitig vorhandene hohe Temperaturen verstärken diesen Effekt [6].

Weiterhin wirkt sich der Reifegrad zum Zeitpunkt der Ernte auf die Zusammensetzung des Getreidekorns aus. Während der Keimung kommt es in Weizenkörnern durch de-novo-Synthese in den Aleuronzellen zu einer Steigerung der *alpha*-Amylase-Aktivität [7, 8]. Die Aktivität der *beta*-Amylasen wird jedoch von der Keimung nicht beeinflusst.

Da die Zusammensetzung des Getreidekorns aufgrund von Umweltbedingungen sowie Entwicklungen im Prozess des Reifens variiert, muss diese bei der Nutzung des Getreides für die Backwarenindustrie beachtet werden.

Zusätzlich zu den schwankenden Umweltbedingungen beeinflussen züchterische Ziele die Zusammensetzung des Getreidekorns. Auch hier sind Ziele einer optimalen Rohstoffqualität formuliert, welche jedoch teilweise von denen der Backwarenindustrie abweichen. Die Entwicklung der internationalen Weizenzüchtung in den letzten Jahren führte dazu, dass der Fokus der Forschung der Weizenkultivierung auf hohe Erträge sowie einen hohen Kornproteingehalt, erhöhte Krankheitsresistenz, Widerstandsfähigkeit gegen Klimaänderungen, Toleranz gegenüber sauren Böden und Dürreanpassung gelegt wurde. Eine Optimierung der Kornqualität hinsichtlich verbesserter Backbedingungen (hoher Proteingehalt, stabile Fallzahlen) wurde nicht betrachtet [3, 9, 10]. Vor allem der hohe Proteingehalt führt zu Problemen im Backprozess. Ein Zusammenhang zwischen hohem Proteingehalt und hohen Fallzahlen als auch verminderten Stärkegehalten wurden beobachtet [3, 11, 12]. Hierbei konnte gezeigt werden, dass bei einem Anstieg des Proteingehaltes in Weizen der Anteil an Speicherproteinen steigt, der Anteil löslicher Proteine (u.a. Enzyme) jedoch sinkt [3]. Die gemessenen hohen Fallzahlen können daher auf eine verringerte Enzymaktivität zurückgeführt werden. Der hohe Proteingehalt führt aufgrund der Zusammenlagerung von Stärke und Protein weiterhin zu einer limitierten Wasseranlagerung im Mehlkörper [3]. Zu feste und kompakte Teige, eine zu nasse Brotkruste mit Tendenz zu starker Verkleisterung sowie eine erhöhte Rate von Stärkeretrogradation sind die Folgen [13–15].

Die aufgrund von Umweltbedingungen schwankenden sowie durch züchtungsbedingte Veränderungen reduzierten endogenen Enzymaktivitäten müssen ausgeglichen werden um dennoch optimale Backeigenschaften zu erzielen. Nur durch Zugabe technischer Enzyme während des Backprozesses können bei der Verwendung von Mehlen mit endogenem Enzymmangel stabile Fallzahlen erreicht werden und damit Backprodukte produziert werden, die Verbraucher ansprechende Eigenschaften (Volumen, Lockerheit, Krustenfärbung) besitzen [1, 16].

1.1.2 Einsatz und Synthese technischer Enzyme

Der Konsument stellt heutzutage sehr hohe Ansprüche an die Qualität der Lebensmittel. Vor allem im Brot- und Backwarenbereich hat der Verbraucher eine hohe Erwartungshaltung bezüglich der Haltbarkeit sowie der Frischhaltekriterien, welche durch lang anhaltende Feuchte und Elastizität im Brot charakterisiert sind. Weiterhin werden eine konstante Form und Größe des Backproduktes erwartet. Eine Zugabe von Enzymen zum Mehl ist im Rahmen der industriellen Fertigung üblich [17]. Hauptsächlich verwendet werden dabei Amylasen, Xylanasen und Oxidasen (Tabelle 2), die die Teigstabilität und -flexibilität sowie die Krumenstruktur und -textur und den Ofentrieb positiv beeinflussen [16]. Weiterhin gewinnt der Einsatz von Lipasen immer mehr Bedeutung in der Backwarenindustrie [18].

Tabelle 2: Anwendung und Wirksamkeit technischer Enzyme in der Backwarenindustrie (Backprodukte und Snacks) [16, 19]

| Anwendung | Vorteile | Enzyme |
|---------------------------------|---|------------------------------------|
| Haltbarkeitsverlängerung | Verlängerung der Haltbarkeit und Verbesserung der Qualität durch die Erhaltung von Weichheit, Elastizität und Feuchte | Exo- und Endoamylasen Xylanasen |
| Teigbereitung | Sicherung eines einheitlich guten Brotvolumens sowie guter Teighandhabungseigenschaften | Xylanasen |
| Mehlanpassung | Sicherung einer einheitlichen Hefefermentierung | Endoamylasen |
| Teigstärkung | Erhöhtes Volumen, verfeinerte Kruste sowie Verbesserung der Robustheit gegenüber der Teigbeanspruchung während der Verarbeitung; Emulgatorersatz | Lipasen, brotspezifisch |
| Glutenstärkung | Verbessertes Volumen sowie Robustheit in Teigverarbeitung; Ersatz von Oxidationsmitteln wie Bromat und Alanindiacetat (ADA) | Oxidasen |
| Acrylamidprävention | Verringerte Bildung von Acrylamid während der Maillard-Reaktion | Asparaginasen |

1.1.2.1 Amylasen

Stärke ist ausschließlich aus *alpha*-Glucose-Einheiten aufgebaut, welche über *alpha*-1,4- oder *alpha*-1,6-glycosidische Bindungen miteinander verknüpft sind. Die gebildeten hochmolekularen Verbindungen werden als Amylose (lineares Polymer aus *alpha*-1,4-glycosidischen Bindungen) und Amylopektin (Polymer aus *alpha*-1,4- und *alpha*-1,6-glycosidischen Bindungen) bezeichnet. Der Anteil von Amylose an der Stärke macht 15-25 %, der Anteil von Amylopektin 75-85 % aus. Amylasen sind in der Lage Stärke zu hydrolysieren und werden in *alpha*-, *beta*- und *gamma*-Amylasen unterteilt. Nachfolgend werden *alpha*- und *beta*-Amylasen näher erläutert, da *gamma*-Amylasen im Backprozess keine entscheidende Rolle spielen.

Alpha-Amylasen katalysieren die Hydrolyse der Stärke in Amylose und Amylopektin endogen an der *alpha*-1,4-glycosidischen Bindung (Abbildung 1). Neben einem Rest der Amylopektinstruktur werden als Produkte Dextrine und Di- und Trisaccharide freigesetzt, welche mit *beta*-Amylasen und weiteren Enzymen zu Maltose und Glukose abgebaut werden [15].

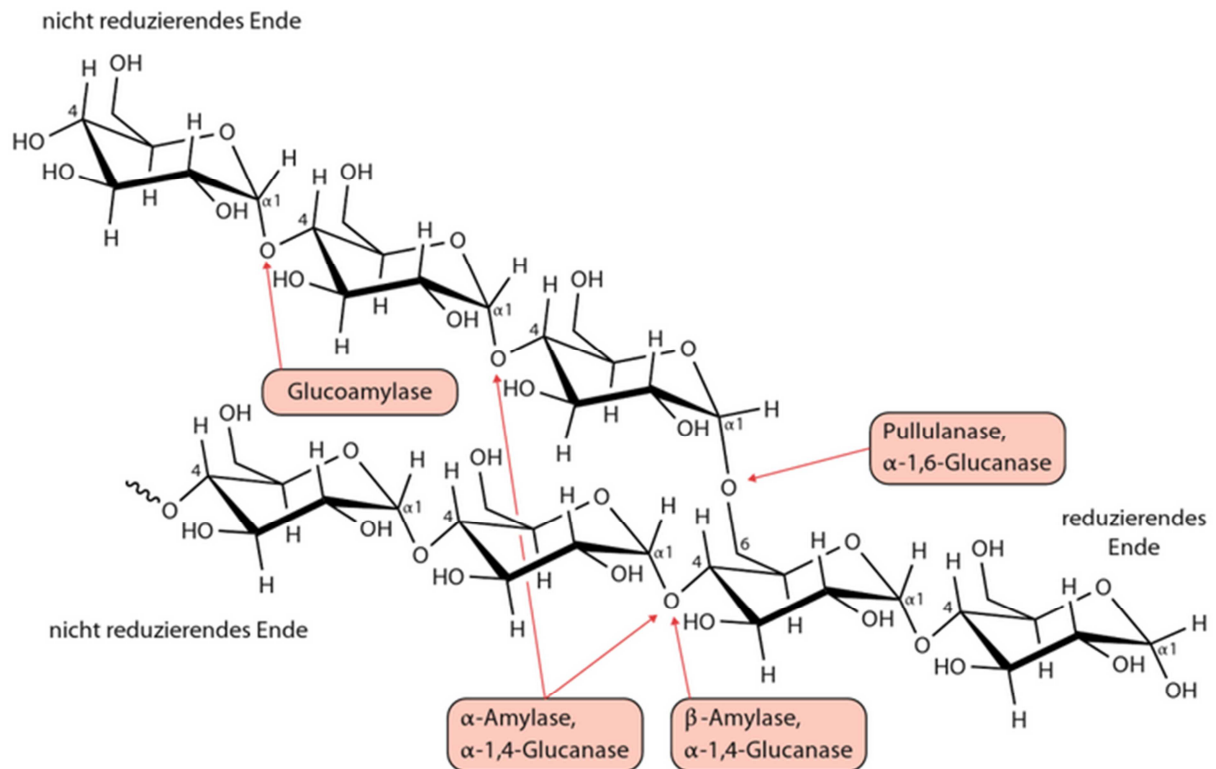


Abbildung 1: Angriffspunkte der Stärke-abbauenden Enzyme [20]

Während der Entwicklung des Weizenkorns ist die *alpha*-Amylase hauptsächlich im Perikarp lokalisiert und Aktivitätsminderungen während der Kornentwicklung sind kaum nachweisbar [3]. Weiterhin sind geringe Mengen an *alpha*-Amylase in den nativen Körnern vorhanden [3].

Die ebenso im Korn vorhandenen, akkumulierenden *alpha*-Amylase-Inhibitoren (AAI) und *alpha*-Amylase-Trypsin-Inhibitoren (ATI) bilden Komplexe mit *alpha*-Amylasen und Trypsin [21]. Im Vergleich zu anderen inhibitorisch wirkenden Proteinen hemmen sie dabei im Komplex nicht die Aktivität der endogenen Enzyme [22]. Es wird davon berichtet, dass AAI und ATI als vorherrschende Allergene des Bäckerasthmas sowie als Auslöser einer Allergie auf Nahrungsmittel mit Weizenbasis fungieren [23, 24].

Beta-Amylasen in Weizen sind exo-aktive Enzyme, die in gebundener oder ungebundener Form vorliegen. Der größte Teil der *beta*-Amylasen, welche hauptsächlich im Endosperm lokalisiert sind, ist im reifen Korn inaktiv. *Beta*-Amylasen werden im Gegensatz zu anderen amylolytischen Enzymen während der Keimung nicht *de-novo* synthetisiert [25–27]. Die über Disulfidbrücken mit Glutenin verbundene *beta*-Amylase kann durch reduzierende Substanzen oder proteolytische Aktivitäten (z.B. Serinproteasen [28]) während der Keimung von der gebundenen in die freie Form überführt und aktiviert werden [25, 27]. Hierbei wird nicht das aktive Zentrum des Enzyms beeinflusst. Es wird vermutet, dass die gebundene Form der *beta*-Amylase inaktiv vorliegt, da das aktive Zentrum durch ein sterisches Hindernis blockiert wird [29–31].

Die durch das Zusammenwirken der katalytischen Eigenschaften der *alpha*- und *beta*-Amylasen aus der Stärke entstehenden Zucker dienen der Hefe als Substrat und fördern den Gärprozess [32]. Neben Alkohol entsteht dabei Kohlenstoffdioxid, welches Ursache der verbesserten Teiglockerung, Krumenstruktur und Volumenausbeute ist. Mit vorhandenen Aminosäuren bilden die Zucker im Zuge

der Maillard-Reaktion Aroma- und Farbstoffe, die die Krustenfärbung der Backwaren bedingen [33]. Mit der Entstehung von Dextrinen wird die Wasserbildung erhöht und eine längere Frischhaltung des Backproduktes erlangt [1]. Die positive Wirkung der Kombination aus *alpha*- und *beta*-Amylasen im Backprozess ist seit Jahrzehnten bekannt. Aber auch synergistische Effekte mit anderen Polysaccharidspaltenden Enzymen (zum Beispiel Xylanasen) im Backprozess konnten gezeigt werden [34, 35]. Verbesserungen in Bezug auf Brotvolumen und Brotstruktur sowie -textur durch den kombinierten Einsatz von *alpha*-Amylasen und Glukoseoxidasen konnten empirisch ermittelt werden [36]. Die reaktiven Prozesse sind dabei nicht tiefgründig erforscht.

Der Gehalt an *alpha*-Amylasen wird von Faktoren wie Weizensorte, Umwelteinflüsse, Keimbedingungen, Keimdauer und Sauerstoffgehalt beeinflusst [3]. Enzyme im Getreide werden auch während des Verarbeitungsprozesses nach der Ernte verändert. Vor allem der hitzebedingte Verlust (*alpha*-Amylase ab 80 °C, *beta*-Amylase ab 70 °C) spielt hier eine Rolle [3].

Da *alpha*-Amylasen natürlicherweise in Weizen eine sehr geringe, inkonstante, und *beta*-Amylasen eine hohe Aktivität aufweisen, müssen dem Mehl zum Ausgleich des Defizits hauptsächlich technische *alpha*-Amylasen zugesetzt werden. Hinzu kommen die Defizite durch die Verarbeitungsprozesse, die ebenso durch zeitlich gezielte Zugabe technischer *alpha*-Amylasen ausgeglichen werden können. Eine konstant gute Backqualität (Brotvolumen, Frischhaltevermögen, Krustenfärbung usw.) kann damit garantiert werden.

1.1.2.2 Xylanasen

Die Xylane sind Hauptbestandteil von pflanzlichen Zellwänden und die zweite große Gruppe der im Getreide vorkommenden Polysaccharide. Im Getreide enthaltene Xylane werden als Arabinoxylane bezeichnet [37, 38]. Xylanasen gehören zur Stoffgruppe der Hemicellulasen und sind einkettige Glykoproteine mit einem Molekulargewicht von 6-80 kDa. Sie katalysieren endogen die Hydrolyse von *beta*-1,4-D-Xylose-Bindungen im Xylan (Abbildung 2) [39, 40, 37].

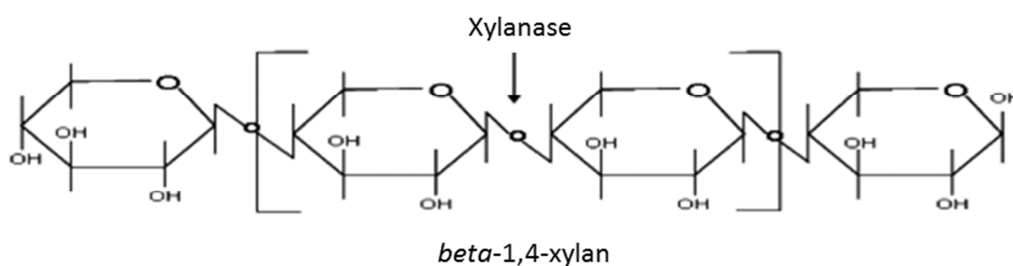


Abbildung 2: Angriffspunkt der Endo-1,4-Xylanase [40]

Entsprechend ihrer Proteinsequenzhomologie werden Xylanasen der Familie der Glycosidhydrolasen zugeordnet, obwohl sie sich in der Substratspezifität unterscheiden [38].

Im Überschuss verwendet sind Xylanasen in der Lage die hemmende Wirkung der im Überschuss vorhandenen endogenen Xylanase-Inhibitoren aus Weizen zu kompensieren (TAXI: *Triticum aestivum* Xylanaseinhibitor, XIP: Xylanaseinhibitor Protein und TLXI: Thaumatin-ähnlicher Xylanaseinhibitor) [40, 38].

Trotz des geringen Anteils von 2-3 % der Trockensubstanz von Weizenmehl sind die Arabinoxylane (lösliche und unlösliche) für die Teig- und Brotqualität von entscheidender Bedeutung. Wasserlösliche Arabinoxylane sind in der Lage das bis zu 10-20-fache des Eigengewichtes an Wasser zu binden [41]. Das in den Teig freigesetzte Wasser führt zu einer Teiglockerung (maschinengängig) sowie zu einem verbesserten Ofentrieb, einem erhöhten Brotvolumen und einer feinen und gleichmäßigen Krumenstruktur [42, 43]. Die durch Xylanasen katalysierte Hydrolyse der Xylan-Einheiten bedingt eine vermehrte Umwandlung der unlöslichen in lösliche Pentosane (Arabinoxylan und Arabinogalactan). Aus der dadurch gesteigerten Wasserbindungskapazität resultieren ein erhöhter Frischhalteeffekt, eine längere Haltbarkeit und eine Verringerung des „Altbackenwerdens“ von Brot [34].

1.1.2.3 Lipasen

Mehl hat je nach Ausmahlgrad und Qualität einen Lipidgehalt von 1,5-2,5 %. Die im komplexen Gemisch aus unpolaren (Glycerin verestert mit bis zu 3 Fettsäuren) und polaren (Glycerin verestert mit bis zu 2 Fettsäuren und einer polaren Gruppe, z.B. Galaktolipide, Phospholipide) Fraktionen vorliegenden Lipide treten im Zuge des Backprozesses in Wechselwirkungen mit der Stärke [44]. Vor allem die polaren Lipide haben eine oberflächenaktive Wirkung und assoziieren mit den Kleberproteinen. In Kombination mit der auftretenden Interaktion der Lipide mit der Stärke führt dies zu einer Verfestigung der Netzstruktur des Klebers. Die darauf zurückgeführten positiven Effekte auf eine optimale Teigentwicklung sind nicht abschließend geklärt [44]. Es konnte gezeigt werden, dass ein optimales Brotvolumen vom Verhältnis unpolarer zu polaren Lipide abhängt, wobei unpolare Lipide einen negativen Einfluss ausüben [44]. Es wird vermutet, dass die polaren, gebundenen Lipide einen elastischen Film um die während der Fermentation und frühen Backphase gebildeten Gasbläschen legen und diese damit stabilisieren. Eine erhöhte Gärtoleranz sowie gesteigertes Gashaltevermögen im Teig tragen dann zu einem erhöhten Brotvolumen bei. Weiterhin wird durch die Komplexbildung von Mono- und Diglyceriden mit der Stärke die Retrogradierbarkeit vermindert und die Frischhaltung der Backwaren erhöht [17, 45].

Lipasen katalysieren den Abbau der Lipide zu Di- und Monoglyceriden und freien Fettsäuren durch Hydrolyse der Bindung zwischen den Fettsäure-Estern und Glycerol (Abbildung 3) [1].

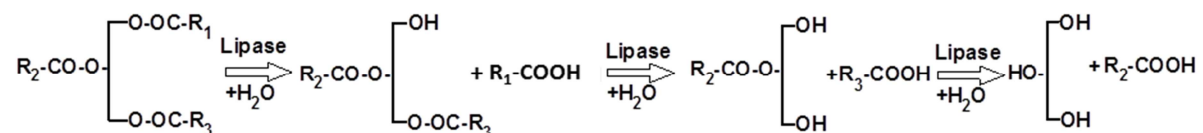


Abbildung 3: Katalysierte Hydrolyse der Bindung zwischen Fettsäureestern und Glycerol

Die dadurch entstehenden Mono- und Diglyceride, welche als Emulgatoren wirken, werden gebunden (polare Lipide), sodass sich das Verhältnis unpolarer zu polarer Lipide zum positiven (vermehrt polare Lipide) verschiebt. Durch den Einsatz spezieller Lipasen, wie z.B. Phospholipasen, können polare Lipide weiter zu hydrophileren Substanzen umgesetzt und die Teigstabilität verbessert werden [46].

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass durch die emulgierende Wirkung von Lipasen vermehrt polare aus unpolaren Substanzen umgesetzt werden, was eine helle, feinporige

Krumenstruktur, ein optimales Brotvolumen sowie eine verbesserte Frischhaltung zur Folge hat [47, 48]. Die Möglichkeit den Einsatz von Emulgatoren, welche als Zusatzstoffe deklariert werden müssen, durch Zugabe von Lipasen zu ersetzen ist ein weiterer positiver Effekt [49].

Da Lipasen im Vergleich zu Amylasen und Xylanasen eine breite Substratspezifität aufweisen und dies zu positiven als auch negativen Effekten führen kann, werden diese erst seit kurzem in der Backwarenindustrie eingesetzt [48]. Bei der Untersuchung der Backaktivität zweier unterschiedlicher Lipasen konnten Zusammenhänge zwischen der Zusammensetzung der Lipidfraktion und der Backleistung des Mehls gezeigt werden [18]. Die Verwendung unterschiedlicher Lipaseenzyme führt, in Abhängigkeit vom jeweiligen Wirkmechanismus, zu komplexen und veränderten Lipidstrukturen im Endprodukt. Daher können Effekte der Lipasen nicht generalisiert werden [48]. Der kombinierte Einsatz von Amylasen und Lipasen führt sowohl zu einer Erhöhung des Brotvolumens als auch zur Verbesserung der sensorischen Eigenschaften und einer Haltbarkeitsverlängerung [20]. Durch einen übermäßigen Zusatz an Lipasen können aufgrund der vermehrten Bildung von freien Fettsäuren, die nicht alle erneut gebunden werden können, durch die weitere Degradation ein ranziger Geruch und Geschmack auftreten.

1.1.3 Rechtlicher Hintergrund und Verbraucherschutz

Die Verordnung (EG) Nr. 1332/2008 regelt die rechtlichen Grundlagen zum Einsatz technischer Enzyme. Ein Lebensmittelenzym wird definiert als „ein Erzeugnis, das aus Pflanzen, Tieren oder Mikroorganismen oder daraus hergestellten Erzeugnissen gewonnen wird; dazu gehört auch ein Erzeugnis das durch ein Fermentationsverfahren mit Mikroorganismen gewonnen wird, und das ein Enzym oder mehrere Enzyme enthält, die die Fähigkeit besitzen, eine spezifische biochemische Reaktion zu katalysieren, und einem Lebensmittel zugesetzt wird, um auf irgendeiner Stufe der Herstellung, Verarbeitung, Zubereitung, Behandlung, Verpackung, Beförderung oder Lagerung von Lebensmitteln einen technologischen Zweck zu erfüllen“ [50]. Weiterhin wurde ein Leitfaden für die Charakterisierung der technischen Enzyme bereitgestellt (Abbildung 4) [51]. Die Bewertung eines Zusatzstoffes als „Zusatzstoff“ oder „Verarbeitungshilfsstoff“ ist abhängig von der konkreten Verwendung, der Wirkungsweise sowie dem Wirkobjekt. Unter Berücksichtigung des Verbraucherschutzes und der Lebensmittelinformationsverordnung VO (EU) Nr. 1169/2011 (LMIV) gelten Enzyme, die für die Herstellung der Lebensmittel verwendet werden und im Endprodukt eine technologische Wirkung zeigen („carry-through effect“) als Zusatzstoffe und müssen seit Dezember 2014 deklariert werden [52]. Direkt oder indirekt zugesetzte Zusatzstoffe, die als Verarbeitungshilfsstoffe verwendet werden sind gemäß Artikel 20 Buchstabe b) ii) LMIV dann kennzeichnungsbefreit, wenn eine Wirkung auf Rohstoffe oder Zutaten, aber nicht im Enderzeugnis erfolgt. Weiterhin kennzeichnungsbefreit sind zulässige *carry-over*-Zusatzstoffe (Art. 20 b) i) LMIV) ohne Wirkung im kennzeichnungspflichtigen Erzeugnis (Enderzeugnis) [52]. Bedingung ist, dass es sich um technisch unvermeidbare (verfahrens-, nicht mengenbezogene Betrachtung) Rückstände handelt.

Es wird diskutiert, zum Schutz des Verbrauchers über den Einsatz von technischen Enzymen im Backprozess zu informieren [51].

Aktuell ist die Aufstellung eines EU-Enzymregisters in Arbeit. Hierfür wurden alle bis 11. März 2015 beantragten Dossiers von Enzymen in einer Liste veröffentlicht, welche als Information dient, die endgültige Unionsliste für Lebensmittelenzyme jedoch nicht ersetzt [53]. Diese soll 2016 veröffentlicht werden.

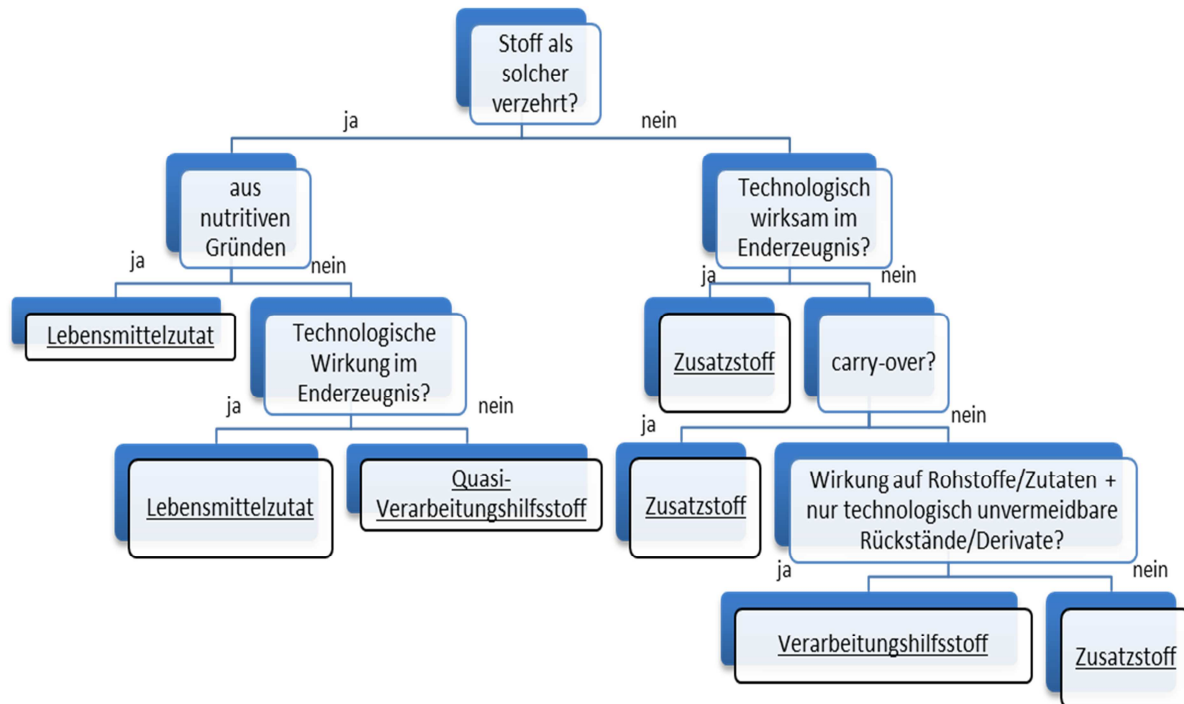


Abbildung 4: Hilfsschema zur Einteilung der technischen Enzyme im Lebensmittelrecht [51]

Zulassungsrechtlich unterliegen Verarbeitungshilfsstoffe keinem Zulassungserfordernis und sind ausdrücklich vom Anwendungsbereich der Europäischen Zusatzstoff-Verordnung (EG) Nr. 1333/2008 ausgenommen [54].

Durch die Weiterentwicklung der Backindustrie und der vermehrten Produktion von „Pre-Baking-Products“ mussten weitere Regelungen der Deklaration technischer Enzyme aufgestellt werden. Technische Enzyme, welche im Endprodukt keine technologische Wirkung aufweisen sollen, im Intermediärerzeugnis (z.B. Teig) als Zutat vorhanden sind und als solches in den Verkehr gebracht werden, müssen in vorgebackenen bzw. rohen Teigprodukten (gilt nicht für gekühlte oder gefrorene Teiglinge) als Zusatzstoff deklariert und gekennzeichnet werden.

Ein vollständiger Abbau der eingesetzten technischen Enzyme in Backprodukten ist nicht klar bewiesen. Weitere Diskussionen über die Deklaration technischer Enzyme als Zusatzstoff oder sogenannte *carry-over*-Zutat werden folgen. Eine Haltbarkeitsverlängerung durch technische Enzyme um mehrere Tage zeigt eine technologische Wirkung im gebackenen Endprodukt und widerlegt den Ansatz, dass die Enzyme im gebackenen Produkt keine Wirkung mehr haben. Im Hinblick auf den Verbraucherschutz sowie der aufkommenden Diskussion des allergenen Potentials technischer Enzyme in Backprodukten [55–57] wird eine Kennzeichnung technischer Enzyme immer wahrscheinlicher. Um eine Deklaration technischer Enzyme zu ermöglichen, müssen diese prüfbar und messbar sein.

Zusammenfassung in Bezug zum wissenschaftlichen Ziel

Technische Enzyme finden heutzutage vermehrt Anwendung in verschiedensten Bereichen der Lebensmittelindustrie. Aufgrund von umweltbedingten Schwankungen sowie züchtungsbedingten Mangelzuständen endogener Getreideenzyme konzentriert sich das Hauptanwendungsgebiet technischer Enzyme auf den Bereich Backwaren. Die während des Backprozesses hauptsächlich zugesetzten Enzyme der Gruppen Amylasen, Xylanasen und Lipasen haben verschiedene positive

Effekte auf qualitativ geforderte Eigenschaften des Backproduktes (Brotvolumen, Krustenfärbung, Frischhalteverbesserung usw.).

Die durch die Verordnung (EG) Nr. 1332/2008 geregelten rechtlichen Grundlagen technischer Enzyme werden durch die Lebensmittelinformationsverordnung VO (EU) Nr. 1169/2011 ergänzt. Technische Enzyme gelten hierbei als Verarbeitungshilfsstoffe, die keine technologische Funktion im Endprodukt ausüben und somit kennzeichnungsbefreit sind. Die Haltbarkeitsverlängerung nach Einsatz technischer Enzyme zeigt beispielhaft eine mögliche vorhandene technologische Funktion im Endprodukt. Darüber hinaus ist ein potentiell Allergierisiko durch den Einsatz technischer Enzyme beschrieben. Für einen ausreichenden Verbraucherschutz wird eine Deklaration im Backprodukt immer wahrscheinlicher. Ein sensitives Messverfahren, welches die Spuren der gering konzentriert (ppm Bereich) eingesetzten technischen Enzyme im Backprodukt nachweist, wird für die Eigenkontrolle der Hersteller sowie für die amtliche Überwachung der zuständigen Behörden dringend benötigt.

1.2 Protein- und Peptidanalytik mit Massenspektrometrie

Der quantitative Nachweis von Proteinen in Lebensmitteln wurde bisher sowohl über immunologische Assays (ELISA: Enzyme-linked Immunosorbent Assay) als auch indirekte Verfahren über die Detektion der DNA (Desoxyribonukleinsäure; Speziesnachweis) mittels qPCR (real-time-PCR) durchgeführt. Beim ELISA erfolgt die Bindung des Antikörpers mit dem nachzuweisenden Protein über Epitope (spezifische Region eines Antigens, das mit dem Antigen-bindenden Teil eines Antikörpers interagiert). Es gibt 2 verschiedene Arten von Epitopen: Sequenzepitope (lineare Sequenzen von Aminosäuren) und Strukturepitope (aus Aminosäuren bestehend, die in der Primärstruktur nicht in Reihe gegliedert sind, sich bei der Faltung des Proteins physiologisch annähern). Diese Unterscheidung ist vor allem bedeutend, da aufgrund thermischer Prozesse der Lebensmittelverarbeitung Strukturepitope gebildet oder zerstört werden können, Sequenzepitope meist unverändert und nach Freilegung (Denaturierung) jederzeit analytisch nachweisbar bleiben [58–64]. Vorhandene ELISA-Kits, die auf Strukturepitope aufbauen, sind daher vor allem zur Proteinanalytik von Rohmaterialien, aber nicht für verarbeitete Materialien (vor allem nach Hitzeeinwirkung) geeignet [65]. Trotz sehr guter möglicher Bestimmungsgrenzen von 0,7 ppm und einem üblichen Arbeitsbereich von 2,5 bis 160 ppm kann dieses Verfahren durch die Sortenvarianz von Lebensmitteln und Modifikationen der Zielproteine durch Verarbeitung (Matrixeffekte) beeinflusst werden [66, 67]. Die Folge sind geringere oder ausfallende Bindungen zum Antikörper und damit einhergehende Unterbefunde [66, 67].

Im Gegensatz zur Detektion von Proteinen mittels ELISA hat die DNA-Detektion mittels qPCR Vorteile bezüglich der Hitzeempfindlichkeit sowie bei der Minimierung falsch-positiver Ergebnisse durch Kreuzreaktionen und ist ebenso eine sehr sensitive und spezifische Methode [68, 69]. Nachteil dieser Methode ist vor allem, dass kein Zusammenhang zum aktuellen Proteingehalt in der Probe hergestellt werden kann, da Kalibratoren fehlen, die eine Umrechnung von Kopienzahl bzw. DNA-Konzentration in den Proteingehalt ermöglichen [70]. Zusätzlich gibt es Schwankungen im Verhältnis Genom zu Proteom, welche durch Variabilitäten des Proteoms (in unterschiedlichen Zell- und Gewebetypen des gleichen Organismus; durch unterschiedliche Wachstums- und Entwicklungsphasen des Organismus) begründet sind [71–73]. Auch Reaktionen des Genoms auf Umgebungsfaktoren, Krankheitsstatus, Wachstumsbedingungen oder Stresssituationen führen zu dynamischen Änderungen des Verhältnisses von Genom zu Proteom [74, 75].

Weiterhin verfügbare und aktuell im Fokus stehende immunochromatographische (lateral flow test, nur qualitativ) sowie enzymatische Tests sind sehr spezifisch und nur für wenige Proteine entwickelt (z.B. Histamin).

Zum Nachweis technischer Enzyme sind Immunoassays vorhanden (z.B. Messung von α -Amylase) [76, 77]. Es wurde aufgrund von Matrixkomplexitäten von Problemen mit der Spezifität von Antikörpern berichtet [76]. Weiterhin sind diese Verfahren zeitaufwendig sowie abhängig vom Vorhandensein der Antikörper, welche nicht immer zur Verfügung stehen [76]. Durch Vorversuche mit der IGV GmbH konnte bestätigt werden, dass die Spezifität genutzter Antikörper nicht ausreichend ist, um Enzyme aus der Matrix vollständig zu binden. Ziel der Arbeit war die Entwicklung einer Methode zum Nachweis technischer Enzyme für die Matrix „Backwaren“. Die durch den Backprozess möglichen Denaturierungen, Epitopumlagerungen oder Zusammenlagerungen von Enzymen schlossen einen Immunoassay als Methode der Wahl aus [78]. Aufgrund mangelnder DNA-Sequenz-Informationen technischer Enzyme in der Literatur wurde ebenso die Anwendung einer qPCR nicht in Betracht gezogen.

Die beschriebenen Mängel bzw. Probleme der direkten oder indirekten Proteinquantifizierung mittels ELISA oder qPCR haben die Entwicklung des Einsatzes der Tandemmassenspektrometrie (MS/MS) für die Proteinanalytik in den letzten Jahren stark vorangetrieben. Die 2 Bereiche der proteinanalysierenden Massenspektrometrie, welche als untargeted und targeted approach bezeichnet werden, haben sich als optimale Alternativmethoden herauskristallisiert und gelten als neuer Trend in der Proteinanalytik [79]. Untargeted approach umfasst die Identifikation von unbekanntem Proteinen in Proben. Die Zuordnung von Peptidmassen von im Gel separierten und verdauten Proteinen mit MALDI-TOF sowie „Peptide Mass Fingerprint“ mit ESI-MS/MS sind hierbei immer bedeutender geworden. Durch den Einsatz von Isotopen-Labeling wurden Vergleiche zwischen Proben möglich. Die Massenspektrometrie gewann mit dem untargeted approach in den letzten Jahren deutlich an Bedeutung im klinischen und biologischen Bereich [80]. MS/MS-basierte Analysen können z.B. Muster verschieden exprimierter Proteine in Blutserum effizient nachweisen [81]. Mit der Weiterentwicklung der Sensitivität der Massenspektrometer sowie der Software und Datenbanken, welche die großen Datenmengen verarbeiten, wurden die Einsatzgebiete der Massenspektrometrie erweitert. So findet MS/MS heutzutage Anwendung im Proteinprofiling, welches z.B. die Akquise von Proteinsequenzen sowie den Vergleich der Expressionen zwischen verschiedenen Proben ermöglicht und bei der Analyse von Proteininteraktionen oder Proteinmodifikationen angewendet werden kann [82].

Targeted approach bezeichnet die Analyse von spezifischen Proteinen in komplexen Proben und wird hauptsächlich mittels ESI-MS/MS durchgeführt. Vor allem im Lebensmittelsektor kommt es zu einer gezielten Nutzung im Bereich der Allergenanalytik [83]. Es können u.a. bereits bis zu sieben Allergene (Milch, Ei, Soja, Erdnuss, Haselnuss, Walnuss, Mandel) in einer LC-MS/MS-Multimethode nachgewiesen werden [84]. Bestehende LC-MS/MS-Methoden zum Nachweis technischer Enzyme sind nicht bekannt.

1.2.1 Proteinverdau

Proteine sind durch ihre große molekulare Masse begrenzt von Massenspektrometern erfassbar, sodass eine proteolytische Spaltung in Peptide erfolgen muss. Sowohl die enzymatische als auch chemische Spaltung ermöglicht die gezielte Zerlegung des Proteins in Peptide, die sich in einem vom

Massenspektrometer analysierbaren Massenbereich befinden. Tabelle 3 zeigt eine Übersicht über Proteinspaltungsmöglichkeiten mittels enzymatischen oder chemischen Verdau [85–88]. In Vorversuchen getestete Varianten chemischer Spaltung (BNPS-Skatol, Ameisensäure) führten zu nicht reproduzierbaren Ergebnissen und wurden daher nicht weiter betrachtet.

Tabelle 3: Übersicht über Spaltungsmöglichkeiten beim Proteinverdau

| Enzymatischer Verdau | Aminosäure vor Schnittstelle |
|---|---|
| Trypsin (Serinprotease) | Arginin, Lysin, modifiziertes Cystein |
| Lysin-C-Endopeptidase (LysC) | Lysin |
| Arginin-C-Endopeptidase (ArgC) | Arginin |
| Asparagin-N (Asp-N) | Asparagin |
| Chymotrypsin (Serinprotease) | Tyrosin, Tryptophan, Phenylalanin, Leucin |
| Staphylococcus aureus Protease V8 (Glu-C) | Glutaminsäure, Asparaginsäure |
| Chemische Spaltung | Aminosäure vor Schnittstelle |
| Cyanogenes Bromid | Methionin |
| 3-Bromo-3-methyl-2-(2-nitrophenylthio)-3H-indol (BNPS-Skatol) | Tryptophan |
| Ameisensäure | Asparaginsäure |

Die Auswahl des geeigneten proteolytischen Enzyms ist beim enzymatischen Verdau von entscheidender Bedeutung. Die generierten Peptide müssen eine optimale Molekülgröße (800 bis 3000 Dalton) besitzen, da zu kleine Peptide nicht spezifisch genug sind, während zu große Peptide eingeschränkt (z.B. MS/MS bis 1250 m/z) messbar sind. Das am häufigsten eingesetzte proteolytische Enzym ist die Serinprotease Trypsin, welche Peptidbindungen C-terminal von Lysin und Arginin spaltet [89]. Trypsin arbeitet bei einem pH-Optimum von 8-9 und einem Enzym-Substrat-Verhältnis von 1:20 bis 1:100 [49, 90]. Der tryptische Verdau kann in einem Gel, in einer Lösung oder membrangebunden erfolgen [91]. Der Proteinverdau und die reproduzierbar generierten spezifischen Peptide ermöglichen sowohl die Identifikation der zugehörigen Proteine durch direkte Messung mit MALDI-TOF-MS als auch die Quantifizierung der Proteinmengen mittels LC-MS/MS.

Zusammenfassung in Bezug zum wissenschaftlichen Ziel

Die quantitative Bestimmung von Proteinen in Lebensmitteln wurde vor allem mit direkten immunologischen Verfahren wie ELISA als auch mit indirekten Verfahren der DNA-Detektion (qPCR) durchgeführt. Hierbei führten sowohl die Probleme des ELISA-Verfahrens mit der Matrix (v.a. Unterbefunde) als auch der qPCR mit der Umrechnung von Genom zu Proteom (qPCR) zur Suche nach alternativen Messverfahren. Die Entwicklung der Messmethodik von Proteinen bzw. Peptiden mittels MS/MS brachte ein sensitives sowie matrixrobustes Verfahren für die Proteinidentifikation (MALDI-TOF-MS) als auch Proteinquantifizierung (LC-MS/MS) hervor. Da keine DNA-Sequenzen der technischen Enzyme bekannt sind und die Untersuchung dieser in gebackenen und somit matrixkomplexen Proben (Backwaren) erfolgen sollte, wurde die MS/MS als Methode angewendet und spezifisch für die Lösung der Zielstellung aufgebaut.

Die Messung von Proteinen mittels MS/MS erfordert einen definierten Massenbereich und erfolgt daher über die spezifisch erzeugten Peptide durch einen proteolytischen Verdau (meist mit Trypsin) des Zielproteins.

1.2.2 Proteinidentifikation mit MALDI-TOF-MS

Proteine und größere Peptide besitzen Molekülmassen, die für den Hauptteil der Massenspektrometer außerhalb des analysierbaren Bereichs liegen. Die Entwicklung der Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight-Mass-Spectrometry (MALDI-TOF-MS) ermöglicht die Bestimmung der Molekülmassen von intakten Proteinen sowie längeren Peptid-Sequenzen [91]. Hierfür werden die Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt [92], mit einem In-Gel-Verdau tryptisch verdaut, die entstehenden Moleküle in einer festen, kristallinen Matrix isoliert und mittels Laserbeschuss ionisiert [93].

1.2.2.1 SDS-PAGE

Die von Shapiro und Mitarbeitern im Jahre 1967 entwickelte SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) nutzt die Reaktion des anorganischen Detergenz SDS mit dem Protein zum SDS-Protein-Komplex um die Quartärstruktur des Proteins weitestgehend in denaturierte Untereinheiten zu spalten [94]. Dies ist möglich, da sowohl Wechselwirkungen zwischen den hydrophoben Kohlenwasserstoffketten mit den hydrophoben Proteindomänen als auch zwischen den hydrophilen Sulfatgruppen und dem umgebenden Hydratwasser auftreten, sodass Wasserstoffbrücken und hydrophobe Wechselwirkungen im Protein gelöst werden [95]. Die mit den Sulfatgruppen des SDS wechselwirkenden kationischen Gruppen der Proteine bilden den SDS-Protein-Komplex, welcher eine negative Gesamtladung trägt und im elektrischen Feld nur in anodische Richtung wandert [96]. Die hohe negative Oberflächenspannung führt sowohl zu einer schnellen Trennung als auch zur Minimierung der Proteinaggregation während des Elektrophorese-Laufes. Aufgrund der Tatsache, dass grundsätzlich 1,4 g SDS pro Gramm Protein gebunden werden, enthalten alle Proteine ein konstantes Masse-Ladungs-Verhältnis, sodass eine Trennung der Proteine im Gel über die Wanderungsgeschwindigkeit primär von der Größe abhängt [97]. Dies wird unterstützt durch die Konformation der denaturierten Proteine, welche immer ähnlich aufgebaut ist. Bei der Polyacrylamid-Gelelektrophorese wandern Proteine im elektrischen Feld zusätzlich durch Poren einer Polyacrylamid-Gel-Matrix. Hierbei nimmt die Porengröße mit zunehmender Acrylamidkonzentration zu. Die Kombination von Porengröße und Protein-Ladung, -Größe und -Form bestimmt die Migrationsrate des Proteins [98].

Mit Hilfe des Abgleiches einer SDS-PAGE eines Proteingemisches mit bekannter Größe sind Rückschlüsse auf das Molekulargewicht unbekannter Proteine möglich.

1.2.2.2 In-Gel-Verdau nach elektrophoretischer Trennung

Wie im Abschnitt 1.2.1 erwähnt kann der Proteinverdau direkt im Gel erfolgen. Die Methode wurde von Rosenfeld *et al.* 1992 [99] etabliert und in den letzten Jahren im Hinblick einer gesteigerten Peptidausbeute sowie qualitativ verbesserter massenspektrometrischer Daten optimiert [100, 91]. Die nach der Elektrophorese aufgetrennten Proteine, welche in Proteinbanden oder –spots angeordnet sind, werden mit einem Farbstoff behandelt. So werden die sichtbar gemachten Banden ausgeschnitten und nach einem Entfärbungsschritt die im Protein enthaltenen Cysteine in einem Reduzierungs- und Alkylierungsschritt modifiziert [101]. Es wird eine optimale Entfaltung durch die irreversible Trennung der Disulfidbrücken des Proteins ermöglicht. Es folgt die enzymatische Spaltung (meist durch Trypsin) der Proteine im Gel. Die entstehenden Proteinfragmente (Peptide) können aus dem Gel heraus extrahiert und für die nachfolgende massenspektrometrische Analyse genutzt

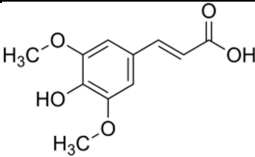
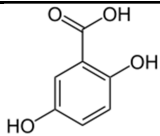
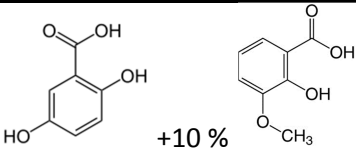
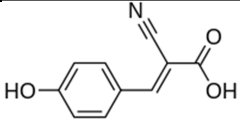
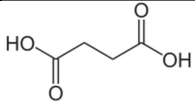
werden. Entsalzungs- und Konzentrierungsschritte können die Aufnahme der Massenspektren und damit die Identifikation des Proteins nach Abgleich mit Proteindatenbanken verbessern.

1.2.2.3 MALDI-TOF-MS

Für die Identifikation unbekannter Proteine stellt die MALDI-TOF-MS-Messung eine optimale Methode dar, da der Massenbereich theoretisch unbeschränkt ist [102].

Durch die Protonenübertragung der im 10^3 - 10^4 -fachen Überschuss vorliegenden Matrixmolekülen auf Proteine bzw. Peptide entstehen Protein- bzw. Peptid-Ionen, welche innerhalb eines elektrischen Feldes beschleunigt werden und eine definierte Flugzeit in Richtung Analysator zurücklegen [103]. Es können verschiedene niedermolekulare organische Substanzen, welche jeweils bei der verwendeten Laserwellenlänge eine hohe Absorption aufweisen, als Matrix angewendet werden (Tabelle 4).

Tabelle 4: Übersicht über Matrixsubstanzen für MALDI-TOF-MS (Proteine und Peptide)

| Name der Matrix (Abkürzung) | Strukturformel | Laserwellenlänge | Anwendungsbereich |
|---|--|------------------------------|----------------------|
| 3,5-Dimethoxy-4-hydroxyzimtsäure, Sinapinsäure (SA) |  | 266 nm 337 nm 355 nm | Proteine |
| 2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB) |  | 266 nm 337 nm 355 nm | Proteine, Peptide |
| 2,5-Dihydroxybenzoesäure + 10 % 5-Methoxysalicylsäure (DHBs) |  | 266 nm 337 nm 355 nm | Proteine, Peptide |
| α -Cyano-4-hydroxyzimtsäure (CHCA) |  | 337 nm 355 nm | Peptide |
| Bernsteinsäure (BS) |  | 2,94 μ m 10,6 μ m | Proteine, Peptide |

Die Analytmoleküle werden beim Verdunsten des Lösungsmittels in die auskristallisierende Matrix oder an deren Oberfläche eingebaut. Mit der Bestrahlung einer kleinen Fläche (Laserspotgröße: 50-150 μ m) der Probe durch einen kurzen Laserimpuls (wenige ns), wird die Energie auf die Matrixmoleküle übertragen und so ein Teil dieser sowie der eingebetteten Analytmoleküle desorbiert und ionisiert (Abbildung 5). Die Überführung der Analytmoleküle von der kondensierten Phase in die Gasphase und die damit verbundene Möglichkeit der Ionisation ist Aufgabe der eingesetzten Matrix. Die Art und Weise der Desorption und Ionisierung der Analytmoleküle ist noch nicht vollständig geklärt. Die übertragene Energiemenge pro Zeiteinheit als auch die Laser-Beschusszeit beeinflussen das Signal-Rausch-Verhältnis und damit die Qualität der aufgenommenen Massenspektren. So kann die Probe bei zu langer Bestrahlung thermisch zersetzt werden. Weiterhin ist ein spontaner Zerfall der Analytmoleküle möglich, wenn ein zu hoher Energieeintrag erfolgt.

Aufgrund der Möglichkeit, dass die Matrix ein Molekül mit einer unterschiedlichen Anzahl an Protonen belädt, kann es zur Bildung von zwei- bzw. dreifach geladenen Protein- bzw. Peptid-Ionen kommen.

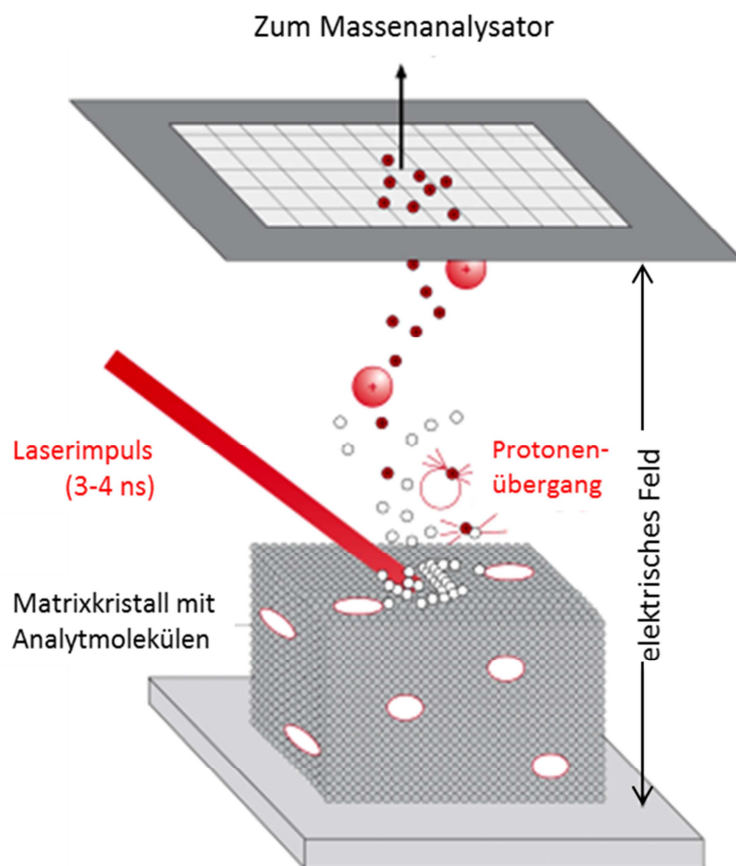


Abbildung 5: Entstehung der Protein- und Peptidionen im MALDI-TOF-MS [103]

Die erzeugten Ionen werden im elektrischen Feld beschleunigt, wobei Ionen gleicher Ladung im Feld die gleiche kinetische Energie erlangen. Die erhaltene Geschwindigkeit ist somit abhängig von der Masse des Ions [104].

$$\text{Gleichung 1: } v = \sqrt{\frac{2 \cdot z \cdot e \cdot U}{m}} \quad [105]$$

| | |
|---|--|
| v | Geschwindigkeit des Ions nach der Beschleunigungsstrecke |
| z | Ladungszahl |
| e | Elementarladung |
| U | Beschleunigungsspannung |
| m | Masse des Ions |

Während der anschließenden feldfreien Bewegung durch das Flugzeitrohr (1-3 m Länge) erfolgt die Auftrennung der Ionen nach dem Masse-zu-Ladungs-Verhältnis (m/z), da große Ionen mit hohem m/z -Wert den Detektor später erreichen als kleine Ionen. Die Geschwindigkeit der Ionen, welche sich aus der Gesamtflugzeit sowie der Driftlänge (Flugzeitrohr) ergibt, ermöglicht die Ermittlung der

Ionenmasse. Die Kalibrierung des Massenspektrometers kann durch das Messen der Flugzeiten von mindestens 2 Substanzen bekannter Masse erfolgen [106].

$$\text{Gleichung 2: } v = \frac{L}{t} \quad [105]$$

$$\text{Gleichung 3: } 0,5 \cdot m \cdot \left(\frac{L}{t}\right)^2 = z \cdot e \cdot U \quad (\text{Gleichung 1, Gleichung 2})$$

$$\frac{m}{z} = \frac{2 \cdot e \cdot U}{L^2} \cdot t^2$$

L Länge der Driftstrecke
t Gesamtflugzeit

Die im MALDI-Prozess auftretenden Energie-, Orts- und Zeitunschärfen führen dazu, dass nicht alle Ionen vom gleichen Ort und zur gleichen Zeit desorbiert und ionisiert werden. Ursachen dafür sind z.B. Abschirmeffekte, die verhindern, dass alle Ionen zur Zeit der Bildung das elektrische Feld in voller Stärke wahrnehmen [107]. Weiterhin kommt es zum Teil zur Ionenbildung mit zeitlicher Verzögerung, sodass die, anfänglich als neutrale Teilchen die Beschleunigungsstrecke durchlaufenden, später gebildeten Ionen eine geringere kinetische Energie aufnehmen. Im Weiteren kommt es zu Kollisionen mit anderen Ionen, was ebenso Zeit- und Energieverluste zur Folge hat. Konsequenz dessen ist, dass auch Ionen gleicher Masse und Ladungszahl den Detektor nicht zum gleichen Zeitpunkt erreichen, da sie unterschiedliche kinetische Energien aufweisen [107]. Die dadurch bedingte Verbreiterung des Signals führt zu einem herabgesetzten Auflösungsvermögen und macht den Einsatz eines elektrostatischen Reflektors unabdingbar. Die Möglichkeit im Reflektormodus zu messen führt zu einer verbesserten Auflösung der Massenspektren, da die Flugzeit durch die Richtungsumkehr der Ionen in ein elektrisches Gegenfeld verlängert wird [90]. Dabei treten Ionen mit höherer kinetischer Energie tiefer in das Gegenfeld ein, was zu einer verlängerten Flugpassage führt. Da diese Ionen bedingt durch die höhere kinetische Energie eine höhere Geschwindigkeit aufweisen, werden diese am Detektor zeitgleich mit den langsameren Ionen erfasst. Der Einsatz eines Reflektors gleicht Energiedifferenzen der kinetischen Anfangsenergie zwischen Ionen gleicher Masse von bis zu 10 % aus [108].

Eine verzögerte Ionenextraktion („delayed extraction“), bei dem das elektrische Beschleunigungsfeld nicht permanent, sondern zeitversetzt (100-500 ns) zum Laserimpuls eingeschaltet wird, führt zu einer weiteren verbesserten Auflösung der Massenspektren [109–111]. Das Prinzip besteht hierbei darin, dass sich Ionen mit höherer Startgeschwindigkeit während des Verzögerungszeitraums stärker entfernen und nach Einschalten des elektrischen Feldes eine geringere kinetische Energie erfahren als Ionen mit niedrigerer Anfangsgeschwindigkeit. Optimierte Einstellungen von Verzögerungszeit und Feldstärke können in Kombination mit einem Reflektor eine Auflösung von > 20.000 FWHM (full width at half maximum) erreichen.

Zusammenfassung in Bezug zum wissenschaftlichen Ziel

Mit der Entwicklung der MALDI-TOF-MS Technologie wurde die Bestimmung der Molekülmassen von intakten Proteinen sowie längeren Peptid-Sequenzen ermöglicht, welche für den Hauptteil der zuvor eingesetzten MS außerhalb des analysierbaren Bereichs lagen. Ein aufgenommenes Massenspektrum wird mit Proteindatenbanken und den dort enthaltenen theoretisch gespaltenen Proteinen abgeglichen und so die Identifikation des zugehörigen Proteins vorgenommen. Die Hersteller technischer Enzyme geben keine genauen Angaben über den Enzymnamen sowie Produktionsorganismus. Mit den identifizierten Aminosäuresequenzen der technischen Enzyme mittels MALDI-TOF-MS kann im Weiteren unter Durchführung eines theoretischen Verdau eine quantitative Methodik mittels LC-MS/MS aufgebaut werden.

1.2.3 Qualitative und quantitative Peptid-Bestimmung mit LC-(ESI)-MS/MS-QTRAP

Die Elektrosprayionisation (ESI) hat gegenüber anderen Ionisationsarten (MALDI: pulsierende Ionisierung) den Vorteil, dass durch ein kontinuierliches Ionisierungsverfahren ideale Voraussetzungen für eine direkte Koppelung an chromatografische Trennsysteme vorhanden sind [102]. Die Verknüpfung der HPLC-Trennung mit der Tandem-Massenspektrometrie, kurz LC-MS/MS, wird aktuell in der Proteinanalytik angewendet da es besonders für die Ionisierung polarer Moleküle geeignet ist [112]. Durch die chromatographische Vortrennung sowie die reproduzierbaren Gegebenheiten einer HPLC-Messung (Injektionsvolumen, Säulenfluss, Lösungsmittelzusammensetzung usw.) lassen sich Analyten unter Verwendung von entsprechenden Kalibrierstandards quantifizieren. Darüber hinaus ist die Methode aufgrund ihrer hohen Trennleistung auch zur Analyse komplexer Peptid- und Proteingemische geeignet [102] und stellt optimale Voraussetzungen für die Analyse von Lebensmittelproben dar, die aufgrund ihrer Matrixdiversität analytisch besonders anspruchsvoll sind.

Die High-Performance-Liquid-Chromatography (HPLC) bezeichnet eine analytische Trennmethode, die auf der Verteilung bzw. Interaktion der Analyten zwischen zwei Phasen beruht. Mit Hilfe einer Pumpe werden Lösungsmittel unterschiedlicher Polarität (Wasser, Methanol, Acetonitril o.ä.) vermischt und durch die Trennsäule, die zuvor mit dem Probengemisch benetzt wurde, geleitet. Die auftretenden und je nach Analyt unterschiedlich starken Wechselwirkungen zwischen der stationären und der mobilen Phase führen zu unterschiedlichen Austrittszeitpunkten der verschiedenen Analyten aus der Trennsäule in Richtung Detektor und einer damit einhergehenden verbesserten MS-Aufzeichnung. Nicht mit der Trennsäule interagierende Matrixbestandteile sowie Salze oder Verunreinigungen werden bereits vor dem Austritt der Analyten aus der Säule gewaschen [113]. Unterschieden wird zwischen einer isokratischen Trennung, bei der die Zusammensetzung der mobilen Phase konstant ist, und einer Gradienten-Trennung, bei der die mobile Phase variiert. Der organische Anteil in der mobilen Phase wird graduell erhöht, was zu einer ansteigenden Elutionskraft führt. Die unterschiedlichen Löslichkeitseigenschaften der Zielanalyten bei Multimethoden können abgedeckt und eine Verbesserung von Auflösungsvermögen und Trennkapazität erreicht werden [103].

1.2.3.1 Generierung von Peptid-Ionen mittels (ESI)-MS/MS

In der Proteinanalytik dient nach der HPLC-Auftrennung der Peptide hauptsächlich ein MS/MS als Detektor [114]. Das nach einem In-Lösung-Verdau erhaltene flüssige Probeneluat [115] wird nach der chromatographischen Vortrennung in Umgebung der mobilen Phase, in der es sich gelöst hat, durch

eine Metallkapillare in die Ionenquelle des Massenspektrometers geführt [116]. Die an der Metallkapillare angelegte Spannung erzeugt ein elektrisches Feld zwischen Kapillare und Gegenelektrode. Die daraus resultierende Potentialdifferenz führt zur Ionisation der Peptid-Moleküle, die einfach oder mehrfach positiv geladen vorliegen. Der Überschuss sowie die gegenseitige Abstoßung der Ionen führen zur Bildung eines Taylor-Kegels am Ende der Kapillare, von welchem aus ständig Proben Tropfen abgegeben werden (Abbildung 6). Der Zustrom eines neutralen Gases (meist Stickstoff) fördert die Evaporation des restlichen Lösungsmittels, woraufhin die Iontropfen durch Coulomb-Explosionen immer kleiner werden [90].

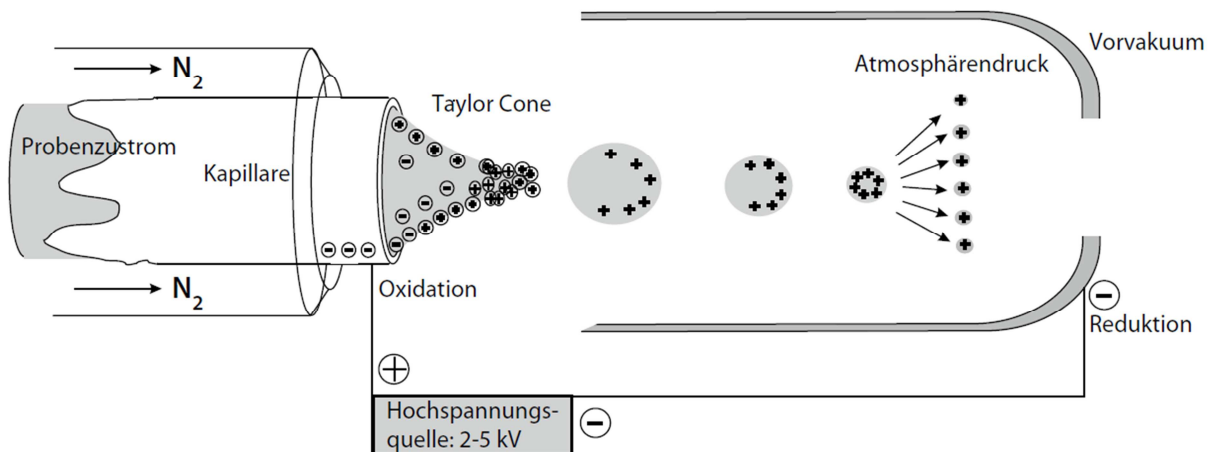


Abbildung 6: Ionisationsprinzip der ESI [90]

Über eine Mikroöffnung gelangt der Ionenstrom in das Hochvakuum im MS. Ein Quadrupol besteht aus vier Metallstäben, bei denen jeweils zwei gegenüberliegende Stäbe eine positive und die anderen zwei gegenüberliegenden Stäbe eine negative Gleichspannung besitzen. Nach dem Anlegen einer hochfrequenten Wechselspannung führt das entstandene elektrische Feld zwischen den Metallstäben zum selektiven Durchlassen von Ionen mit bestimmten Masse-zu-Ladungs-Verhältnissen, wobei die anderen Ionen eine instabile Flugbahn abzeichnen und durch das Aufprallen auf die Metallstäbe entladen werden (Abbildung 7).

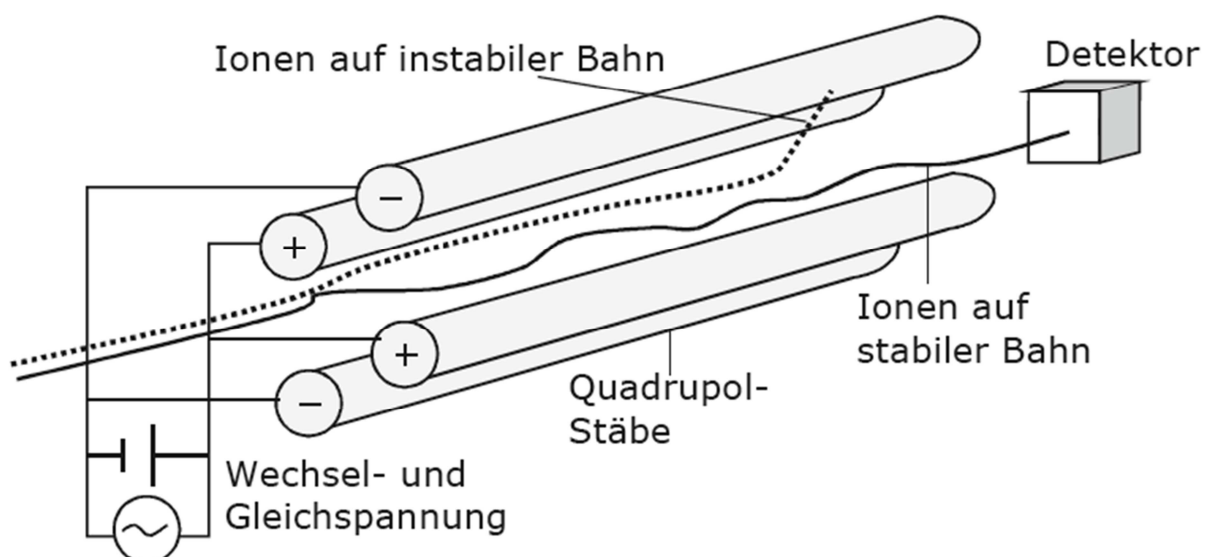


Abbildung 7: Elektrodenanordnung in einem Quadrupol-Massenanalysator [117]

Um Massenübergänge, sogenannte Fragmentationen, der Peptide zu generieren werden Tandem-Massenspektrometer verwendet, die aus den vier Quadrupolen Q0 bis Q3, davon zwei Mess-Quadrupolen (Q1 und Q3) bestehen [117]. Die Molekülionen (ionisierte Peptide), die den Quadrupol nach direktem Einlass ins System (Q1) passiert haben, werden in Q2 durch die angelegte Spannung und die Kollision mit einem Inertgas (Stickstoff, Argon oder Helium) fragmentiert. Die so entstandenen und ausgewählten Produkt-Ionen (b-Ionen bzw. y-Ionen) werden im sich anschließenden Q3 nach dem gleichen Prinzip wie im Q1 selektiert und zum Detektor geführt [85].

1.2.3.2 Auswertung der MS/MS-Daten

Auflösung von Peptidsignalen

Die Auflösung des Massenspektrometers bestimmt die Qualität der Unterscheidung von Peptidsignalen. Spektren mit vielen Signalen die nah beieinander liegen oder sich überlappen, können nur mit einer ausreichenden Auflösung unterschieden und daher richtig interpretiert bzw. mit Datenbanken abgeglichen werden. Als Auflösung ($R = \text{resolution}$) wird die Fähigkeit eines Massenspektrometers bezeichnet zwei Massen voneinander zu trennen ($R = \text{Peptidmasse/Massendifferenz zweier Signale}$) [105]. Die Auflösung eines MS/MS ist abhängig von der zu analysierenden Masse. So kann zum Beispiel bei einer Auflösung von 5000 die Peptidmasse mit $m/z = 500$ bei einer Massendifferenz von $0,1 m/z$ unterschieden werden. Der Abstand des nächsten Signals zum Peptidsignal sollte dementsprechend $499,9 m/z$ bzw. $500,1 m/z$ betragen. Bei der Peptidmasse $m/z = 1000$ sollte der Abstand zum nächsten Peptidsignal bereits $0,2$ betragen.

Durch die Verbesserung der Auflösung der MS-Geräte sowie der Entwicklung einer automatischen Datenauswertung ist heutzutage auch die Generierung von MS/MS-Daten intakter Proteine für die anschließende Proteinidentifikation möglich [118–120].

Nomenklatur der Fragmentationen

Die Fragmentierung eines Vorläuferions in ein oder mehrere Fragmentationen wird als Massenübergang bezeichnet. Bei Peptiden treten Fragmentierungen an den Peptidbindungen insbesondere zwischen dem Carbonylkohlenstoff und dem Amidstickstoff auf, womit es primär zur Ausbildung von b- und y-Ionen kommt (Abbildung 8) [121, 122]. Die Fragmente der N-terminalen Serie werden hierbei mit a, b und c, die Fragmente der C-terminalen Serie mit x, y und z bezeichnet. Die Zahl am jeweiligen Fragment gibt die Anzahl der Aminosäurereste an [90]. Fragmentierungsexperimente geben Informationen zur Struktur von Molekülen, da die Massendifferenz zwischen zwei aufeinanderfolgenden b- bzw. y-Ionen der Masse einer Aminosäure entspricht [101]. Die Signale repräsentieren folglich die Primärsequenz des Peptids und sind daher bedeutsam in der Proteinanalytik.

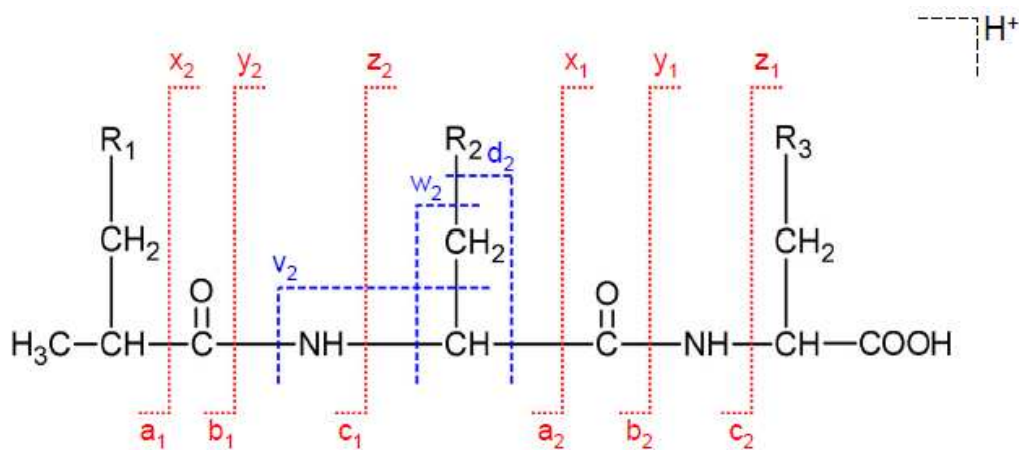


Abbildung 8: Schema der Bildung von Fragmentationen bei Peptiden am Beispiel eines protonierten Tripeptids [102]

Die beim tryptischen Verdau entstehenden Peptide mit basischem Ende am C-Terminus begünstigen die Bildung von γ -Ionen, da die hohe Basizität die Aufenthaltswahrscheinlichkeit einer positiven Ladung erhöht [123]. b -Ionen werden zum Teil weiter in a -Ionen bzw. Immonium-Ionen (Fragmentationen im unteren Massenbereich) fragmentiert [101].

Isotopenverteilung

Im Gegensatz zur MALDI entstehen bei der ESI keine einfach geladenen Molekül-Ionen, da es durch die Fragmentierung der Peptide im Zuge der MS/MS-Messung zum Ladungsverlust kommt. Um Peptide in dem für das Massenspektrometer spezifischen Massenbereich analysierbar zu machen, werden zwei- bis dreifach geladene Peptide als Vorläufer-Ionen ausgewählt. Im Zuge der Fragmentierung verändert sich der Ladungszustand und es werden Fragmente mit $z = 2$ (aus dreifach geladenem Vorläuferpeptid-Ion) bzw. $z = 1$ (aus 2-fach geladenem Vorläuferpeptid-Ion) generiert. Die Ladung eines Peptids lässt sich im Experiment mit erhöhter Auflösung (enhanced resolution, ER) anhand des Abstandes der Isotopenpeaks des Molekülionenpeaks ermitteln. Einfach geladene Peptide zeigen einen Abstand des ersten C13-Isotopenpeaks von 1 m/z wobei sich der Abstand bei zweifach geladenen Ionen ($m/z = m/2$) auf $0,5 \text{ m/z}$ halbiert. Die Isotopensignale dreifach geladener Peptidionen ($m/z = m/3$) liegen um $0,33 \text{ m/z}$ und die vierfach Geladener noch um $0,25 \text{ m/z}$ auseinander. Das in Abbildung 9 dargestellte Peptid mit $m/z = 424,2$ weist eine 2-fach-Ladung auf, da der Abstand zu den weiteren C13-Isotopenpeaks jeweils $0,5 \text{ m/z}$ beträgt ($424,7$ und $425,2$).

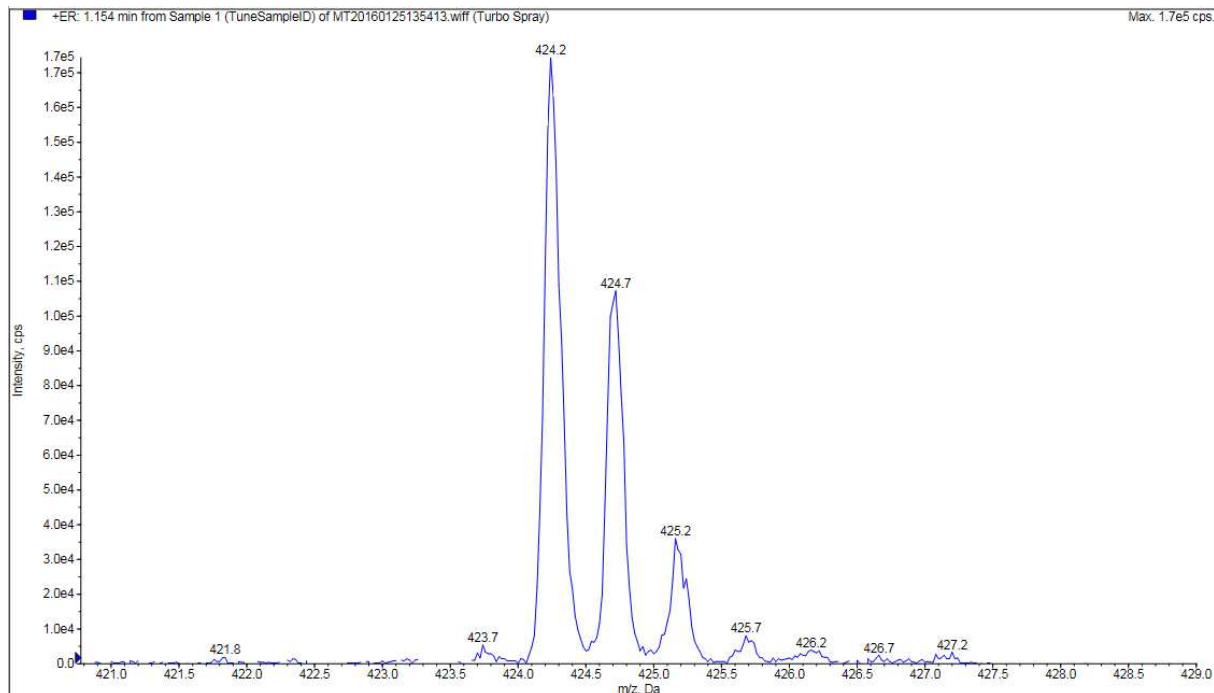


Abbildung 9: Enhanced resolution eines Molekülionenpeaks mit der Masse 424,2

Die Molekülmasse wird durch die beiden Größen monoisotopische und durchschnittliche Masse definiert. Dabei bezeichnet die monoisotopische Masse die Masse des Isotopensignals mit der geringsten m/z . Das jeweilige Peptid ist ausschließlich aus den Elementen der jeweils am häufigsten vorkommenden Isotope aufgebaut. Aufgrund der natürlichen Isotopenverteilung und der damit einhergehenden Wahrscheinlichkeit der Verteilung stellt das erste Isotopensignal eines Moleküls bis zu einer Molekülgröße von etwa 1500 Dalton das intensivste Signal dar. Statistisch wird das Vorhandensein eines selteneren Isotops mit ansteigender Molekularmasse wahrscheinlicher. Daher befindet sich das Intensitätsmaximum bei Peptiden mit höherer Molekülgröße bei den darauf folgenden Isotopensignalen [124].

Fragmentierungsprozess

Neben der hochauflösenden Messung gibt es weitere Scan-Modi, die unterschiedliche Arten der Analyse von Massenübergängen ermöglichen. Es gibt neben den Vorläuferionen-, Produktionen- und Neutralverlust-Scans die Messung mit Multiple-Reaction-Monitoring (MRM) (Abbildung 10) [86]. Die MRM-Messung stellt eine sehr sensitive und selektive Methode zum Nachweis und zur Quantifizierung von Peptiden dar, da selektiv ausgewählte Q1- und Q3-Massen aufgenommen und störende Hintergrundmassen aus der Matrix von der Aufzeichnung eliminiert werden. Zusätzlich zur MRM-Messung wird zur Auswahl geeigneter spezifischer Peptide ein Enhanced-Product Ion Scan (Produktionen-Scan) unter Nutzung einer Ionenfalle durchgeführt [125]. Die spezifischen Q1-Molekülmassen werden fokussiert, in die Kollisionszelle geleitet, fragmentiert und alle entstehenden Massenübergänge über Q3 fokussiert und zum Detektor geleitet. Das so erhaltene Massenspektrum wird für ein „peptide mass fingerprint“ genutzt, indem theoretisch entstehende Peptide (virtueller Verdau mit optimalen Bedingungen: $m/z < 1250$; keine endständigen Peptide usw.) von Sequenzen aus Proteindatenbanken (wie MASCOT, Matrix Science, London, UK) mit den experimentell erhaltenen Massenlisten verglichen und auf Spezifität geprüft (BLAST) werden [126]. Die Ergebnisse werden statistisch bewertet und können für die Auswahl spezifischer Peptide genutzt werden [127].

Eine Identifikation ist bereits anhand weniger Peptidmassen (3-10) möglich, insofern reine Proben sowie vollständige Datenbanken vorliegen [102]. Durch die zusätzliche Anwendung von Q0-Trapping, welches eine Akkumulation der Ionen im Q0 während des Ausschansens der Ionenfalle bewirkt, kann die Sensitivität des Massenspektrums erhöht werden.

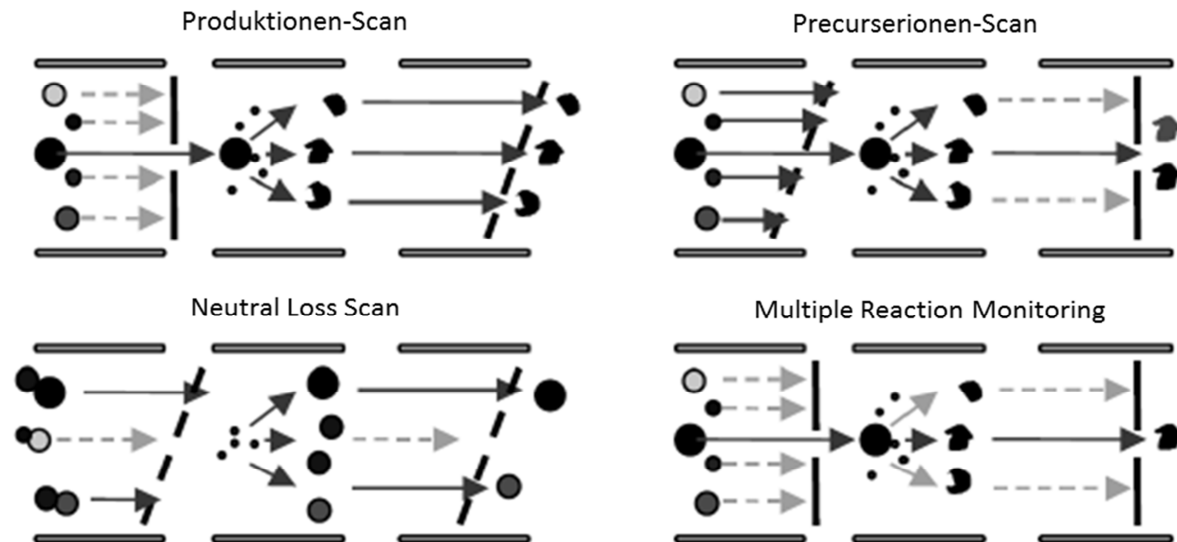


Abbildung 10: Möglichkeiten der Massenaufnahme mit MS/MS [128]

Im Gegensatz zur MALDI-TOF-MS-Messung, die aufgrund der sehr komplexen Probenvorbereitung und aufwendigen Messung sowie mangelnden Koppelbarkeit an chromatographische Trennsysteme fast ausschließlich zur Identifikation von Proteinen genutzt wird, hat die Messung von einfach aufgearbeiteten Proteinproben mit LC-MS/MS beste Voraussetzungen für die schnelle Erzeugung reproduzierbarer quantitativer Ergebnisse [129]. Multimethoden ermöglichen eine simultane Analyse von gezielten Massen bzw. Massenfragmenten bei weiterhin sehr hoher Sensitivität, da Hintergrundmassen nicht mit aufgenommen werden (MRM-Modus). Zum qualitativen Nachweis eines Proteins werden 2-4 Peptide mit je 3 Übergängen vom Hersteller der Massenspektrometer empfohlen. Der intensivste Übergang wird zur Quantifizierung genutzt. Bis zu 300 spezifische Peptid-Massenübergänge können zeitgleich aufgezeichnet werden und zwischen 30 und 40 Proteine identifiziert und quantifiziert werden [130].

Zusammenfassung in Bezug zum wissenschaftlichen Ziel

Die mittels MALDI-TOF-MS-Analyse identifizierten Aminosäuresequenzen der technischen Enzyme werden durch einen theoretischen Verdau in Massenübergänge übersetzt, die nachfolgend mit LC-(ESI)-MS/MS gemessen werden können. Durch das kontinuierliche Ionisierungsverfahren der ESI kann über Kalibrierstandards eine Quantifizierung der generierten Fragmentionen erfolgen. Die richtige Auswertung der MS/MS-Daten ist hierbei von Bedeutung, da das erhaltene Peptidspektrum viele Informationen der Aminosäuresequenz liefert. Die durch den In-Lösung-Verdau generierten Peptide der zu analysierenden technischen Enzyme können simultan in einer Multimethode gemessen werden, da die Aufzeichnung mittels MRM-Modus ausreichend Sensitivität liefert. Hierbei wird der Fokus neben den zwei bis vier Peptiden für die qualitative Absicherung auf das sensitivste Peptid-Fragmention gelegt, welches für die Quantifizierung des zugehörigen technischen Enzyms genutzt wird.

1.3 Methodvalidierung für analytische Verfahren mit Massenspektrometrie

Für die Qualitätssicherung von Messergebnissen aus neuen analytischen Verfahren ist es von elementarer Bedeutung, dass die verwendeten Prüfmethode den höchsten Anforderungen entsprechen und deren Leistungsfähigkeit eindeutig erwiesen ist [131]. Im Zuge einer Methodvalidierung wird die Nachweismethode geprüft und so der formelle und dokumentierte Nachweis erbracht, dass diese für den Nachweis der Analyten geeignet ist und die gestellten Anforderungen (Kriterien) erfüllt. In der Qualitätssicherung ist die Methodvalidierung ein wesentlicher Teil, der im Rahmen von Akkreditierungen und Zulassungsverfahren von Behörden gefordert wird. Insbesondere bei der Spurenanalytik in Lebensmitteln sichert die Methodvalidierung die Analysenqualität [132]. Es gibt verschiedene Richtlinien (z.B. DIN EN ISO/IEC 17025:2005), die sich mit der Art der Methodvalidierung befassen und unterschiedliche Anweisungen zur Qualitätskontrolle beschreiben. Für die vorliegende Arbeit wurde das Dokument der Deutschen Akkreditierungsstelle (DAkkS) „Validierung und Verifizierung von Prüfverfahren nach den Anforderungen der DIN EN ISO/IEC 17025 für Prüflaboratorien auf dem Gebiet der chemischen und chemisch-physikalischen Analytik im Bereich der Abteilung 4“ [133] als Orientierung zur Validierung verwendet. Ergänzende Angaben wurden dem Dokument „Methodvalidierung in der Analytik“ [134] entnommen. Im Wesentlichen fordern alle Richtlinien die Überprüfung der in Abbildung 11 dargestellten Parameter [135, 136]:

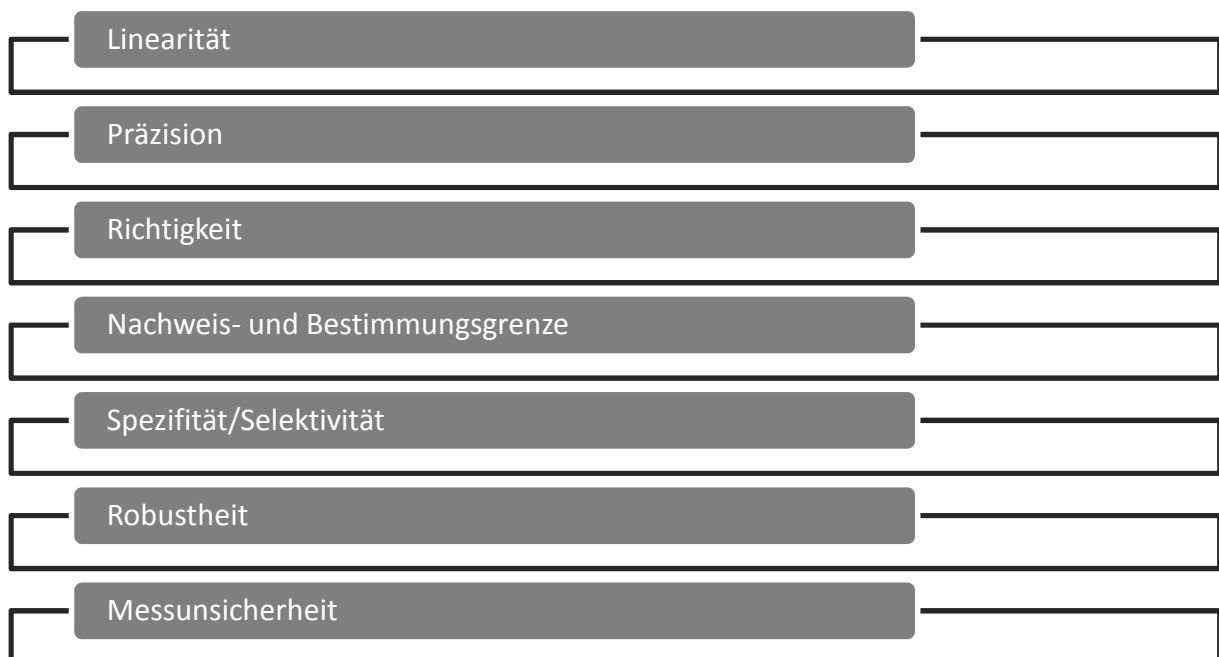


Abbildung 11: Zusammenfassung der geforderten Parameter bei der Methodvalidierung

1.3.1 Linearität

Unter Linearität versteht man den direkt proportionalen Zusammenhang, jedoch nicht zwingend eine lineare Abhängigkeit, zwischen der Konzentration und dem Messsignal des Analyten in einem definierten Konzentrationsbereich. Kalibrierfunktionen zweiten Grades können ebenso verwendet werden. Die Prüfung der Linearität erfolgt durch die wiederholte Messung des Analyten über den gesamten Konzentrationsbereich [137]. Für eine ausreichende Sicherstellung des mathematischen Zusammenhangs zwischen Masse und Signal wird die Messung von mindestens 5 Konzentrationen

angeraten [134]. Es wird unterschieden zwischen System- und Methodenlinearität. Bei der Systemlinearität wird die matrixfreie Linearität (Standardlösungen des Analyten ohne Zusatz von Probenmatrix) und damit die Linearität des Messsystems (Detektor) betrachtet [138]. Bei der Methodenlinearität wird ein möglicher Einfluss der Probenmatrix auf die Analytbestimmung geprüft [138]. Durch die Anwendung einer Matrix-Kalibrierung für die quantitative Bestimmung von Analysenproben kann ein möglicher Einfluss der Matrix auf die Qualität der Ergebnisse erfasst werden. Bei Gleichheit der System- und Methodenlinearität ist davon auszugehen, dass sowohl die Matrix als auch die Probenvorbereitung keinen systematischen Fehler verursachen.

1.3.2 Wiederhol- und Laborpräzision

Die Präzision stellt die Einheitlichkeit einer unter definierten Bedingungen erhobenen Serie von Ergebnissen dar und beschreibt die zufällige Streuung von Messwerten (zufälliger Fehler). Dargestellt wird die Präzision durch den Variationskoeffizienten bzw. die relative Standardabweichung [136]. Es wird zwischen der Wiederhol- und Laborpräzision unterschieden. Die Wiederholpräzision wird durch die Messung unter Wiederholbedingungen mehrfach extrahierter Proben an einem Tag ermittelt wohingegen die Bestimmung der Laborpräzision mit bewusster Änderung einer Zufallsvariablen (Labormitarbeiter, Tag, Analysengerät usw.) erfolgt.

1.3.3 Richtigkeit

Die Richtigkeit gibt Auskunft darüber wie weit ein ermittelter Messwert vom „wahren“ Wert abweicht und ist somit ein Maß für den systematischen Fehler der Methode [139]. Für die Überprüfung der Richtigkeit werden Proben bekannter Konzentration analysiert und der gefundene Gehalt in Bezug zum theoretischen Gehalt prozentual angegeben (Wiederfindungsrate, WFR) [136]. Die Verifizierung der Richtigkeit kann durch den Vergleich mit Referenz- oder Arbeitsstandards oder mit einer unabhängigen, möglichst validierten Methode oder durch Aufstocken („Spiken“) einer Probe erfolgen. Die Richtlinien empfehlen die Prüfung an einem niedrigen sowie einem hohen Konzentrationslevel [139].

1.3.4 Nachweis- und Bestimmungsgrenze

Die Konzentration eines Analyten, die mit dem verwendeten Verfahren noch detektiert aber nicht mehr quantifiziert werden kann, wird als Nachweisgrenze bezeichnet. Die Konzentration des Analyten, die noch mit erwiesener Präzision und Richtigkeit bestimmt werden kann, legt die Bestimmungsgrenze fest.

Es wird anhand von Proben bekannter Konzentrationen die Minimalkonzentration für die qualitative (Nachweisgrenze, NG bzw. *limit of detection*, LOD) sowie quantitative (Bestimmungsgrenze, BG bzw. *limit of quantitation*, LOQ) Bestimmung der Analyten ermittelt. Bei chromatographischen Analyseverfahren wird als Leitfaden für die Ermittlung der Nachweis- und Bestimmungsgrenze das Signal-Rausch-Verhältnis genutzt (Signalhöhe der jeweiligen Konzentration zu Signalhöhe in Leermatrix), welches 3:1 (NG) bzw. 10:1 (BG) erreichen muss.

1.3.5 Spezifität/Selektivität

Die Spezifität beschreibt die Fähigkeit einer Methode, die zu bestimmenden Komponenten ohne Verfälschung durch andere in der Probe vorkommende Komponenten zu erfassen. Die Selektivität

einer Methode hingegen gibt an, dass verschiedene nebeneinander zu bestimmende Komponenten ohne gegenseitige Störung erfasst werden können [134].

Die Prüfung der Spezifität erfolgt durch wiederholte Messung von Matrix, die frei vom Analyten sein muss und somit keine Messsignale zeigen darf. Da die Selektivität eine Voraussetzung für die Richtigkeit ist, ist eine richtige Methode automatisch selektiv [134].

1.3.6 Robustheit

Eine Methode wird als robust angesehen, wenn diese durch Änderungen der Testereignisse das Endergebnis nicht oder nur unwesentlich verfälscht ist [134]. Die Überprüfung der Robustheit kann durch den Vergleich der Analysenergebnisse zu Beginn und am Ende einer Messserie erfolgen. Weiterhin kann ein regelmäßiger Vergleich der Analysenergebnisse mit anderen Laboren erfolgen (Ringversuche). Im Zuge von sogenannten On-going-Validierungen, die neu in die Methode aufgenommene Analyten validieren bzw. bereits geprüfte Analyten revalidieren, wird die Robustheit einer Methode ebenfalls kontrolliert [140, 141].

1.3.7 Messunsicherheit

Um den Wertebereich einzugrenzen, innerhalb dessen der Messwert mit einer definierten Wahrscheinlichkeit liegt, wird zu jedem Messergebnis die Messunsicherheit angegeben. Die Messunsicherheit oder das Vertrauensintervall gibt an, in welcher Größenordnung das Analysenergebnis schwankt [142]. Das grundlegende Dokument und Leitfaden zur Ermittlung und Angabe der Messunsicherheit ist der „*Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement (GUM)*“ [131]. Dieser Leitfaden wurde durch die Normierungs- und Metrologieorganisationen ISO, IEC, BIPM, IFCC, OIML sowie durch die internationale Organisation für Angewandte Physik und Chemie (IUPAP und IUPAC) erstellt um eine Harmonisierung der Vorgehensweise zum Umgang mit der Unsicherheit beim Messen zu ermöglichen [131]. Zu einem weiteren Basisdokument für die chemische Analytik wurde später der „*EURACHEM/CITAC Guide*“ veröffentlicht. Grundidee dieses Leitfadens ist es, die Einflussgrößen eines analytischen Verfahrens so zu gruppieren, dass der Einfluss der Gruppe mathematisch bestimmbar oder sinnvoll schätzbar ist [131]. Die Berechnung bzw. Schätzung der Messunsicherheit kann auf verschiedene Weise erfolgen. Mit dem „Bottom up“-Prinzip wird das Prüfverfahren in verschiedene Module eingeteilt und für jedes einzelne Modul die Messunsicherheit ermittelt bzw. geschätzt [143]. Unter Anwendung des Fehlerfortpflanzungsgesetzes wird die Gesamtmessunsicherheit berechnet.

Eine weitere Möglichkeit ist das „Top down“-Prinzip, welches laborinterne Qualitätskontrollmessungen (z.B. Validierung, Referenzmaterialien) für die Abschätzung der Messunsicherheit verwendet [144–146]. Der aus Ringversuchen ermittelbare Vergleichsvariationskoeffizient kann ebenso zur Abschätzung der Messunsicherheit verwendet werden, sollte jedoch nur als Orientierung dienen [143, 146].

Besonders bei der Prüfung von gesetzlich festgelegten Grenzwerten ist der Einbezug der Messunsicherheit bei der Beurteilung der Ergebnisse von großer Bedeutung für den Verbraucher.

Zusammenfassung in Bezug zum wissenschaftlichen Ziel

Sowohl qualitative als auch quantitative Analyseverfahren unterliegen im Rahmen von z.B. Akkreditierungsverfahren definierten Kriterien der Qualitätssicherung. Mit Durchführung eines Validierungsverfahrens werden sowohl die Methode auf die Parameter Linearität, Präzision,

Richtigkeit, Selektivität, Spezifität und Robustheit geprüft als auch Nachweis- und Bestimmungsgrenzen ermittelt. Die Validierung der aus den Identifikationsdaten der MALDI-TOF-MS entwickelten Methode zum Nachweis technischer Enzyme in gebackenen Lebensmitteln mittels LC-MS/MS ist nötig, um die Eignung der Methode für die Anwendung in der Lebensmittelanalytik nachzuweisen.

1.4 Zielstellung

Technische Enzyme finden heutzutage vermehrt Anwendung in der Backwarenindustrie. Ursache dafür sind umweltbedingte Schwankungen sowie züchtungsbedingte Mangelzustände endogener Getreideenzyme. Hauptsächlich zugesetzt werden die Enzyme Amylasen, Xylanasen und Lipasen, die verschiedene positive Effekte auf die Eigenschaften des Backproduktes ausüben. Vor allem die kombinierte Zugabe verschiedener Enzyme zum Backprodukt steht aktuell im Fokus. Die Zugabe der Enzyme erfordert ein geschultes Handwerk, da bei falscher Anwendung (vor allem bei Kombination verschiedener Enzymklassen) auch negative Effekte in Erscheinung treten können. Es wurden 3 technische Enzyme stellvertretend für die Enzymgruppen Amylasen, Xylanasen und Lipasen ausgewählt, um die technologische Wirkung dieser auf Brot festzustellen. Das erste Ziel der Arbeit ist es hierbei den Einfluss des Enzymzusatzes auf die Frischhaltung, das Volumen und die Qualität der Brote festzuhalten und mit Ergebnissen der Literatur (Betrachtung der Wirkung der Enzymgruppen separat) zu vergleichen.

Die rechtlichen Grundlagen technischer Enzyme wurden in den letzten Jahren stark diskutiert und manifestiert. So gelten die Enzyme als Verarbeitungshilfsstoffe, die keine technologische Funktion im Endprodukt ausüben. Eine Haltbarkeitsverlängerung durch den Einsatz technischer Enzyme ist belegt und widerspricht dieser Aussage. Ein bekanntes potentiell allergisches Risiko durch den Einsatz technischer Enzyme lässt eine Deklarationspflicht im Backprodukt zum Schutze des Verbrauchers immer wahrscheinlicher werden. Für die Überwachung einer entsprechenden Deklaration durch zuständige Behörden ist die Entwicklung eines sensitiven Messverfahrens nötig.

Die bisher für eine quantitative Bestimmung von Proteinen in Lebensmitteln hauptsächlich genutzten direkten oder indirekten Verfahren ELISA und qPCR sind angesichts der Komplexität der betrachteten Matrix (Backprozess) sowie der eingeschränkten Antikörper-Spezifität und mangelnder Information der Gensequenzen technischer Enzyme nicht geeignet. Als zweites Ziel soll daher die in den letzten Jahren stark vorangeschrittene Entwicklung der Messmethodik von Proteinen bzw. Peptiden mittels Massenspektrometrie genutzt werden um ein neuartiges Verfahren zur Identifikation und Quantifizierung von Enzymen und Enzymgemischen in komplexen Lebensmittelproben zu entwickeln. Der Nachweis der im Rahmen der Arbeit betrachteten technischen Enzyme Fungamyl, Amylase TXL und Lipase FE-01 in einer validierten LC-MS/MS-Multimethode mit hoher Sensitivität und Spezifität entspricht dieser umfassenden Zielstellung.

Die entwickelte Methode kann weiterhin bei der fachgerechten Anwendung und Optimierung der eingesetzten Mengen technischer Enzyme im technologischen Prozess der Backwarenproduktion angewendet werden. Der Produzent kann mit der Methode optimale Dosis-Wirkungs-Verhältnisse ermitteln und im Zusammenhang einer Eigenkontrolle der Sorgfaltspflicht gegenüber dem Verbraucher nachkommen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

Alle verwendeten Chemikalien (Tabelle A 1), Puffer und Lösungen (Tabelle A 2) sowie Geräte (Tabelle A 3) und Software (Tabelle A 4) sind im Anhang aufgeführt.

2.2 Methoden

2.2.1 Prüfung der technologischen Wirkung von Fungamyl und Lipase FE-01

Die technologische Wirkung von Fungamyl und Lipase FE-01 wurde mit Hilfe eines Backversuches analysiert. Es wurden Brote verschiedener Dotierung gebacken und der Einfluss der eingesetzten technischen Enzyme auf die Volumenausbeute anhand verschiedener Parameter geprüft. Hierfür wurden die Textur-Profil-Analyse (TPA) und die Messung des Feuchtegehaltes an 3 Tagen durchgeführt (Tag 1, 3 und 7). Vergleichend wurde an Tag 1 der a_w -Wert (weiterer Wert für Feuchtegehalt) der Brote bestimmt. Weiterhin wurden Messungen zur Volumenausbeute und zur Porenanalyse durchgeführt. Die Veränderung der Zusammensetzung der Nahrungsbestandteile der Brote wurde durch die Aufnahme des Zucker- sowie Fettsäurespektrums analysiert. Zusätzlich wurden die Materialien mikrobiologisch geprüft.

2.2.1.1 Herstellung der Backwaren für die Analyse

Es wurden fünf Brote unterschiedlicher Dotierung produziert (Nullbrot: ohne Zugabe technischer Enzyme, Brot 1: 40 mg/kg Fungamyl, Brot 2: 100 mg/kg Fungamyl, Brot 3: 40 mg/kg Lipase FE-01, Brot 4: 100 mg/kg Lipase FE-01). Folgende technische Enzyme (Tabelle 5) wurden den Mehlen vor dem Backprozess zugegeben:

Tabelle 5: Zugefügte Standards zu Referenzmaterialien

| Technisches Enzym | Firmenname und -sitz |
|-------------------|---|
| Fungamyl | Novozymes A/S, Bagsvaerd, Denmark |
| Lipase FE-01 | ASA Spezialenzyme GmbH, Wolfenbüttel, Germany |

Die Wirkung von Amylase TXL ähnelt laut Hersteller der Wirkung von Fungamyl. Auf die Zugabe der Amylase TXL wurde verzichtet, um die mögliche Addition von Effekten durch ähnlich wirkende technische Enzyme zu verhindern und eine alltagsnahe Wirkung zu betrachten. Für die Herstellung der Testmaterialien wurden Vormischungen aus Weizenmehl Typ 405 und Enzymzusatz (Tabelle 6) eingewogen. Die deutsche Bezeichnung Typ 405 (Feuchtigkeit ca. 7 %, Eiweiß ca. 11 %, Asche ca. 0,4 %; Kohlenhydrate ca. 80 %) steht in Bezug zum Mineralgehalt (Asche) des standardisierten Weizenmehls und wird im Allgemeinen zum Backen von Keksen verwendet. Das Mehl wurde ausgewählt, um die Effekte, die durch die Zugabe der technischen Enzyme induziert werden, besser zu visualisieren. Eine weitere Besonderheit war die Verwendung eines Spezialöls, welches ausschließlich aus den beiden Fettsäuren C8/C10 Capryl-/Caprinsäure besteht. Es liegen erst wenige Informationen bezüglich der Anwendung und Wirkung einer Lipase als technisches Enzym vor. Ziel war es daher die Vermutung zu prüfen, dass die Auswahl des Fettes für die Wirkung der Lipase eine besondere Bedeutung hat. Betrachtet wurde die Wirkung der Lipase im Zusammenhang mit dem verwendeten Spezialöl vor allem im Bereich der Fettsäureanalytik sowie Sensorik.

Tabelle 6: Einwaage der Enzyme in Weizenmehl (Vormischung)

| Bezeichnung | Enzymzusatz [g] | | Weizenmehlzusatz [g] |
|-------------|-----------------|--------------|----------------------|
| | Fungamyl | Lipase FE-01 | Mehl für Vormischung |
| Nullbrot | 0 | 0 | 10,00 |
| Brot 1 | 0,268 | 0 | 9,732 |
| Brot 2 | 0,670 | 0 | 9,330 |
| Brot 3 | 0 | 0,268 | 9,732 |
| Brot 4 | 0 | 0,670 | 9,330 |

Die Einwaage erfolgte direkt in verschließbare Kunststoffbecher, beginnend mit Weizenmehl. Die Vormischungen wurden mit dem restlichen Mehl während des Knetprozesses aus den Kunststoffbechern gespült. Die Rezeptur ist in Tabelle 7 beschrieben.

Tabelle 7: Rezeptur für Backware Brot

| Bestandteil | Masse [g] |
|--|-----------|
| Weizenmehl Typ 405, exklusive Vormischung | 4002 |
| Spezialöl (bestehend aus C8/C10 Capryl-/Caprinsäure) | 201 |
| Zucker | 40 |
| Salz | 80 |
| Hefe | 201 |
| Kaltes Wasser (< 15 °C) | 2166 |

Der Teig wurde in 2 Stufen (3 Minuten langsam, 4 Minuten stark) bei etwa 27 °C mit dem Teigknetter homogenisiert. Es folgte eine Ruhephase für 60 Minuten bei 32 °C und 75 % Luftfeuchtigkeit, bevor der Teig bei 220 °C 35 Minuten gebacken wurde. Die Brote wurden an Tag 1, 3 und 7 untersucht. An diesen Tagen wurde je eines der Brote über Nacht bei 40 °C getrocknet und für die Analyse des Zucker- sowie Fettsäurespektrums verwendet.

2.2.1.2 Prüfung des mikrobiellen Status

Die Testmaterialien wurden für die mikrobielle Untersuchung an das Prüflabor übergeben. Es wurden an Tag 1, 3 und 7 die Gesamtkeimzahl sowie Hefen/Schimmelpilze kontrolliert. Zusätzlich wurden an Tag 1 und 7 noch die Untersuchungen auf *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* und *Bacillus cereus* durchgeführt. Die Untersuchungen erfolgten nach folgenden ASU-(Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren)-Methoden (Tabelle 8).

Tabelle 8: Verwendete Methoden für die Prüfung des mikrobiellen Status

| Parameter | Methode |
|-------------------------------|----------------|
| Gesamtkeimzahl | ASU L 06.00-18 |
| Hefen/Schimmelpilze | ASU L 01.00-37 |
| <i>Escherichia coli</i> | ASU L 01.00-25 |
| <i>Salmonella</i> | ASU L 00.00-20 |
| <i>Listeria monocytogenes</i> | ASU L 00.00-32 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | ASU L 02.07-2 |
| <i>Bacillus cereus</i> | ASU L 01.00-72 |

2.2.1.3 Bestimmung des Feuchtegehaltes

Der a_w -Wert der Testmaterialien wurde an Tag 1 gemessen. Er ist ein Maß für frei verfügbares Wasser im geprüften Material und ist definiert als Quotient des Wasserdampfdruckes über dem Material zum Wasserdampfdruck über reinem Wasser. Weiterhin wurde an Tag 1, 3 und 7 der Feuchtegehalt der Testmaterialien mit dem Schnellfeuchtebestimmer (Sartorius MA30, Moisture Analyzer) ermittelt. Hierfür wurden je etwa 4,5 g Brotkrume fein auf dem Schnellfeuchtebestimmer zerbröseln und 15 Minuten auf 105 °C erhitzt. Der Feuchtegehalt wurde direkt in % angegeben.

2.2.1.4 Textur-Profil-Analyse

Ziel der TPA war es die rheologischen Eigenschaften der Brotkrume in Bezug auf die Frischhaltung zu messen. Die Messung der Brote an Tag 1, 3 und 7 ermöglichte den Bezug zur Veränderung der Frische des Brotes im Verlaufe der Lagerzeit. Die Einstellungen der Messungen mit dem Texturanalyzer TA-XT2i sind in Tabelle 9 notiert. Es wurde die „AACC 74-09“ Methode angewendet, welche als Standard-Norm zur Untersuchung der Frischhaltung von Brot festgelegt wurde.

Tabelle 9: Einstellungen der TPA-Messung

| Parameter | Methode |
|------------------------|---------------------------------|
| Messmethode | Kraft in Druckrichtung |
| Testart | Einfacher Test |
| Vorlaufgeschwindigkeit | 1,0 mm/s |
| Testgeschwindigkeit | 1,0 mm/s |
| Rückgeschwindigkeit | 10 mm/s |
| Eindringtiefe | 33 % |
| Auslösekraft | 10 g |
| Messstempel | 36 mm Stempel mit 0,3 mm Radius |

Es handelt sich um eine elektronisch gesteuerte Prüfmaschine, welche die Kraft aufzeichnet, die erforderlich ist, um mit einer vorgegebenen Geschwindigkeit auf einem definierten Weg in eine 30 mm dicke Brotscheibe einzudringen. Der Prozess wird zweimal hintereinander durchgeführt, im Kraft-Wegdiagramm als Doppelbestimmung dargestellt und in Anlehnung an den menschlichen Kauvorgang Festigkeit, Elastizität, Balligkeit und Kaufähigkeit berechnet. Nach Erreichen der Auslösekraft von 10 g dringt der Messstempel 33 % (ausgegangen von der Ausgangsdicke) in die Brotscheibe ein. Bei einer 30 mm dicken Brotscheibe entspricht dies einer Eindringtiefe von 10 mm. Hierbei wird die Festigkeit bzw. Kraft bestimmt, welche für diese definierte Verformung der Brotscheibe notwendig ist. In der Arbeit wurde ausschließlich der Parameter Härte [g] als Eigenschaft bewertet. Je größer der Wert ist, desto fester (älter) ist das Brot. Es wurde geprüft ob die gemessenen Härten der verschiedenen Brotarten signifikant unterschiedlich sind (F-Test, 1 % Signifikanzniveau).

2.2.1.5 Bestimmung der Volumenausbeute

Die Volumenausbeute wurde nach der Raps-Verdrängungsmethode bestimmt. Hierfür wurde eine definierte Menge an Rapsamen in einen Behälter ohne Testmaterial gefüllt und die Menge der verdrängten Rapsamen nach Zugabe des Testmaterials volumetrisch erfasst.

2.2.1.6 Prüfung der Lockerheit

Anhand einer Porenanalyse wurde die unterschiedliche Lockerheit der Testmaterialien durch den Einsatz verschiedener Mengen technischer Enzyme dargestellt. Hierfür wurde eine mittige 3 cm dicke Scheibe jedes Brotes mit einer Skala eingescannt und die Porengrößen optisch verglichen.

2.2.1.7 Aufnahme des Fettsäurespektrums

Die Aufnahme des Fettsäurespektrums erfolgte ausschließlich über die Anwendung akkreditierter Prüfverfahren. Hierfür wurde zunächst das Fett aus den Proben gewonnen. Dazu wurde die bei 40 °C über Nacht vorgetrocknete und fein zerkleinerte Probe eingewogen und mit Wasser und 37 %iger Salzsäure aufgeschlossen. Die Aufschlussflüssigkeit wurde filtriert, der Filtrerrückstand nach Auswaschen der Säure mit heißem Wasser getrocknet und mit Petrolether extrahiert. Der gewonnene Rückstand wurde nach Abdestillieren des Lösungsmittels getrocknet, gewogen und so der Fettgehalt in g/100 g ermittelt.

drei bis vier Tropfen des gewonnenen Fettes wurden in Heptan gelöst und mit methanolischer Kaliumhydroxid-Lösung (KOH) für eine Stunde verseift. Ein aliquoter Teil des glycerinfreien Überstandes wurde mit Natriumsulfat vermengt und der entstehende Überstand mit Heptan vermischt. Die Probe wurde gaschromatographisch getrennt und mit einem Flammenionisationsdetektor (FID) das Fettsäurespektrum aufgenommen. Gemessen wurden gesättigte Fettsäuren (Caprylsäure, Caprinsäure, Laurinsäure, Myristinsäure, Palmitinsäure, Stearinsäure, Arachinsäure, Behensäure und Lignocerinsäure), einfach ungesättigte Fettsäuren (Palmitoleinsäure, Ölsäure, Eicosensäure, Erucasäure) und mehrfach ungesättigte Fettsäuren (Linolsäure, alpha-Linolensäure). Eine detaillierte Extraktionsvorschrift sowie alle Messbedingungen sind im Anhang unter Tabelle A 5 beschrieben. Unter Einbeziehung eines Referenz-Fettsäure-Standards wurden die Flächen der einzelnen Fettsäuren der Probe bestimmt und die prozentuale Verteilung berechnet. Mit Hilfe des zuvor ermittelten Fettgehaltes der Probe wurde die prozentuale Einteilung in gesättigte, einfach ungesättigte und mehrfach ungesättigte Fettsäuren vorgenommen. Es konnte das Fettsäurespektrum der unterschiedlich dotierten Testmaterialien verglichen sowie Änderungen mit der Lagerdauer (gemessen an Tag 1, 3 und 7) analysiert werden.

2.2.1.8 Aufnahme des Zuckerspektrums

Im Zuge der Messung des Zuckerspektrums mittels Ionenchromatographie wurden die Zucker Glukose, Fruktose, Laktose, Saccharose und Maltose mit einem akkreditierten Analyseverfahren (Tabelle A 6) bestimmt. Hierfür wurden die Zucker mit demineralisiertem Wasser aus der vorgetrockneten Probenmatrix extrahiert und vor der elektrochemischen Detektion verdünnt. Unter Einbeziehung eines Referenz-Mischstandards wurden die chromatographisch bestimmten Flächen der einzelnen Zucker in der Probe bestimmt und die prozentuale Verteilung berechnet. Eine detaillierte Extraktionsvorschrift sowie alle Messbedingungen sind im Anhang Tabelle A 6 beschrieben. Das Zuckerspektrum der unterschiedlich dotierten Testmaterialien konnte so miteinander verglichen sowie Änderungen im Verlauf der Lagerdauer (Tag 1, 3 und 7) beobachtet werden.

2.2.1.9 Einfluss auf sensorische Parameter

Um den Einfluss der technischen Enzyme auf Qualitätsparameter wie Geschmack und Konsistenz zu prüfen, wurden die Testmaterialien an Tag 1, 3 und 7 einer Sensorikprüfung unterzogen. Die

sensorische Prüfung erfolgte in Anlehnung an DIN 10964 „Sensorische Prüfverfahren – Einfach beschreibende Prüfung“ vom Deutschen Institut für Normierung e.V., Berlin, 1996 an den Tagen 1, 3 und 7. Diese Methode wird zur sensorischen Beschreibung von Backwaren (Brot, feine Backwaren) speziell im Zusammenhang mit der Beurteilung der Verkehrsfähigkeit eingesetzt. Hierbei wurden sowohl die Merkmale Form, Aussehen, Geruch, Biss/Kaueindruck/Löslichkeit sowie der Geschmack ein oder mehrerer Prüfproben mit Ausdrücken beschrieben, die entweder frei gewählt oder aus einer vorgegebenen Liste entnommen werden konnten. Es waren zwei Prüfpersonen (davon eine geschulte) anwesend. Zwischen den Proben wurde mit Wasser neutralisiert.

2.2.2 Identifikation technischer Enzyme

Es wurden sowohl das technische Enzym Fungamyl der Firma Novozymes als auch das technische Enzym Lipase FE-01 von ASA Spezialenzyme zur Identifikation ausgewählt. Der Feststoff Fungamyl wurde in Probenpuffer mit einer Endkonzentration von 1 mg/ml gelöst. Das flüssige Enzymgemisch Lipase FE-01 wurde 1:20 mit Probenpuffer verdünnt. Zur Denaturierung der Proteine und Streckung der Moleküle wurde das jeweilige Gemisch für 3 Minuten bei 95 °C erhitzt. Eine definierte Menge Probe wurde auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen und elektrophoretisch getrennt. Nach Ermittlung des Molekulargewichtes der entstandenen Proteinbanden erfolgte der In-Gel-Verdau. Das Spektrum des Proteolyseproduktes wurde mit MALDI-TOF-MS-Messung aufgenommen und nach Abgleich mit Proteindatenbanken die Proteinsequenz identifiziert. Die verwendeten Standards für die Analysen sind im Anhang (Tabelle A 16) notiert.

2.2.2.1 SDS-PAGE

Die SDS-PAGE wurde gemäß Laemmli durchgeführt [147, 148]. Hierfür wurde das Trenngel (12 %) hergestellt und in beide Seiten der Gießkassette eingefüllt. Das Gel wurde für 30 Minuten mit Isopropanol überschichtet. Das frisch angesetzte Sammelgel (5 %) wurde in die Gießkassette gegossen und der Kamm mit den Probenlots eingesetzt. Es folgte die Polymerisation für 60 Minuten bei Raumtemperatur. Der Probenkamm wurde entfernt, die Gießkassette mit dem fertigen Gel in den Elektrodenstand eingesetzt und mit Kathodenpuffer befüllt.

Es wurden je 10 µl Proben-Puffergemisch als auch Proteinstandardsmischung „Pharmacia“ auf je ein Slot aufgetragen und die Elektrophorese nach Auffüllen der Anodenkammer mit Anodenpuffer für etwa 90 Minuten bei 500 V und 10 mA gestartet.

Die Gele wurden über Nacht bei Raumtemperatur mit Färbelösung behandelt. Es folgte das Entfärben der Gele durch mehrmaligen Austausch von destilliertem Wasser unter ständigem Schütteln über mindestens 3 Stunden.

2.2.2.2 In-Gel-Verdau

Die entstandenen Gele wurden mit einer kolloidalen Coomassie Brilliant Blue Färbelösung behandelt um die Proteinbanden, die für die Identifikation von Interesse sind, auszuwählen [147, 149]. Der In-Gel-Verdau erfolgte mit dem Tryptic Digestion Kit Nummer 89871 von PIERCE. Die Proteinbanden wurden aus dem Gel ausgeschnitten und mit 200 µl Entfärbelösung eine Stunde bei 37 °C behandelt. Es folgte die Reduzierung mit Tris-(2-carboxyethyl)phosphine, Hydrochloride (TCEP) bei 60 °C für 10 Minuten nach Zugabe von 30 µl Reduzier-Puffer sowie die Alkylierung mit Iodacetamid (IAA) bei Raumtemperatur in Dunkelheit durch Zugabe von 30 µl Alkylier-Puffer. Nach zwei Waschrufen wurden 50 µl Acetonitril (50 %) zugegeben und 25 Minuten inkubiert. Nach Zugabe von 35 µl Verdau-

Puffer, welcher Trypsin enthielt, erfolgte der Verdau bei 30 °C über Nacht. Nach Zugabe von 10 µl 1 % TFA und fünfminütiger Inkubation wurde das Proteolyseprodukt bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.2.2.3 MALDI-TOF-MS-Messung und Proteinidentifikation

2 µl der Proteolyse-Lösung wurden mit 2 µl α -cyano-4-Hydroxymethylsäure gemischt und davon 0,5 µl auf das Stahltemplate der MALDI-TOF-MS-Platte aufgetragen und bis zur Auskristallisation getrocknet (dried droplet-Methode). Folgende Einstellungen des MALDI-TOF-MS (AUTOFLEX-III LRF200-CID mit Smartbeam-Laser 200, Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany) wurden vorgenommen (Tabelle 10):

Tabelle 10: Einstellungen des MALDI-TOF-MS (Parameter der Messung und Spektrenbearbeitung)

m/z: Masse-zu-Ladungsverhältnis

| Messbedingungen | Spektrenbearbeitung |
|--------------------------------|---|
| Reflektor Modus | Glätten: Smoothing according to algorithmen: Savitzky-Golay; Width: 0,2 m/z; Cycles: 1 |
| Beschleunigungsspannung: 20 kV | Baselinesubstraktion: According to algorithmen: Tophat |
| Reflektorspannung: 2158 V | Peak finding: Peak detection algorithmen: snap; Signal to Noise threshold: 3; Maximum number of peaks: 200; Quality factor threshold: 600 |
| Massenbereich: 300 - 6000 m/z | |

Das Massenspektrometer wurde mit dem Standard „Peptide calibration standard II“ (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany) mit einem Massenbereich von 700-3500 Da kalibriert (Tabelle A 16). Die erhaltenen Massenspektren des Proteolyseproduktes wurden mit dem Programm Bruker Daltoniks Flex-Analysis (Vers. 3.3; Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany) bearbeitet und mit der Software Bruker Daltonics Biotoools (Vers. 3.2; Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany) unter Verwendung der Proteinsequenz-Datenbanken „SwissProt2013_02, -_11 und Fungi_EST Database“ über die Zugangssoftware „Mascot“ ausgewertet. Folgende Einstellungen wurden vorgenommen:

Toleranz: 200 - 500 ppm

Maximale Anzahl von missed cleavages mittels Trypsin: 0-1

Modifizierungen: Propionamid-Anlagerungen an Aminosäure Cystein

Identifiziert wenn: mindestens 20 % Sequenzhomologie

Signifikanter Protein Score: > 70 %

Irrtumswahrscheinlichkeit: $p < 0,05$

Die Berechnung des Protein Score erfolgte nach der Gleichung $10 \cdot \log(P)$, wobei P die Wahrscheinlichkeit beschreibt, dass die ermittelte Sequenzübereinstimmung ein zufälliger Treffer ist.

2.2.3 SDS-PAGE zur Quantifizierung technischer Enzyme in Enzymgemischen

Durch die Messung der Farbdichte (Densitometrie) ist es möglich elektrophoretisch aufgetrennte Proteine zu quantifizieren. Durch die Aufnahme digitaler Graustufenbilder mit Hilfe des Bio-RAD

Scanners wurde die Proteinkonzentration unbekannter Proben über die Bandenintensität und die Proportionalität zur Bandenintensität der Standardreihe aus Rinderserumalbumin (BSA) berechnet. Fungamyl wurde jeweils in Wasser (Probe A, 10 mg/ml) und in Probenpuffer (Probe B, 5 mg/ml) gelöst. Probe A wurde 1 Minute bei 5000 x g zentrifugiert und der Überstand mit Probenpuffer verdünnt (1:1, 1:2 und 1:4). BSA wurde in bekannten Konzentrationen mitgeführt (Standard). Sowohl die Standards als auch die Proben wurden 3 Minuten bei 95 °C erhitzt und denaturiert. Jeweils 10 µl der Standards sowie Probe A und B als auch 5 µl Probe B wurden auf ein Polyacrylamid-Gel (2.2.2.1) aufgetragen und die SDS-PAGE für 180 Minuten bei 25 mA pro Gel und 300 V durchgeführt. Die fertigen Gele wurden über Nacht bei Raumtemperatur mit Färbelösung (Coomassie-Blau in 10 % Essigsäure) gefärbt. Es folgte das Entfärben der Gele durch mehrmaligen Austausch von 10 % Essigsäure unter ständigem Schütteln von mindestens 3 Stunden. Nach Aufnahme der digitalen Graustufenbilder mit dem Bio-RAD Scanner wurden die Gele mit Hilfe des Programms ImageLab ausgewertet.

2.2.4 Herstellung von Referenzmaterialien

Zur Prüfung der quantitativen Werte der LC-MS/MS-Messung wurden Referenzmaterialien bekannter Konzentrationen von Fungamyl, Amylase TXL und Lipase FE-01 hergestellt. Die Herstellung erfolgte in Anlehnung an den Leitfaden für die Entwicklung von BAM-Referenzmaterialien [124], welcher für die betrachteten Bereiche den Empfehlungen des ISO Guide 34 [150] und 35 [151] folgt. Die Referenzmaterialien wurden nicht zertifiziert.

2.2.4.1 Planung und Durchführung

Festlegungen der Anforderungen an das Referenzmaterial

Ziel war es Referenzmaterialien unterschiedlicher Matrices sowie Konzentrationen herzustellen, die der Anwendungsrealität entsprechen. Da die betrachteten technischen Enzyme ausschließlich im Bäckerhandwerk Anwendung finden, wurden die Matrices Mehl, Brot und Keks als typische Vertreter gebackener Produkte ausgewählt. Hierbei stehen, im Gegensatz zu Mehl (Rohstoff), Brot und Keks für den Bereich „gebackene bzw. erhitzte“ Produkte. Weiterhin wurde eine vergleichende Betrachtung der Analyseergebnisse zwischen fettarmen (Mehl 0 % Fett, Brot 3 % Fett) und fettreichen (Keks, 18 % Fett) Lebensmitteln möglich. Aufgrund des beliebten Konsums und Einsatzes von Weizenmehl wurde dies als Grundlage aller hergestellten Referenzmaterialien verwendet. Hierbei wurde Typ 405 verwendet, um die Effekte, die durch die Zugabe der technischen Enzyme induziert werden, besser zu visualisieren. Es wurde ein reiner Biskuitkeks als repräsentative Matrix für den Bereich Süßwaren/Backwaren ausgewählt, um einen Einfluss durch weitere Zutaten (z. B. Schokolade) auf die Analytik auszuschließen.

Es wurden folgende technische Enzyme vor dem Backprozess zu den Matrices (Tabelle 11) zugegeben:

Tabelle 11: Zugefügte Standards zu Referenzmaterialien

| Technisches Enzym | Firmenname und -sitz |
|-------------------|---|
| Fungamyl | Novozymes A/S, Bagsvaerd, Denmark |
| Lipase FE-01 | ASA Spezialenzyme GmbH, Wolfenbüttel, Germany |
| Amylase TXL | ASA Spezialenzyme GmbH, Wolfenbüttel, Germany |

Die eingesetzten Mengen technischer Enzyme sollten sich in einem praxisnahen Konzentrationsbereich bewegen. Im Bäckerhandwerk werden den Mehlen technische Enzyme vor dem Backprozess im einstelligen ppm Bereich zugegeben. Es wurde ein Konzentrationsbereich zwischen 1 und 10 ppm Enzym aller 3 Matrices angestrebt. Für die Matrix Brot wurden neben der Nullprobe vier Proben hergestellt. Für die Matrices Mehl und Keks hingegen wurden neben dem Nullmaterial eine weitere Probe produziert und durch Mischung des Referenzmaterials mit Nullmaterial weitere Konzentrationsstufen hergestellt. Ursache dafür war die von zuvor produzierten Testmaterialien (nach gleichen Produktionsbedingungen) analysierte Partikelgröße. Es konnten höhere Partikelgrößen beim Brot ($304,79 \pm 11,29 \mu\text{m}$) als bei Mehl ($159,24 \pm 10,31 \mu\text{m}$) ermittelt werden (Anlage Abbildung A 2 und Abbildung A 3). Das Herstellen verschiedener Konzentrationslevel aus einer Probe war bei der Matrix Brot nicht möglich bzw. hätte zu Ergebnisschwankungen aufgrund von Inhomogenität geführt.

Die hergestellten Referenzmaterialien dienen ausschließlich der Prüfung der LC-MS/MS-Methode zum Nachweis technischer Enzyme. Sie wurden zum Zweck der Kontrolle einer vollständigen Extraktion sowie korrekten Quantifizierung produziert. Beim weiteren Einsatz der Methode nach der Validierung besteht die Möglichkeit die Materialien als Laborstandard bei jeder Extraktion mitzuführen.

Durchführungsplanung

Für die Herstellung der Referenzmaterialien wurden ausschließlich enzymfreie Materialien verwendet. Dies wurde geprüft, indem je Matrix eine Nullprobe produziert und analysiert wurde. Nach dem Prozess des Vermischens wurden die Materialien direkt (Mehl) bzw. nach dem Backprozess (Brote) über Nacht bei $40 \text{ }^\circ\text{C}$ vorgetrocknet und anschließend fein zerkleinert. Die Kekse wurden direkt nach dem Backprozess fein zerkleinert. Es wurden sowohl eine gute Homogenität als auch optimale Lagerbedingungen geschaffen. Die Materialien wurden auf Kunststoffbecher mit einem Inhalt von mindestens 50 g verteilt und bis zur weiteren Analyse gefroren gelagert ($-18 \text{ }^\circ\text{C}$). Es wurde eine Homogenitätsprüfung durchgeführt, indem die berechneten Konzentrationen von 15 Extrakten (3 je Becher unter Wiederholbedingungen) eines Konzentrationslevels je Matrix am Beispiel des technischen Enzyms Lipase FE-01 verglichen wurden. Zur Kontrolle der Streuung innerhalb eines Bechers wurden die Konzentrationen aus einem Becher in Mehrfachbestimmung extrahiert und gemessen. Mit Hilfe des Brown-Forsythe-Test (Homogenität der Varianzen) wurde die Homogenität der Proben geprüft. Eine Stabilitätsprüfung musste nicht durchgeführt werden, da die produzierten Materialien zur „Stabilitätsklasse 1“ gehören. Dies sind laut Leitfaden der BAM „Materialien, deren Stabilität unter den vorgesehenen Lager- und Beförderungsbedingungen über den vorgesehenen Verwendungszeitraum nach Expertenauffassung evident ist“ [124].

Eine zusätzliche Absicherung über die Messung der Referenzmaterialien durch Fremdlabore war nicht möglich, da keine passende Methode angeboten wird. Auch die Teilnahme an Ringversuchen war aufgrund von mangelnden Testangeboten nicht möglich.

2.2.4.2 Unprozessierte Referenzmatrix - Weizenmehl

Es wurden je 10 g Weizenmehl in 3 Kunststoffbecher eingewogen. Die Einwaage von 80 mg Fungamyl erfolgte auf einem Kjeldahl-Wägeschiffchen, welches mit 4,76 g Mehl direkt in den Kunststoffbecher abgespült wurde. Je 80 mg Lipase FE-01 (Flüssigkeit) und Amylase TXL (Flüssigkeit) wurden direkt in den zweiten bzw. dritten Kunststoffbecher eingewogen. Die Voreinwaage betrug 35 g. 165 g Mehl

wurden direkt in den Thermomix eingewogen und die Voreinwaage mit den Enzymgemischen zugegeben. Die Kunststoffbecher wurden insgesamt mit 200 ml Wasser direkt in den Thermomix ausgespült. Die Mehl-Wasser-Suspension wurde eine Stunde auf Stufe 1 gerührt und alle 15 Minuten wurden Wandablagerungen in die Teigmasse zurückgeführt. Die Teigmasse wurde in verschiedenen Aluschalen über Nacht bei 40 °C getrocknet. Der entstandene Feuchteverlust und die dadurch bedingte Aufkonzentrierung wurde bei der Berechnung der tatsächlichen Ist-Konzentrationen der einzelnen Enzyme einbezogen. Hierbei ergibt sich der Trocknungsverlust (TV) wie folgt:

$$\text{Gleichung 4: } TV = \frac{\text{Massenabnahme [g]}}{\text{Einwaage [g]}} \cdot 100$$

Die Konzentration nach Trocknung wird wie folgt berechnet:

$$\text{Gleichung 5: } \text{Konzentration nach Trocknung} = \frac{\text{Konzentration vor Trocknung}}{100-TV} \cdot 100$$

In Tabelle 12 ist der Gewichtsverlust durch Vortrocknung des Referenzmaterials Mehl aufgelistet und die Ist-Konzentration berechnet.

Tabelle 12: Berechnung der Ist-Konzentration aller Enzyme im Referenzmaterial Mehl

N=4; TV: Trocknungsverlust; Konz. Konzentration; MW: Mittelwert

| Bezeichnung | Einwaage [g] | TV [g/100g] | Konz. vor Trocknung [mg/kg] | Konz. nach Trocknung [mg/kg] | MW [mg/kg] |
|-------------|-----------------|----------------|--------------------------------|---------------------------------|---------------|
| | 99,73 | 50,16 | | 401 | |
| Mehl | 104,20 | 51,33 | 200 | 411 | 412 |
| 400 mg/kg | 72,13 | 51,88 | | 416 | |
| | 89,63 | 52,61 | | 422 | |

Mit Hilfe der aus Abschnitt 3.3 ermittelten bzw. aufgelisteten Proteingehalte der zu den Referenzmaterialien zugefügten technischen Enzyme wurden die Ist-Konzentrationen der einzelnen Enzyme *alpha*-Amylase, Endo-1,4-Xylanase und Lipase im Mehl berechnet (Tabelle 13).

Tabelle 13: Ermittelte Endkonzentrationen der jeweiligen Enzyme im Referenzmaterial Mehl

MW: Mittelwert

| Bezeichnung | MW (Tabelle 12) [mg/kg] | <i>alpha</i> -Amylase [mg/kg] | Endo-1,4-Xylanase [mg/kg] | Lipase [mg/kg] |
|----------------|----------------------------|----------------------------------|------------------------------|-------------------|
| Mehl 400 mg/kg | 412 | 53,19 | 21,42 | 7,42 |

Für die weitreichende Prüfung der quantitativen Methode wurde enzymfreies Mehl mit enzymhaltigem Mehl gemischt. Es wurden vier verschiedene Konzentrationslevel hergestellt, extrahiert, quantifiziert und Wiederfindungsraten berechnet (Tabelle 14). Weiterhin wurde das enzymfreie Mehl (Nullprobe) analysiert.

Tabelle 14: Ermittelte Endkonzentrationen der jeweiligen Enzyme in Level 0-4 (Mehl)

| Probe | <i>alpha</i> -Amylase [mg/kg] | Endo-1,4-Xylanase [mg/kg] | Lipase [mg/kg] |
|----------------|-------------------------------|---------------------------|----------------|
| Mehl Nullprobe | 0 | 0 | 0 |
| Mehl Level 1 | 2,58 | 1,04 | 0,36 |
| Mehl Level 2 | 9,03 | 3,64 | 1,26 |
| Mehl Level 3 | 19,35 | 7,80 | 2,70 |
| Mehl Level 4 | 38,70 | 15,60 | 5,40 |

2.2.4.3 Prozessierte Referenzmatrix - Toastbrot

Für die Herstellung der Referenzmaterialien der Kategorie Brot wurde eine Toastbrot-Rezeptur verwendet und Vormischungen aus Weizenmehl und Enzymzusatz (Tabelle 15) eingewogen.

Tabelle 15: Einwaage der Enzyme in Weizenmehl (Vormischung) für Referenzmaterial Brot

| Bezeichnung | Enzymzusatz [g] | | | Weizenmehlzusatz [g] |
|----------------|-----------------|--------------|-------------|----------------------|
| | Fungamyl | Lipase FE-01 | Amylase TXL | Mehl für Vormischung |
| Brot Nullprobe | 0 | 0 | 0 | 10,000 |
| Brot Probe 1 | 0,025 | 0,025 | 0,025 | 9,925 |
| Brot Probe 2 | 0,100 | 0,100 | 0,100 | 9,700 |
| Brot Probe 3 | 0,250 | 0,250 | 0,250 | 9,250 |
| Brot Probe 4 | 0,500 | 0,500 | 0,500 | 8,500 |

Die Einwaage erfolgte in verschließbare Kunststoffbecher, beginnend mit Weizenmehl. Die Einwaage von Fungamyl erfolgte auf einem Kjeldahl-Wägeschiffchen, welches abschließend mit 15 g Mehl direkt in den Kunststoffbecher abgespült wurde. Lipase FE-01 (Flüssigkeit) und Amylase TXL (Flüssigkeit) wurden direkt in den jeweiligen Kunststoffbecher eingewogen. Die Voreinwaage betrug 25 g. Die Vormischungen wurden mit dem restlichen Mehl während des Knetprozesses aus den Kunststoffbechern gewaschen. Die Rezeptur ist in Tabelle 16 beschrieben.

Tabelle 16: Rezeptur für Referenzmaterial Brot

| Bestandteil | Masse [g] |
|---|-----------|
| Weizenmehl Typ 405, exklusive Voreinwaage | 1382 |
| Reinfett | 68 |
| Zucker | 27 |
| Salz | 41 |
| Hefe | 68 |
| Wasser | 889 |

Die Teige wurde in 2 Stufen (2 Minuten langsam, 6 Minuten schnell) bei etwa 27 °C mit dem Teigknetter homogenisiert. Nach jedem Schritt wurde der jeweilige Teig 10 Minuten ruhen gelassen. Es folgte eine weitere Ruhephase des Teiges für 60 Minuten bei 32 °C und 75 % Luftfeuchtigkeit, bevor die Teige bei 220 °C für 35 Minuten gebacken wurden. Die Brote wurden in verschiedenen Aluschalen über Nacht bei 40 °C getrocknet und der Wasserverlust analog zu 2.2.4.2 ermittelt.

In Tabelle 17 sind der Gewichtsverlust durch Vortrocknung des Referenzmaterials Brot und die berechnete Ist-Konzentration aufgelistet.

Tabelle 17: Berechnung der Ist-Konzentration aller Enzyme im Referenzmaterial Brot

N=3; TV: Trocknungsverlust; Konz. Konzentration; MW: Mittelwert

| Bezeichnung | Einwaage [g] | TV [g/100g] | Konz. vor Trocknung [mg/kg] | Konz. nach Trocknung [mg/kg] | MW [mg/kg] |
|-----------------|-----------------|----------------|--------------------------------|---------------------------------|---------------|
| Brot Probe 1 | 72,50 | 32,41 | 10 | 15 | 15 |
| | 72,83 | 29,04 | | 14 | |
| | 71,73 | 32,05 | | 15 | |
| Brot Probe 2 | 72,84 | 33,39 | 40 | 60 | 59 |
| | 76,45 | 29,82 | | 57 | |
| | 69,59 | 33,02 | | 60 | |
| Brot Probe 3 | 77,84 | 33,02 | 100 | 149 | 149 |
| | 74,93 | 33,02 | | 149 | |
| | 81,63 | 32,11 | | 147 | |
| Brot Probe 4 | 80,05 | 32,17 | 200 | 295 | 301 |
| | 80,80 | 34,15 | | 304 | |
| | 78,16 | 34,34 | | 305 | |

Mit Hilfe der aus Abschnitt 3.3 ermittelten bzw. aufgelisteten Proteingehalte der zu den Referenzmaterialien zugefügten technischen Enzyme wurden die Ist-Konzentrationen der jeweiligen Enzyme *alpha*-Amylase, Endo-1,4-Xylanase und Lipase im Brot berechnet (Tabelle 18).

Tabelle 18: Ermittelte Endkonzentrationen der jeweiligen Enzyme in Probe 0-4 (Brot)

MW: Mittelwert

| Probe | MW (Tabelle 17) [mg/kg] | <i>alpha</i> -Amylase [mg/kg] | Endo-1,4-Xylanase [mg/kg] | Lipase [mg/kg] |
|----------------|----------------------------|----------------------------------|------------------------------|-------------------|
| Brot Nullprobe | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Brot Probe 1 | 15 | 1,94 | 0,78 | 0,27 |
| Brot Probe 2 | 59 | 7,61 | 3,07 | 1,06 |
| Brot Probe 3 | 149 | 19,22 | 7,75 | 2,68 |
| Brot Probe 4 | 301 | 38,83 | 15,65 | 5,42 |

2.2.4.4 Prozessierte Referenzmatrix - Biskuitkeks

Es wurden je 10 g Weizenmehl in 3 Kunststoffbecher eingewogen. Die Einwaage von 200 mg Fungamyl erfolgte auf einem Kjeldahl-Wägeschiffchen, welches mit 5,4 g Mehl direkt in den Kunststoffbecher abgespült wurde. Je 200 mg Lipase FE-01 (Flüssigkeit) und Amylase TXL (Flüssigkeit) wurden direkt in den zweiten bzw. dritten Kunststoffbecher eingewogen. Die Voreinwaage betrug 36 g. 225 g Mehl wurden direkt in den Thermomix eingewogen und die Voreinwaage mit den Enzymgemischen zugegeben. Die Kunststoffbecher wurden insgesamt mit 100 ml Wasser direkt in den Thermomix ausgespült. Weiterhin wurden 9 g Backpulver, 100 g Zucker sowie 100 g Sonnenblumenmargarine direkt in den Thermomix eingewogen. Der Keksteig wurde eine Stunde auf Stufe 1 gerührt und alle 15 Minuten Wandablagerungen in die Teigmasse zurückgeführt. Die Kekse wurden 13 Minuten bei 190 °C gebacken und nach einer Stunde abkühlen zerkleinert. Die Proben wurden im Gegensatz zu den Matrices Mehl und Brot nicht vorgetrocknet.

Die Kekse wurden vor und nach dem Backprozess auf dem Backpapier gewogen und so die Ist-Konzentration des kompletten gebackenen Produktes (im Gegensatz zur Summe von mehreren Trocknungsschalen bei Mehl und Brot) berechnet (Tabelle 19).

Tabelle 19: Berechnung der Ist-Konzentration aller Enzyme im Referenzmaterial Keks

Konz.: Konzentration

| Bezeichnung | Einwaage [g] | Verlust beim Backen [g/100g] | Konz. vor dem Backen [mg/kg] | Konz. nach dem Backen [mg/kg] |
|----------------|--------------|------------------------------|------------------------------|-------------------------------|
| Keks 400 mg/kg | 526,73 | 18,24 | 400 | 489 |

Mit Hilfe der aus Abschnitt 3.3 ermittelten bzw. aufgelisteten Proteingehalte der zu den Referenzmaterialien zugefügten technischen Enzyme wurden die Ist-Konzentrationen der jeweiligen Enzyme *alpha*-Amylase, Endo-1,4-Xylanase und Lipase im Keks berechnet (Tabelle 20).

Tabelle 20: Ermittelte Endkonzentrationen der jeweiligen Enzyme im Referenzmaterial Keks

MW: Mittelwert

| Probe | MW (Tabelle 19) [mg/kg] | <i>alpha</i> -Amylase [mg/kg] | Endo-1,4-Xylanase [mg/kg] | Lipase [mg/kg] |
|----------------|-------------------------|-------------------------------|---------------------------|----------------|
| Keks 400 mg/kg | 489 | 63,10 | 21,42 | 8,80 |

Für die weitreichende Prüfung der quantitativen Methode wurden enzymfreie Kekse mit enzymhaltigen Keksen gemischt. Es wurden vier verschiedene Konzentrationen hergestellt, extrahiert, quantifiziert und Wiederfindungsraten berechnet (Tabelle 21). Weiterhin wurde der enzymfreie Keks analysiert.

Tabelle 21: Ermittelte Endkonzentrationen der jeweiligen Enzyme in Level 0-4 (Keks)

| Probe | <i>alpha</i> -Amylase [mg/kg] | Endo-1,4-Xylanase [mg/kg] | Lipase [mg/kg] |
|----------------|-------------------------------|---------------------------|----------------|
| Keks Nullprobe | 0 | 0 | 0 |
| Keks Level 1 | 2,58 | 1,04 | 0,36 |
| Keks Level 2 | 9,03 | 3,64 | 1,26 |
| Keks Level 3 | 19,35 | 7,80 | 2,70 |
| Keks Level 4 | 38,70 | 15,60 | 5,40 |

2.2.5 Nachweis technischer Enzyme mittels LC-(ESI)-MS/MS-QTRAP

Die unbekannte Proteinsequenz des technischen Enzymgemisches wurde mit Hilfe einer SDS-Gelelektrophorese und anschließendem In-Gel-Verdau über die Messung mittels MALDI-TOF-MS und der dazugehörigen Datenbankauswertung identifiziert (2.2.2). Die daraus erhaltene Aminosäuresequenz wurde mit Hilfe der Software Skyline (Version 2.1.0.4936) theoretisch verdaut. Die so erhaltenen Peptidmassen wurden in Fragmentationen zerlegt und eine MRM-Methode erstellt. Es wurden Proben mit einem deutlichen Gehalt des Enzymgemisches nach dem In-Lösung-Verdau extrahiert und mit der MRM-Methode gemessen. Zusätzlich zur Messung definierter Massenübergänge erfolgte zeitgleich eine Aufnahme von Massenspektren im Massenbereich von 400 bis 1250 Da. Dies ermöglichte den Spektrenabgleich der Positivprobe mit der Protein-Software

Mascot (Version: 1.6b27, Matrix Science, London, UK). Durch den Abgleich des Datenfiles mit der Datenbank SwissProt [152] konnten geeignete Markerpeptide für die jeweilige Proteinsequenz ausgewählt werden. Es wurden je Protein mindestens zwei spezifische Peptide mit bestmöglicher Intensität ausgewählt. Jedes Peptid wurde mit mindestens 3 Massenübergängen qualitativ abgesichert.

2.2.5.1 Auswahl geeigneter Markerpeptide

Einige Hersteller technischer Enzyme veröffentlichen Datenblätter mit der Angabe des Enzyms und Syntheseorganismus. Die Identifikation unbekannter Proteinsequenzen eines technischen Enzymgemisches wurde in Abschnitt (2.2.2) beschrieben. Die eindeutig abgesicherte Aminosäuresequenz des technischen Enzyms ist nötig, um geeignete Markerpeptide auszuwählen.

Theoretischer Verdau der Proteinsequenz

Mit Hilfe der Software Skyline wurde die bekannte Aminosäuresequenz theoretisch verdaut. Um eine ausreichende Spezifität und Sensitivität zu sichern, müssen Einstellungen zur Auswahl der synthetischen Peptide vorgenommen werden. Die Einstellungen unterteilen sich in *Peptide Settings* (*digestion enzyme*: Trypsin; *Max missed cleavages*: 0; *Min length*: 8; *Max length*: 25; *Exclude peptides containing*: Met; Cys) und *Transition Settings* (Tabelle 22). Sollten mit diesen Einstellungen keine geeigneten Markerpeptide für das Enzym gefunden werden, wurde die Einstellung „*Min length*:“ auf 6 reduziert. Die minimale Peptidlänge sollte 6 Aminosäuren betragen, da sonst keine ausreichende Spezifität mehr gesichert werden kann. Weiterhin kann auf die Einstellung „*Exclude peptides containing*: Met; Cys“ verzichtet werden. Während der Extraktion (Iodacetamid, Dithiotreitol) entstehende Aminosäuremodifizierungen durch Carbamidomethylierung (Cystein) bzw. Oxidation (Methionin) führen zu Verschiebungen der Massenübergänge der Peptide [153]. Dies muss beim Erstellen der MRM-Methode beachtet werden. Insofern möglich, werden für die Messung die stabileren C-terminalen y-Ionen verwendet. In Ausnahmefällen können auch b-Ionen verwendet werden. b-Ionen sind instabil und zerfallen in a-Ionen und Kohlenmonoxid oder sie bilden Oxazolone [125].

Tabelle 22: Skyline - Transition settings

y: y-Ionen; b: b-Ionen; m/z: Masse-zu-Ladungsverhältnis

| | | |
|-------------------|--|--|
| Filter | <i>Precursor charges</i> | 2,3 |
| | <i>Ion charges</i> | 1,2 |
| | <i>Ion types</i> | y, b (in Ausnahmefällen) |
| | <i>Product ions</i> | <i>From: (m/z > precursor)-1</i> <i>To: 3 ions</i> |
| Library | <i>Ion match tolerance</i> | 0,5 m/z |
| | <i>Pick product ions from filtered ion charges and types</i> | 3 |
| Instrument | <i>Min m/z</i> | 400 |
| | <i>Max m/z</i> | 1250 |
| | <i>Method match tolerance m/z</i> | 0,055 |

LC-MS/MS-Methode

Es wurde eine HPLC-Methode mit dem UltiMate 3000 BioRS System erstellt. Zur Trennung der Peptide wurde die speziell für die Peptidanalytik produzierte Säule „Aeris Peptide 1.7 µm XB-C18 (100 x 2,1 mm)“ verwendet. Die wässrige Phase bestand aus destilliertem Wasser mit 0,1 % Ameisensäure, LCMS grade (Eluent A), die organische Phase bestand aus Acetonitril mit 0,1 % Ameisensäure, LCMS grade (Eluent B). Diese Eluenten wurden für die Peptidsäule vom Hersteller empfohlen. Es wurde ein Gradientenprogramm (Tabelle 23) erstellt. Die Temperatur des Säulenofens betrug 35 °C; die Temperatur des Autosamplers 10 °C. Das Injektionsvolumen betrug 5 µl.

Tabelle 23: Gradientenprogramm der HPLC-Messung

min: Minute; Eluent A: 0,1 % Ameisensäure; Eluent B: Acetonitril mit 0,1 % Ameisensäure

| Zeit [min] | Fluss [ml/min] | Eluent A [%] | Eluent B [%] |
|------------|----------------|--------------|--------------|
| 0,0 | 0,3 | 95 | 5 |
| 10,0 | 0,3 | 75 | 25 |
| 10,1 | 0,3 | 5 | 95 |
| 11,0 | 0,3 | 5 | 95 |
| 11,1 | 0,3 | 95 | 5 |
| 20,0 | 0,3 | 95 | 5 |

Die Messung erfolgte im MRM-Modus. Je Peptid wurden mindestens 3 Übergänge in die Massentabelle übertragen und mit den theoretisch berechneten Energien gemessen. Die Messung der ausgewählten Massenübergänge erfolgte über die komplette Laufzeit der Methode (20 Minuten). Es wurde im Modus ESI positiv gemessen. Weitere Einstellungen waren wie folgt: *Curtain Gas*: 35 psi; *Collision Gas*: high; *Ion Spray Voltage*: 4500 V; *Ion source Gas 1/2*: 50 psi.

Mit dem *Enhanced Product Ion Scan* (EPI) wurde ein weiteres Experiment zur MRM-Methode zugefügt (Tabelle 24). Dieses ermöglichte zeitgleich die Aufnahme qualitativ hochwertiger Massenspektren von im MRM-Experiment spezifisch gemessenen Vorläuferionen (Markerpeptiden). Es wurden folgende Einstellungen für das EPI-Experiment vorgenommen:

Tabelle 24: Einstellungen für EPI Experiment

sec: seconds; min: minimal

| | |
|---------------------|--|
| IDA criteria | <i>Select 1 to 3 most intense peaks</i> <i>Exclude former target ions after 3 occurrence(s) for 30 sec.</i> <i>Rolling collision energy</i> <i>min. counts: 500</i> |
| EPI | Massenbereich: 230-1000 <i>Advanced: dynamic fill time</i> Scanrate: 10000 Da/s |

In-Lösung-Verdau

Für den In-Lösung-Verdau wurde je 1 g Enzymgemisch (Positiv-Probe) in 10 ml Extraktionspuffer, welcher Harnstoff und Dithiothreitol (DTT) enthält, gelöst und ein aliquoter Teil mit Iodacetamid (IAA) inkubiert. Das ausgewählte Einwaage-Puffer-Verhalten zeigte in vorherigen Versuchen optimale Extraktionsausbeuten. Die durch den Harnstoff bedingte Reduzierung der Wasserstoffbrücken-

bindungen ermöglicht die erleichterte Reduzierung der Disulfidbrückenbindungen durch DTT, welche durch das Alkylierungsmittel IAA stabilisiert wurden. Der Erfolg der Extraktion wurde durch die Zugabe eines internen Standardproteins sowie isotonenmarkierter Peptidstandards zum Beginn der Extraktion kontrolliert.

Vor der Zugabe der aktivierten Trypsinlösung wurde die Probe mit Verdauerpuffer, welcher Ammoniumbicarbonat enthielt, auf das pH-Optimum von 7-8 eingestellt. Der Verdau wurde über Nacht bei 37 °C durchgeführt. Der Reaktionsabbruch erfolgte nach etwa 18 Stunden durch Zugabe von Ameisensäure (10 % v/v). Der verdaute Extrakt wurde unter Nutzung einer C-18 Festphasensäule (SPE) gereinigt und aufkonzentriert. Die ausgewählten Volumina für die Aktivierung sowie Spülung der SPE-Säule und das Elutionsvolumen der Peptide wurden in Vorversuchen getestet und optimiert. Abschließend erfolgte ein Lösungsmittelwechsel um bestmögliche Bedingungen für die Chromatographie zu schaffen. Eine detailliertere Beschreibung des In-Lösung-Verdaus ist in Abbildung 12 gezeigt.

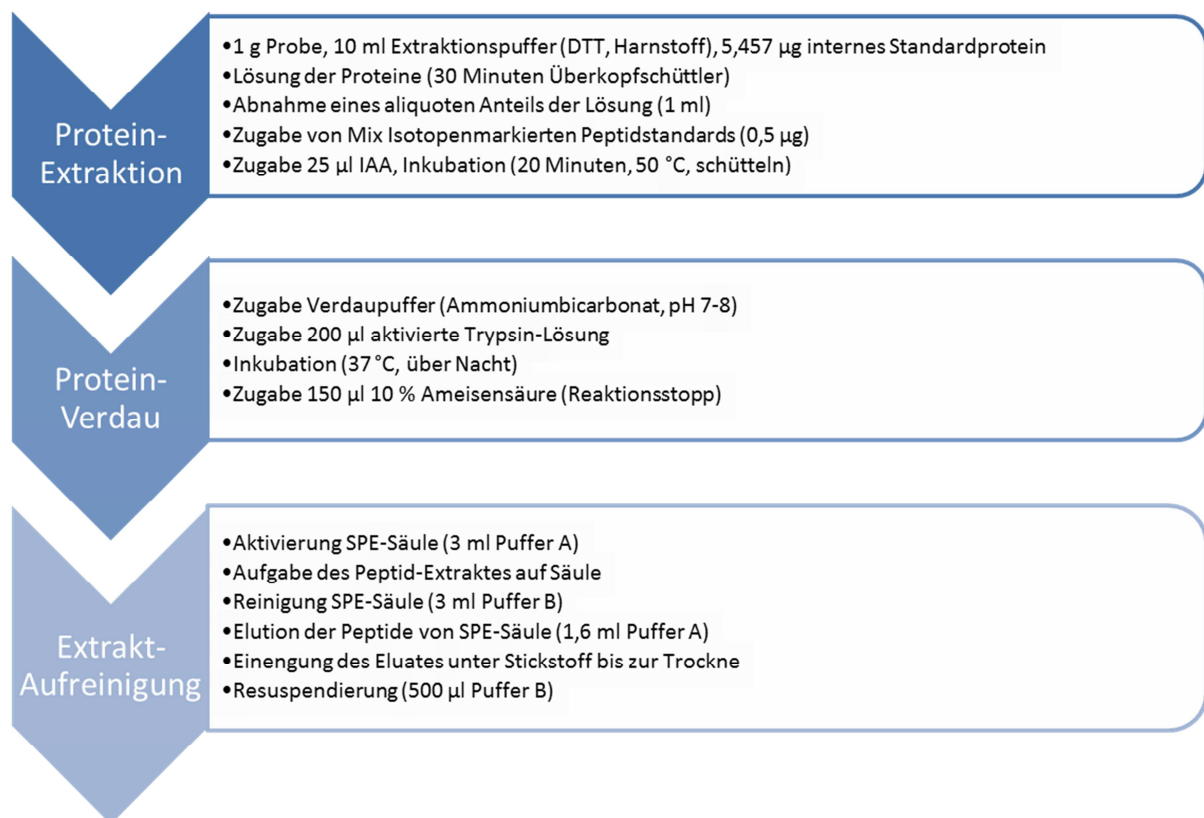


Abbildung 12: Übersicht der Extraktion mit Trypsin-Verdau über Nacht

DTT: Dithiothreitol; IAA: Iodacetamid; SPE: Festphasenextraktion; Puffer A: 50 % Acetonitril, 0,1 % Ameisensäure; Puffer B: 0,1 % Ameisensäure

Weiterhin wurde der In-Lösung-Verdau mittels Temperaturprogramm durchgeführt. Hierfür wurde die Proteinextraktion und -aufreinigung analog zu Abbildung 12 durchgeführt. Der Protein-Verdau wurde mit einem Temperaturprogramm im Thermoblock zeitlich verkürzt. Für die bestmögliche Abschätzung der zeitlichen Intervalle des Trypsinverdaus wurden zuvor publizierte Methoden herangezogen [154]. Die Anfangstemperatur von 37 °C wurde nach 3 Minuten auf 52 °C erhöht und erneut für 3 Minuten gehalten. Es folgten weitere acht Intervallschritte von 37 °C auf 52 °C für je 3

Minuten. Während der gesamten Verdau-Zeit wurden die Proben leicht geschüttelt. Der Reaktionsabbruch erfolgte durch Zugabe von Ameisensäure (10 % v/v).

Abgleich der Peptide mit Proteindatenbanken

Die nach dem Proteinverdau erhaltenen Peptid-Extrakte einer Positivprobe (z. B. 1 g Fungamyl oder 1 g Lipase FE-01) wurden mit den unter 2.2.5.1 beschriebenen Messbedingungen gemessen. Die mit Hilfe der EPI-Messung generierten Peptid-Spektren wurden mit der Software Mascot (Matrix Science, London, UK) und folgenden Kriterien (Tabelle 25) abgeglichen [126].

Tabelle 25: Mascot Einstellungen vor Spektren-Abgleich

| Parameter | Einstellungen | Parameter | Einstellungen |
|----------------------------------|---------------------|--------------------------|---------------|
| erlaubte <i>missed-cleavages</i> | 1 | Variable Modifizierungen | Oxidation (M) |
| Peptidtoleranz | 0,6 Da | Peptidladung | 2+; 3+ |
| MS/MS Toleranz | 0,6 Da | Massenspektrometer | ESI-TRAP |
| Feste Modifizierungen | Carbamidomethyl (C) | Datenbank | Swissprot |

Ein Protein gilt als eindeutig identifiziert wenn der „individual ion score“ > 39 % beträgt. Im Mascot Report wurden dem identifizierten Protein Peptide untergeordnet, anhand derer die eindeutige Zuordnung von Massenspektren zum Protein erfolgte. Diese Peptide wurden für die qualitative Methode ausgewählt. Mindestens zwei Peptide je technisches Enzym mussten eindeutig zugeordnet sein. Bei größerer Auswahl an spezifischen Peptiden wurden die Peptide mit dem intensivsten Messsignal für die Erstellung der Analysemethode ausgewählt.

2.2.5.2 Scheduled MRM-Methode

Die HPLC-Einstellungen waren analog zu 2.2.5.1. Es erfolgte die Messung im scheduled MRM-Modus. Hierbei wurden je Enzym mindestens zwei Peptide mit je 3 Massenübergängen in die MRM-Tabelle übertragen. Mit Hilfe der synthetischen Peptidstandards wurden die Energien (*Declustering Potential* für das Mutterion sowie *Collision Energy* für das jeweilige Tochterion) optimiert und in der MRM-Methode hinterlegt. Die Messung der ausgewählten Massenübergänge erfolgte mit der scheduled Einstellung, d.h. dass die jeweilige Massenspur bei der Retentionszeit +/- 60 Sekunden aufgenommen wurde, was eine höhere Messzeit je Massenübergang (dwell time) ermöglicht. Dies verbesserte die Analyse im Spurenbereich, da die Sensitivität des Signals erhöht wurde. Es wurde im Modus ESI positiv mit folgenden Einstellungen gemessen: Curtain Gas: 35 psi; Collision Gas: high; *Ion Spray Voltage*: 4500 V; *Ion source Gas 1/2*: 50 psi. Tabelle A 23 (Anhang) enthält alle Informationen der MRM-Methode.

2.2.5.3 Kalibrierung

Es wurde eine interne Kalibrierung mit dem ISTD-Peptid als interner Standard durchgeführt. Hierfür wurde eine Kalibrierreihe aus ansteigenden Konzentrationen der synthetischen Peptide (Punkt 1 bis Punkt 6) aber gleichbleibender Konzentration an ISTD-Peptid (2 mg/kg) sowie isotopenmarkierter Peptide (1 mg/kg) in 0,1 % Ameisensäure hergestellt und unter den genannten Bedingungen gemessen (Tabelle 26). Es wurde das Flächenverhältnis (Fläche Analyt zu Fläche ISTD-Peptid) jedes Standardpunktes ermittelt und eine lineare Kalibriergerade erstellt. Die daraus resultierenden

linearen Parameter wurden für die Berechnung der Konzentrationen der extrahierten Referenzmaterialien genutzt.

Es wurden weiterhin die synthetischen isotope markierten Standardpeptide hinzugegeben, um die Retentionszeit und die qualitative Prüfung der Analyten abzusichern.

Tabelle 26: Endkonzentrationen der jeweiligen technischen Enzyme in der Kalibrierreihe

KP: Kalibrierpunkt; Konz.: Konzentration

| KP | Konz. Peptid [mg/kg] | Konz. <i>alpha</i> -Amylase [mg/kg] | Konz. Endo-1,4-Xylanase [mg/kg] | Konz. Lipase [mg/kg] |
|----|-------------------------|--|------------------------------------|-------------------------|
| 1 | 0,0005 | 0,0329 | 0,0124 | 0,01709 |
| 2 | 0,0010 | 0,0658 | 0,0248 | 0,03418 |
| 3 | 0,0020 | 0,1316 | 0,0495 | 0,06836 |
| 4 | 0,0100 | 0,6579 | 0,2476 | 0,3418 |
| 5 | 0,0200 | 1,3158 | 0,4952 | 0,6836 |
| 6 | 0,0400 | 2,6316 | 0,9904 | 1,3672 |

2.2.5.4 Quantifizierung mit internem Standardprotein

Es wurden die in 2.2.5.1 als Marker gewählten Peptide synthetisch hergestellt (Firma Peptides & Elephants, Golm, Deutschland). Zusätzlich erfolgte die Synthese der entsprechenden Peptide mit Isotopenmarkierung sowie die Synthese des internen Standard-Peptids (ISTD-Peptid). Die synthetischen Peptide wurden gelöst und in ansteigender Konzentration zur Herstellung einer Kalibrierreihe eingesetzt. Die isotope markierten Peptide als auch das ISTD-Peptid wurden dieser in konstanten Mengen zugesetzt. Es folgte die Messung der Kalibrierreihe sowie der verdauten Extrakte der Referenzmaterialien (2.2.4). Anhand der Kalibrierreihe wurden die Enzymgehalte der Referenzmaterialien berechnet und die Eignung der Methode zum quantitativen Nachweis geprüft. Abbildung 13 zeigt eine Übersicht der eingesetzten internen Standards zu Kalibrierung und Extraktion.

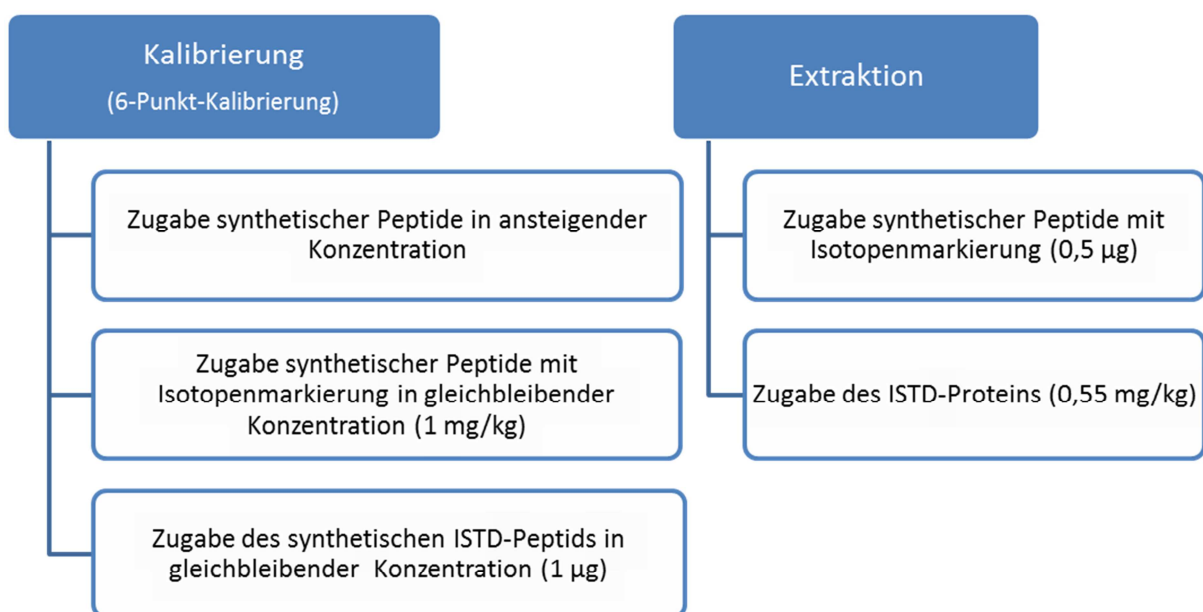


Abbildung 13: Schema der eingesetzten Standards für die Quantifizierung

Für die Analyse wurden Peptide durch die Firma Peptides & Elephants synthetisiert (Tabelle 27).

Tabelle 27: Synthetische Peptidstandards (Markerpeptide)

ISTD: Interner Standard

| Bezeichnung Protein | Bezeichnung Peptid | Aminosäuresequenz | Aliquot |
|--------------------------|--------------------|-------------------------|---------|
| internes Standard-Peptid | ISTD-Peptid | EGDSSVANSGLAALITDGPGGAK | 2,4 mg |
| <i>alpha</i> -Amylase | Amylase 411 | NWPIYK | 2,2 mg |
| Endo-1,4-Xylanase | Xylanase 493 | GWNPGLNAR | 2,5 mg |
| Lipase | Lipase 465 | SGTLVPVTR | 2,0 mg |

Die Peptide wurden in einer Eingangskontrolle überprüft (Beispiel Abbildung 14). Hierfür wurde im Infusionsexperiment der Molekülionenpeak gesucht und die Ladung dieses über den Abstand der Isotopenpeaks des Molekülionenpeaks im ER-Experiment geprüft. Exemplarisch ist die Peptid-Eingangskontrolle am Peptid NWPIYK in Abbildung 14 dargestellt.

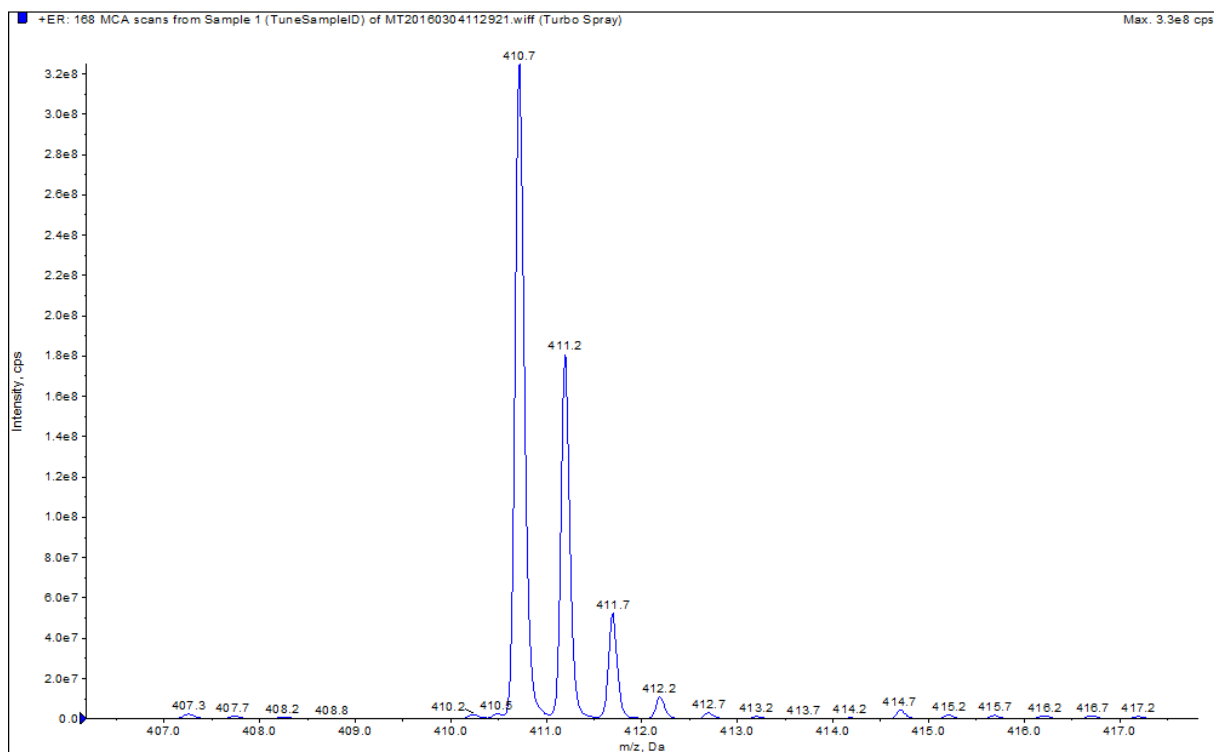


Abbildung 14: Peptid-Eingangskontrolle des Molekülionenpeaks 410,7 (Peptid NWPIYK) mittels Infusionsexperiment und Enhanced Resolution (ER)

y-Achse: Intensität in cps; x-Achse: Retentionszeit in Minuten; dargestelltes Peptid mit $m/z = 410,7$ weist eine 2-fach-Ladung auf, da der Abstand zu den weiteren C13-Isotopenpeaks jeweils 0,5 m/z beträgt (411,2 und 411,7); m/z : Masse-zu-Ladungsverhältnis

Die lyophilisierten synthetischen Peptide wurden gelöst (SL, Anhang Tabelle A 20) und in einer Verdünnungslösung (VL1) zusammen gefügt. Für bestmögliche quantitative Werte im Spurenbereich wurden weitere Verdünnungslösungen (VL2, VL3) hergestellt (Anhang Tabelle A 20).

Zusätzlich wurden die in Anhang Tabelle A 21 aufgeführten Peptide mit einer Isotopenmarkierung durch die Firma Peptides & Elephants synthetisiert. Hierbei wurde die Aminosäure Arginin mit der Markierung $^{13}C_6$; $^{15}N_4$ versetzt. Insofern das jeweilige Peptid mit der Aminosäure Lysin endete,

erfolgte die Markierung mit ¹³C₆; ¹⁵N₂. Es kam zu einer Massenverschiebung von 10 Da (Arginin) bzw. 8 Da (Lysin). Da die für den Proteinverdau eingesetzte Protease Trypsin nach den Aminosäuren Arginin bzw. Lysin schneidet, befindet sich die Markierung automatisch an letzter Stelle. Die isotope markierten Peptide dienen hauptsächlich der qualitativen Prüfung mittels LC-MS/MS da sie die identischen Retentionszeiten aufzeigen wie die Markerpeptide. Die Retentionszeit der Markerpeptide konnte exakt bestimmt werden und der Analytpeak zweifelsfrei für die Quantifizierung ausgewählt werden. Bei Proben die starke Matrixsignale zeigten, konnten falsch positive Befunde ausgeschlossen werden. Zusätzlich wurde eine Quantifizierung über isotope markierte Standards geprüft.

Die synthetischen Peptide *heavy* wurden gelöst (SL, Anhang Tabelle A 22) und in einer Verdünnungslösung (VL1) zusammengefügt. Es wurde eine weitere Verdünnungslösung (VL2) hergestellt (Tabelle A 22).

Als interner Proteinstandard wurde ein Enzym ausgewählt und der Extraktion zugesetzt um den Erfolg des Proteinverdau zu kontrollieren sowie mögliche Matrixeffekte zu minimieren. Die *alpha*-Amylase des *Bacillus licheniformis* wurde von der Firma Sigma-Aldrich (St. Louis, U.S.A) bezogen und daraus eine Arbeitslösung hergestellt (54,57 mg in 10 ml Extraktionspuffer (Tabelle A 2)). 100 µl der Arbeitslösung wurden zur Einwaage pipettiert und dem kompletten Verdau-Prozess unterzogen. Es wurde ein durch den Trypsinverdau abgespaltenes Markerpeptid des ISTD-Proteins als interner Standard ausgewählt (ISTD-Peptid). Dieses ISTD-Peptid wurde von der Firma Peptides & Elephants synthetisiert und der Kalibrierreihe zugesetzt. Es war möglich einen Flächenbezug auf das ISTD-Peptid sowohl für die Extrakte als auch für die Kalibrierreihe vorzunehmen.

2.2.5.5 Quantifizierung mit Matrix-Kalibrierung

Zur Prüfung der quantitativen Werte des Referenzmaterials Mehl wurde zusätzlich zur Kalibrierung nach 2.2.5.3 eine Matrix-Kalibrierung durchgeführt. Hierfür wurde eine Lösung von Fungamyl in Extraktionspuffer (Tabelle A 2, 1 mg/ml) hergestellt und in ansteigender Menge (0 µl, 10 µl, 50 µl, 100 µl, 200 µl und 500 µl) zu sechs Mehleinwaagen (je 1 g) zugefügt. Die Proben wurden nach dem In-Lösung-Verdau extrahiert und mit den bekannten LC-MS/MS-Bedingungen gemessen. Aus den erhaltenen Peakflächen wurde eine Matrix-Kalibriergerade erstellt. Zusätzlich erfolgte die Extraktion und Messung der 5 Konzentrationen des Referenzmaterials Mehl (2.2.4.2), sowie die anschließende Quantifizierung mit Hilfe der erstellten Matrix-Kalibrierreihe. Analog zu 2.2.5.3 wurden sowohl isotope markierte Peptidstandards als auch das interne Standardprotein mitgeführt.

2.2.5.6 Quantifizierung mit Standardadditionsverfahren

Zur weiteren Prüfung der quantitativen Werte des Referenzmaterials Mehl wurde zusätzlich zur Kalibrierung nach 2.2.5.3 sowie zur Matrix-Kalibrierung 2.2.5.5 eine Quantifizierung mit Standardadditionsverfahren durchgeführt (Probe Mehl 1 und Mehl 4). Hierfür wurden je 3 Proben des Mehls bekannter Konzentration eingewogen (1 g) und mit einer ansteigenden Menge an Fungamyl dotiert (0 mg, 10 mg, 20 mg). Die Proben wurden nach dem In-Lösung-Verdau extrahiert und mit den bekannten LC-MS/MS-Bedingungen gemessen. Aus den erhaltenen Peakflächen wurde eine Kalibriergerade erstellt und mittels linearer Regression der Gehalt der undotierten Proben ermittelt. Analog zu 2.2.5.3 wurden sowohl isotope markierte Peptidstandards als auch das interne Standardprotein mitgeführt.

2.2.5.7 Quantifizierung mit isotope markierten Peptidstandards

Die Referenzmaterialien Mehl, Brot und Keks wurden mit einem In-Lösung-Verdau über Nacht mit Trypsin verdaut (2.2.5.1) und über die isotope markierten Peptide des jeweiligen Enzyms als interner Standard quantifiziert. Um die Auswirkungen dieser Quantifizierungsvariante auf die Richtigkeit zu prüfen, wurden die Wiederfindungsraten (WFR) ermittelt und mit denen der Quantifizierung mit ISTD-Protein verglichen.

2.2.6 Validierung der Methode

Die Validierung der Methode bestand aus verschiedenen Prüfbereichen, dessen vorher festgelegte Kriterien erfüllt sein mussten. Die Methode wurde nach den Anforderungen der DIN EN ISO/IEC 17025 geprüft und damit eine sichere Ergebnisangabe gewährleistet. Die vorher festgelegten Prüfkriterien wurden mit Hilfe von Standard-Kalibrierreihen (Tabelle 26) sowie Referenzmaterialien (2.2.4) geprüft und statistisch ausgewertet. Art der Prüfung, Durchführung und Kriterien sind in Tabelle 28 zusammengefasst.

Tabelle 28: Prüfung, Durchführung und zuvor festgelegte Kriterien der Validierung der LC-MS/MS-Methode zum Nachweis technischer Enzyme

MW: Mittelwert; SD: Standardabweichung; RSD: relative Standardabweichung; N: Anzahl der Messungen; R^2 : Bestimmtheitsmaß; PG: Prüfgröße; PW: Prüfwert; RM: Referenzmaterialien; RSD_r : Wiederholpräzision; RSD_{WR} : Laborpräzision; WFR: Wiederfindungsrate; S/N: Signal-Rausch-Verhältnis; BG: Bestimmungsgrenze; LM: Lösungsmittel

| Prüfung | Durchführung | Kriterium |
|--|--|--|
| Linearität | Messung der Standard-Kalibrierreihe mit 6 Konzentrationen N=6, Berechnung MW, SD, RSD, R^2 <u>Test auf:</u> Ausreißer (Dean & Dixon) Normalverteilung (Anderson-Darling-Test) Varianzhomogenität (Brown-Forsythe-Test) Linearität (Fisher-Test) | $RSD < 20 \%$ $R^2 \geq 0,99$ PG < PW PG < PW |
| Wiederhol- und Laborpräzision | <u>Wiederholpräzision:</u> Messung der Referenzmaterialien (RM) an einem Tag (4 Konzentrationen), N=3, Berechnung MW, SD, RSD _r <u>Laborpräzision:</u> Messung der RM an 3 aufeinanderfolgenden Tagen (4 Konzentrationen), N=3, Berechnung MW, SD, RSD _{WR} <u>Test auf:</u> Ausreißer (Dean & Dixon) Normalverteilung (Anderson-Darling-Test) | $RSD_r \leq 20 \%$ $RSD_{WR} \leq 20 \%$ |
| Richtigkeit | Messung der RM (4 Konzentrationen), N=3 <u>Ermittlung der WFR:</u> ermittelte Ist-Konzentration in Bezug zur Sollkonzentration Berechnung MW <u>Test auf:</u> Ausreißer (Dean & Dixon) | WFR 50-150 % |
| Nachweis- und Bestimmungsgrenze | Messung RM (4 Konzentrationen), N=3 <u>Ermittlung S/N:</u> Signalhöhe Analyt in Bezug zu Signalhöhe Rauschen Festlegung der Nachweisgrenze (NG), matrixspezifisch Festlegung der Bestimmungsgrenze (BG), matrixspezifisch | Jeweils für 3 Messungen: $S/N > 3:1$ $S/N > 10:1$ |

| Prüfung | Durchführung | Kriterium |
|-------------------------------------|---|---|
| Spezifität/ Selektivität | <u>Spezifität</u> : Messung von Lösungsmittel (LM)-Blank, Matrix-Blank (Nullprobe) und RM (an Konzentration BG), N=15 Berechnung MW und daraus Anteil der Blank-Fläche (LM oder Nullprobe) an MW Flächen der BG-Konzentration <u>Selektivität</u> : geprüft durch Richtigkeit der Methode | MW Blankfläche < 30 % des MW Fläche der BG-Konzentration Richtigkeit erfüllt |
| Messunsicherheit | Ermittlung der matrixunabhängigen Messunsicherheit der Methode je Enzym | kleiner 50 % |

2.2.6.1 Prüfung der Linearität

Für die Validierung der Linearität wurden die 6 Kalibrierstandards gemäß Methode (Kalibrierung, 2.2.5.3) jeweils einmal hergestellt und sechsfach gemessen. Die einzelnen Kalibrierstandards wurden nach folgendem Pipettierschema in jeweils 1 ml-Injektionsfläschchen hergestellt (Tabelle 29). Die Herstellung der für die Kalibrierreihe verwendeten Verdünnungslösungen ist im Anhang Tabelle A 20 und Tabelle A 21 beschrieben.

Tabelle 29: Pipettierschema für die Kalibrierreihe

KP: Kalibrierpunkt; KP4 wurde für die Prüfung der Methodenpräzision verwendet

| KP | Peptidmix 0,1 mg/kg [µl] | Peptidmix <i>heavy</i> 5 mg/kg [µl] | internes Standard-Peptid 20 mg/kg [µl] | 0,1 % Formiat in Wasser [µl] |
|----|-----------------------------|--|---|---------------------------------|
| 1 | 5 | 200 | 100 | 855 |
| 2 | 10 | 200 | 100 | 850 |
| 3 | 20 | 200 | 100 | 840 |
| 4 | 100 | 200 | 100 | 760 |
| 5 | 200 | 200 | 100 | 660 |
| 6 | 400 | 200 | 100 | 460 |

Als Messwert wurde das Verhältnis der Flächen des Analyten zum Internen Standard (area ratio) betrachtet. Es wurden jeweils die Mittelwerte sowie die Standardabweichungen der area ratios der 6-fach-Bestimmung je Konzentrationsstufe gebildet um weiterhin die relativen Standardabweichungen zu berechnen. Die Messreihe wurde statistisch auf Ausreißer (Dean & Dixon-Test) sowie auf Normalverteilung (Anderson-Darling-Test) und Homogenität der Varianzen (Brown-Forsythe-Test) geprüft. Nach erfolgreich geprüfter Normalverteilung sowie Homogenität der Varianzen konnte abschließend die Prüfung auf Linearität mittels Fisher-Test durchgeführt werden. Als weitere Kenngröße der Linearität wurde das Bestimmtheitsmaß berechnet. Als Kriterium musste dieses für jede Kalibrierreihe als auch im Mittel mindestens 0,99 betragen.

2.2.6.2 Prüfung der Wiederhol- und Laborpräzision

Die Präzision der Methode wurde sowohl in Dreifachbestimmung an einem Tag (Wiederholpräzision, RSD_r) sowie in Einfachbestimmung an 3 aufeinander folgenden Tagen (Laborpräzision RSD_{wR}) geprüft. Die Präzisionen wurden anhand der berechneten Konzentrationen ermittelt. Es wurden folgende Formeln für die Wiederhol- und Laborpräzision angewendet:

$$\text{Gleichung 6: } RSD_r (\%) = \frac{\sqrt{s_r^2}}{\bar{x}} \cdot 100 \quad [155]$$

$$\text{Gleichung 7: } \text{RSD}_{\text{WR}} (\%) = \frac{\sqrt{s_{\text{t}}^2 + s_{\text{r}}^2}}{\bar{x}} \cdot 100 \quad [155]$$

| | |
|--------------------------|----------------------------------|
| RSD_{r} | Wiederholpräzision |
| RSD_{WR} | tagesverschiedene Laborpräzision |
| s_{r}^2 | Wiederholvarianz |
| s_{t}^2 | Varianz zwischen den Tagen |
| \bar{x} | Mittelwert aller Bestimmungen |

Es wurden für die Matrices Mehl, Brot und Keks jeweils 4 verschiedene Konzentrationen geprüft und die Wiederholpräzision für alle 3 Enzyme ermittelt. Die tagesverschiedene Laborpräzision wurde anhand der *alpha*-Amylase-Bestimmung der Matrices Brot und Keks geprüft. Die Messwerte wurden auf Ausreißer (Dean & Dixon-Test) sowie Normalverteilung (Anderson-Darling-Test) geprüft. Das Kriterium der Präzision war eine Wiederhol- als auch Laborpräzision kleiner 20 % für alle Konzentrationsbereiche und Enzyme.

2.2.6.3 Prüfung der Richtigkeit

Die Richtigkeit wurde anhand der Wiederfindungsrate (WFR) bestimmt. Hierfür wurden für die Matrices Brot, Keks und Mehl jeweils 4 Konzentrationslevel an 3 aufeinanderfolgenden Tagen unter Wiederholbedingungen geprüft. Die Auswertung erfolgte über die Ermittlung der area ratios sowie die anschließende Berechnung der Konzentrationen in mg/kg. Die Werte wurden mit der Sollkonzentration der technischen Enzyme verglichen und die Wiederfindungsrate in % berechnet.

$$\text{Gleichung 8: } \text{WFR} (\%) = \frac{\text{ermittelte Konzentration}}{\text{Sollkonzentration}} \cdot 100$$

Als Kriterium der Richtigkeit wurden Wiederfindungsraten (Mittelwert der Dreifachbestimmung) von 50 bis 150 % festgelegt. Teilweise wurde der Mittelwert der Wiederfindungsraten aus 2 Messwerten gebildet, da mittels Dean & Dixon-Test Ausreißer identifiziert wurden.

2.2.6.4 Ermittlung von Nachweis- und Bestimmungsgrenzen

Es wurden 4 verschiedene Konzentrationen je Matrix (Mehl, Brot, Keks) in Dreifachbestimmung gemessen. Da es sich um chromatographische Messverfahren handelt, wurden die Grenzen je Matrix anhand des Signal-Rausch-Verhältnisses (S/N-Verhältnis) ermittelt. Die NG wurde bei der Konzentration festgesetzt, bei der das Signal-Rausch-Verhältnis aller 3 Messwerte mindestens 3:1 betrug. Es wurde die Konzentration als BG gesetzt, bei der das S/N-Verhältnis aller 3 Messwerte mindestens 10:1 betrug.

2.2.6.5 Prüfung der Spezifität und Selektivität

Für den Ausschluss von „Blindpeaks“ aus dem Lösungsmittel oder Geräthintergrund wurde sowohl Acetonitril als auch eine Nullprobe der Extraktion (komplette Extraktion von Matrix ohne technisches Enzym) 15-fach gemessen und die Flächen ausgewertet. Die Spezifität wurde erreicht, wenn die berechneten Blankflächen (sowohl Lösungsmittel als auch Nullprobe) im Mittel maximal 30 % des Mittels der Peakflächen an der Bestimmungsgrenze betrug.

Die Selektivität wurde anhand der Daten der Richtigkeit geprüft. Eine ausreichende Selektivität der Methode ist gegeben, wenn die Kriterien der Richtigkeit erfüllt sind.

2.2.6.6 Ermittlung der Messunsicherheit

Für die Ermittlung der Messunsicherheit ist immer das Verhältnis von Aufwand und Nutzen zu beachten [131]. Eine Berechnung nach dem „Bottom up“-Prinzip konnte nicht angewendet werden, da hierfür die Abweichungen durch alle möglichen Fehlerquellen wie z. B. Unsicherheiten der Wägung, Unsicherheiten der Volumenmessung, Präzision der Analysenfunktion mit zufälligen Messunsicherheiten sowie Präzision des Messsignals der Probenlösung, usw. mit einbezogen werden müssten. Aufgrund der Tatsache, dass nicht für alle dieser erwähnten Fehlerquellen eine genaue Zahl der Unsicherheit festgelegt werden kann, wurde die Messunsicherheit nach dem „Top-down“-Prinzip berechnet. Das Prinzip wird in der Lebensmittelanalytik häufig verwendet, da die wesentlichen Einflüsse auf die Messwertstreuung im Zuge eines Validierungsverfahrens bereits erfasst wurden und bei der Berechnung der Messunsicherheit demnach zur Verfügung stehen [134]. Kommerziell erhältliche Referenzmaterialien für technische Enzyme sind nicht erhältlich, sodass die Unsicherheitsermittlung auf der Grundlage der im Labor ermittelten Messergebnisse der Validierung mit selbst hergestellten Referenzmaterialien durchgeführt wurde. Aufgrund der Tatsache, dass das festgelegte Verfahren während der Validierung in allen Einzelheiten von der Probeneinwaage bis zur chromatographischen Endbestimmung mehrfach durchgeführt wird, kann die Vergleichsstandardabweichung der kombinierten Messunsicherheit gleichgesetzt werden [140]. Der Erweiterungsfaktor ist ein Zahlenfaktor, mit dem die kombinierte Messunsicherheit multipliziert wird um eine erweiterte Messunsicherheit zu erhalten [124], welche genau wie bei dem genannten „Bottom up“-Prinzip den Vertrauensbereich angibt, innerhalb dessen der wahre Wert mit 95 % Wahrscheinlichkeit liegt [156]. Aus den Validierungsdaten der Wiederholvarianz (verschieden dotierte Enzymbrote) wurden nur die Ergebnisse der Konzentrationen über der Bestimmungsgrenze des jeweiligen Enzyms und Matrix betrachtet, da die Messunsicherheit nur bei quantitativ positiven (größer Bestimmungsgrenze) Ergebnissen relevant ist. Die Messunsicherheit wurde unter Annahme der Normalverteilung berechnet und relativ zum Mittelwert der gemessenen Konzentration betrachtet.

$$\text{Gleichung 9: } U = k \cdot s_R \quad (k=1,96; P=95 \%)$$

$$\text{Gleichung 10: } U_{\text{rel}} = \frac{U}{\bar{x}} \cdot 100$$

| | |
|------------------|---|
| U | erweiterte Messunsicherheit |
| k | Erweiterungsfaktor |
| s_R | Vergleichsstandardabweichung |
| U_{rel} | relative Messunsicherheit |
| \bar{x} | Mittelwert der gemessenen Konzentrationen |

Aufgrund einer angestrebten breiten Abdeckung verschiedener Matrix- und Konzentrationsbereiche (alle Matrices des Bereiches Backwaren, alle im Validierungsverfahren geprüften Konzentrationsbereiche) der Methode wurde die Ermittlung einer matrixunabhängigen Messunsicherheit für den Bereich Backwaren im Bereich zwischen 0-40 mg/kg angestrebt. Dafür wurden die ermittelten Messunsicherheiten der verschiedenen Matrices sowie

Konzentrationsbereiche gegenübergestellt, verglichen und die maximale Messunsicherheit als Messunsicherheit der entwickelten Methode (für den geprüften Konzentrationsbereich) ausgewählt.

2.2.7 Statistische Auswertung

Mit Hilfe statistischer Auswerteverfahren können gewonnene Messdaten geprüft und abgesicherte Ergebnisaussagen erfasst werden. Die für die deskriptive Statistik dieser Arbeit benutzten Methoden und Verfahren wurden mit den zugrunde liegenden analysierten Daten in Microsoft Excel berechnet und graphisch dargestellt. Hierzu gehörten sowohl die Berechnung als auch die Darstellung des arithmetischen Mittels (Mittelwert) und der Standardabweichung. Durch Bezugnahme der Standardabweichung auf den Mittelwert konnte die relative Standardabweichung (RSD) ermittelt werden. Es wurde mit dem Anderson-Darling-Test auf Normalverteilung geprüft (bei Prüfung der Linearität und Präzision). Bei vorhandener Normalverteilung wurde zunächst ein Ausreißer-Test nach Dean & Dixon durchgeführt (bei Prüfung der Linearität, Präzision und Richtigkeit) und weiterhin die Varianzhomogenität durch den Brown-Forsythe-Test überprüft (bei Prüfung der Linearität). Bei sowohl vorliegender Normalverteilung als auch Homogenität der Varianzen wurde die weitere Analyse mit dem Fisher-Test durchgeführt.

Alle Methoden (außer Messunsicherheit mit Signifikanzniveau 5 %) wurden auf einem Signifikanzniveau von 1 % geprüft. Es waren ausschließlich unabhängige Stichproben vorhanden, die statistisch geprüft wurden.

2.2.7.1 Anderson-Darling-Test auf Normalverteilung

Eine Prüfung der Normalverteilung ist nötig, da dies oft Voraussetzung für die Ermittlung statistischer Kennzahlen (z.B. t-Test, Varianzanalyse) ist. Der Anderson-Darling-Test wurde ausgewählt, um festzustellen, ob die Verteilung der Messdaten zu einer Normalverteilung passt. Die weiterhin bekannten Tests auf Normalverteilung (z.B. Chi-Quadrat-Test, Shapiro-Wilk-Test) unterscheiden sich in den Eigenschaften bezüglich der Art der Abweichung von der Normalverteilung, die sie erkennen. Der Anderson-Darling-Test wurde ausgewählt da dieser als besonders zuverlässig gilt.

Der Messwert des Anderson-Darling-Tests (AD-Wert) wird nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Gleichung 11: } AD = -n \cdot \frac{1}{n} \cdot \sum_{i=1}^n (2i-1) \left[\ln F(Y_i) + \ln \left(1 - F(Y_{n+1-i}) \right) \right] \quad [157]$$

| | |
|------|---|
| n | Stichprobenzahl |
| F(Y) | kumulative Verteilungsfunktion der angegebenen Verteilung |
| i | i-ter Messwert nach Sortierung der Messwerte in aufsteigender Reihenfolge |

Für die Annahme oder Ablehnung der Nullhypothese (Messwerte sind normalverteilt) wird der p-Wert über den z-Wert berechnet, da der AD-Wert für kleine Stichprobenzahlen angepasst werden muss:

$$\text{Gleichung 12: } z = AD \cdot \left(1 + \frac{0,75}{n} + \frac{2,25}{n^2} \right)$$

Je nach Ergebnis des z-Wertes wird der p-Wert nach einer der folgenden Formeln berechnet [158]:

$$\begin{aligned} \text{wenn } z > 0,6: & \quad p = \exp(1,2937 - 5,709 z + 0,0186 z^2) \\ \text{wenn } 0,34 < z \leq 0,6: & \quad p = \exp(0,9177 - 4,279 z - 1,38 z^2) \\ \text{wenn } 0,2 < z \leq 0,34: & \quad p = 1 - \exp(-8,318 + 42,796 z - 59,938 z^2) \\ \text{wenn } z \leq 0,2: & \quad p = 1 - \exp(-13,436 + 101,14 z + -223,73 z^2) \end{aligned}$$

Ist der ermittelte p-Wert größer als das Signifikanzniveau von 1 % kann die Nullhypothese nicht abgelehnt und von einer Normalverteilung der Messdaten ausgegangen werden.

2.2.7.2 Ausreißertest nach Dean & Dixon

Ausreißer sind in Messreihen vorkommende Maximal- oder Minimalwerte, die auffällig von den übrigen Werten abweichen. Diese Werte sollten überprüft, die Messungen wiederholt oder die Messwerte aus der Auswertung heraus genommen werden. Ein Ausreißertest ist ein statistischer Test und prüft die Messserie auf nicht plausible Werte (Ausreißer). Alternativen des in dieser Arbeit angewandten Ausreißertest nach Dean & Dixon sind sowohl der Grubbs-Test als auch der Namilov-Test. Aufgrund der vorhandenen kleinen Stichprobenzahlen der Messreihen und der Empfehlung des Ausreißertests nach Dean & Dixon für kleine Stichproben wurde dieser für alle Datensätze ausgewählt. Das Vorhandensein von normalverteilten Daten ist hier nicht zwingend nötig, wird jedoch empfohlen.

Der Ausreißertest von Dean & Dixon überprüft, ob ein einzelner Messwert (x_n bzw. x_1) unter Normalverteilungsannahme ein Ausreißer ist oder der Grundgesamtheit angehört [159]. Geprüft wird immer der fragliche Wert, welcher nach Größenordnung der Einzelwerte innerhalb einer Stichprobe, entweder der kleinste oder der größte Wert ist. Abhängig von der Stichprobenzahl n wird der kritische Wert entsprechend des zu prüfenden Signifikanzniveaus in der Prüftabelle abgelesen [159]. Für eine Stichprobengröße von 3-7 gilt folgende Formel:

$$\text{Gleichung 13: } n = 3-7: \hat{M} = \frac{|x_2 - x_1|}{x_n - x_1} \quad [159]$$

Ist \hat{M} kleiner als der kritische Wert, wird der Verdacht auf einen Ausreißer zurückgewiesen.

2.2.7.3 Brown-Forsythe-Test auf Homogenität der Varianzen

Die Prüfung der Homogenität der Varianzen wurde mit dem als robuste Alternative zum F-Test (Teststatistik ist der Quotient der geschätzten Varianzen zweier Stichproben) geltenden Brown-Forsythe-Test durchgeführt. Es wurden zunächst für jede Gruppe die Beträge der Abweichungen vom Median berechnet um anschließend den Mittelwert der Abweichungen zu bestimmen [160]. Aus der ermittelten Summe der Abweichungsquadrate zwischen den Gruppen sowie der Summe der Abweichungsquadrate innerhalb der Gruppen wird anhand folgender Formel die Prüfgröße berechnet.

$$\text{Gleichung 14: } \mathbf{L} = \frac{n-k}{k-1} \cdot \frac{\sum_{j=1}^k n_j (\bar{Y}_j - \bar{Y})^2}{\sum_{j=1}^k \sum_{i=1}^{n_j} (Y_{ji} - \bar{Y})^2} \sim \mathbf{F}_{k-1; n-k} \quad [160]$$

| | |
|-------------|--------------------------------------|
| L | Prüfgröße |
| n | Anzahl aller Beobachtungen |
| k | Anzahl der Gruppen |
| n_j | Anzahl der Beobachtungen in Gruppe j |
| \bar{Y} | Stichprobenmedian über alle Gruppen |
| \bar{Y}_j | Stichprobenmedian über Gruppe j |

Der ermittelte Wert wird mit dem Prüfwert der F-Tabelle ($df = k-1; n-k$) verglichen [160]. Insofern der Wert kleiner ist als der Prüfwert ist die Homogenität der Varianzen erwiesen.

2.2.7.4 Fisher-Test auf Linearität

Nach Darstellung der Abhängigkeit 2er Größen voneinander muss auch bei eindeutigem Erscheinen einer Geraden (linearen Regression) geprüft werden, ob die Messdaten nicht durch eine andere Funktion (z.B. quadratische Regression) besser dargestellt werden könnten. Für diese Arbeit wurde der Linearitätstest nach Fisher verwendet, der im Vergleich zum Test nach Mandel weniger sensibel ist. Die während einer MS-Messung vor allem im unteren Messbereich (kleinere Analytflächen) auftretenden Schwankungen, die sich auf die Linearitätsprüfung auswirken könnten, werden mit dem Test nach Fisher besser (weniger sensibel daher weniger kritisch) bewertet.

Mit Hilfe des Linearitätstests nach Fisher werden die Reststandardabweichungen der linearen und der quadratischen Kalibrierfunktionen verglichen und geprüft welche Regression eine signifikant bessere Anpassung ergibt. Es werden dafür von jeder zu testenden Funktion die Residuen (Abstände der Punkte von der theoretisch berechneten Kurve) berechnet, quadriert und aufsummiert. Die mit Hilfe der Freiheitsgrade (linear: $FG = n-2$; quadratisch: $FG = n-3$) berechneten Varianzen der linearen und quadratischen Funktionen (Summe der Residuen multipliziert mit Freiheitsgrad) werden für die Berechnung der Prüfgröße (PG) benötigt.

$$\text{Gleichung 15: } PG = \frac{s_G^2}{s_P^2}$$

| | |
|---------|--------------------------------------|
| s_G^2 | Varianz der linearen Regression |
| s_P^2 | Varianz der quadratischen Regression |

Ist die Prüfgröße größer als der Prüfwert ($PW = F_{n-2, n-3, \alpha}$) wird die Hypothese, dass die lineare Regression die beste Regressionsform für das geprüfte Messmodell ist, abgelehnt.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Technologische Wirkung von Fungamyl und Lipase FE-01

Die Wirksamkeit der technischen Enzyme kann in praxisnahen Backversuchen getestet werden [161]. Um die technologische Wirkung von Fungamyl und Lipase FE-01 zu prüfen, wurden fünf Brote unterschiedlicher Dotierung gebacken. Mit Hilfe des ermittelten Anteils an *alpha*-Amylase in Fungamyl (3.3.1) sowie der Konzentrationsangabe der Lipase in Lipase FE-01 (18 mg/g) des Herstellers wurden die Ist-Konzentrationen der Enzyme in den Testmaterialien berechnet. Es wurden Testmaterialien einer Nullprobe, 2er Fungamyl-Konzentrationen (3,92 und 9,80 mg/kg, bezogen auf *alpha*-Amylase Gehalt) und 2er Lipase FE-01-Konzentrationen (0,72 und 1,80 mg/kg, bezogen auf Lipase Gehalt) hergestellt. Die hergestellten Testmaterialien wurden genutzt um den Einfluss der technischen Enzyme auf die Frischhaltung und Volumenausbeute (Feuchtemessung, Textur-Profil-Analyse (TPA), Porenanalyse, Volumenbestimmung) sowie auf das Zucker- und Fettsäurespektrum zu prüfen. Da die Lagerdauer durch den Einsatz technischer Enzyme beeinflusst wird, wurden diese Untersuchungen an Tag 1, 3 und 7 durchgeführt und Veränderungen analysiert. Weiterhin wurde eine sensorische Prüfung an den Tagen 1, 3 und 7 vorgenommen, um sowohl Unterschiede als auch Veränderungen in Geschmack, Aussehen und Geruch in Bezug zur Enzymzugabe sowie zur Lagerdauer aufzunehmen. Die Materialien wurden an allen Tagen der Lagerung, an denen Analysen durchgeführt wurden (Tag 1, 3 und 7) auf mikrobiellen Verderb geprüft, um einen möglichen Einfluss auf die Messergebnisse (v.a. Zucker- und Fettsäurespektrum) auszuschließen.

3.1.1 Prüfung des mikrobiellen Status

Es wurden an Tag 1, 3 und 7 die Gesamtkeimzahl und Hefen/Schimmelpilze in den Testmaterialien analysiert. Weiterhin wurden die Brote an Tag 1 und 7 auf *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* und *Bacillus cereus* untersucht. Alle Testmaterialien zeigten an allen Analysetagen die gleichen mikrobiellen Ergebnisse (Tabelle 30).

Tabelle 30: Ergebnisse der mikrobiellen Überprüfung aller Testmaterialien an Tag 1, 3 und 7

N=1; KbE: Koloniebildende Einheit; n.n.: nicht nachweisbar

| Mikrobielle Überprüfung | |
|-------------------------------|-------------------------|
| Gesamtkeimzahl | < 10 ² KbE/g |
| Hefen/Schimmelpilze | < 10 ² KbE/g |
| <i>E. coli</i> | n.n./g |
| <i>Salmonella</i> | n.n./25 g |
| <i>Listeria monocytogenes</i> | n.n./g |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | n.n./g |
| <i>B. cereus</i> | < 10 ² KbE/g |

Innerhalb der durchgeführten Analysendauer konnte kein mikrobieller Verderb festgestellt werden. Es wurde damit sichergestellt, dass die Ergebnisse nicht durch das Einwirken von Mikroorganismen auf die Testmaterialien verändert wurden. Vor allem ein Einfluss auf die Analytik des Zucker- und Fettsäurespektrums wäre möglich gewesen, da die Vermehrung von Bakterien die betroffene Backware durch den Abbau von Kohlenhydraten (Zucker oder Stärke) sowie Proteinen und Fetten verändert [162]. In diesen Produkten können Säuren, Alkohole, Gase oder Schleime gebildet werden,

welche als Kennzeichen des Verderbs gelten. Backwaren mit einem hohen Feuchtegehalt (a_w -Wert, z.B. feine Backwaren mit nicht durchgebackener Füllung) sind besonders gefährdet, da z.B. die meisten Bakterien eine Wasseraktivität von über $a_w = 0,98$ benötigen [162]. Extrem halophile Bakterien tolerieren jedoch bereits eine Wasseraktivität von 0,6; Pilze bevorzugen a_w -Werte von über 0,8 [162].

3.1.2 Einfluss auf den Feuchtegehalt

Der Feuchtegehalt der unterschiedlich dotierten Testmaterialien wurde an Tag 1 mit einem a_w -Wert Messgerät und zusätzlich an Tag 1, 3 und 7 mit einem Schnellfeuchtebestimmer ermittelt. Der Feuchteverlust an den Tagen 3 und 7 wurde in Bezug zu Tag 1 berechnet.

An Tag 1 erfolgte die Bestimmung des a_w -Wertes der Testmaterialien. Der Feuchtegehalt der unterschiedlich dotierten Proben lag im Bereich von 0,957 bis 0,972 und zeigte keine signifikanten Unterschiede (Tabelle 31). Bezugnehmend auf die Diskussion über eine mögliche Belastung der Testmaterialien mit Mikroorganismen (3.1.1) handelt es sich um eine Backware mit hohem Feuchtegehalt, die mit einem a_w -Wert von maximal 0,972 nicht ausreichend Wasseraktivität für den Großteil der Bakterien aufweist, jedoch durch halophile Bakterien als auch Pilze gefährdet sein könnte.

Tabelle 31: a_w -Werte (Feuchtegehalte) der Testmaterialien

N=1

| Nullprobe | 3,92 mg/kg Fungamyl | 9,80 mg/kg Fungamyl | 0,72 mg/kg Lipase FE-01 | 1,80 mg/kg Lipase FE-01 |
|-----------|------------------------|------------------------|----------------------------|----------------------------|
| 0,960 | 0,959 | 0,958 | 0,957 | 0,972 |

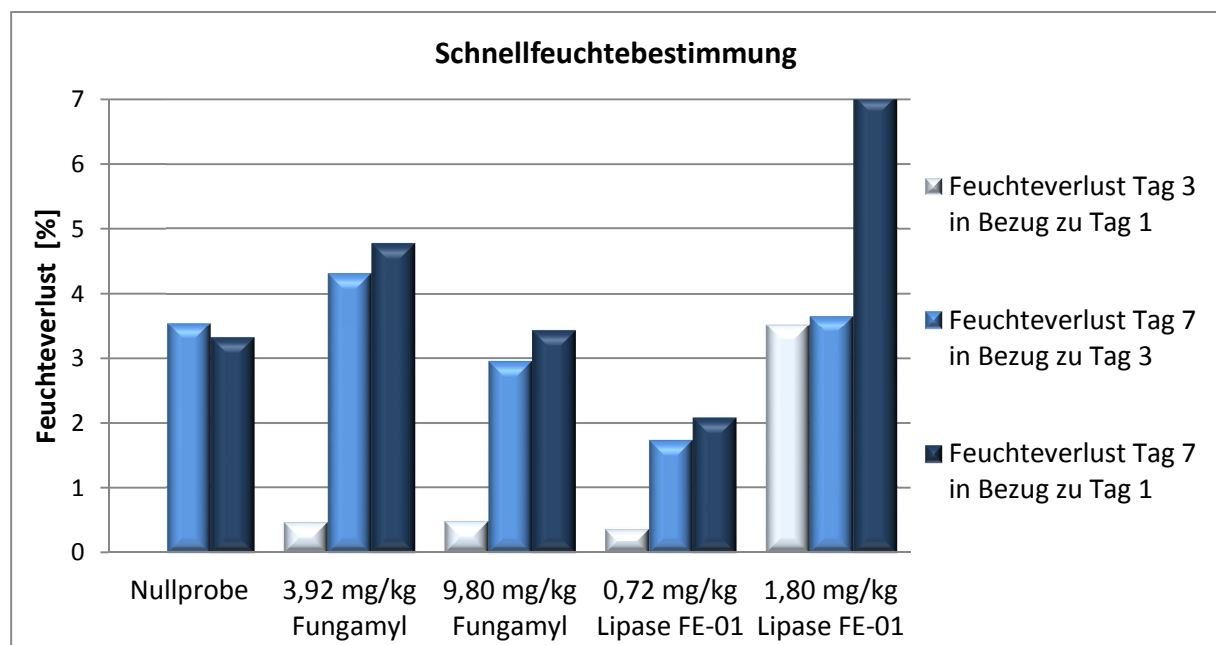


Abbildung 15: Feuchteverlust der Testmaterialien in Bezug zu Tag 1 und Tag 3

N=2; dargestellt ist jeweils der prozentuale Feuchteverlust aus den berechneten Mittelwerten der Feuchtebestimmung an Tag 1, 3 und 7

Zusätzlich zum Tag 1 wurden an Tag 3 und 7 die Feuchten der Testmaterialien mit der Schnellfeuchtebestimmung aufgenommen. Für eine bessere Darstellung wurde der Feuchteverlust zwischen Tag 1 und 3 sowie zwischen Tag 1 und 7 bzw. Tag 3 und 7 berechnet. Die Rohdaten und berechneten Werte sind im Anhang Tabelle A 7 hinterlegt. Abbildung 15 zeigt den stärksten Feuchteverlust bei der mit 1,80 mg/kg Lipase FE-01 dotierten Probe an Tag 3 (3,5 %) sowie an Tag 7 (3,7 %). Sowohl bei der Nullprobe als auch den anderen dotierten Proben kommt es zu einem geringen Feuchteverlust bis Tag 3. Der größere Feuchteverlust wurde zwischen Tag 3 und Tag 7 gemessen.

Alle gebackenen Brote hatten einen ähnlichen Feuchtegehalt und zeigten im Bezug zur Feuchte ein ähnliches Lagerverhalten. Die Brote wurden bei identischen Lagerbedingungen (verpackt in Folie und Lagertemperatur von 18 °C) aufbewahrt, was die Feuchtwerte bestätigen. Der erhöhte Feuchteverlust der 1,80 mg/kg Lipase FE-01 Probe an Tag 3 und Tag 7 ist mit dem geringen Volumen des Brotes zu begründen. Die vor allem im Kernbereich der Brotkrume gespeicherte Feuchtigkeit kann so leichter an der Brotoberfläche entweichen.

Da es nach Zugabe der *alpha*-Amylase während der Bildung von Dextrinen zur Wasserfreisetzung kommt, wäre eine erhöhte Feuchtemessung der Fungamyldotierten Brote zu erwarten gewesen. Es wird vermutet, dass die Lagerdauer mit 7 Tagen nicht ausreichend war um Unterschiede zwischen Enzymbreien und –dotierten Broten im Feuchtegehalt zu beobachten.

3.1.3 Einfluss auf Textur-Profilanalyse

Es wurden Textur-Profilanalysen an den Tagen 1, 3 und 7 durchgeführt und die rheologischen Eigenschaften der Brotkrume im Verlauf der Lagerzeit und in Abhängigkeit der zugesetzten Enzyme aufgenommen. Die Kraft, die erforderlich war um mit einer gleich bleibenden und definierten Geschwindigkeit eine definierte Tiefe in die 3 cm dicke Scheibe eines Brotes einzudringen, wurde gemessen und als Härte [g] für die Beurteilung der Frischhaltung und Volumenausbeute verwendet. Die TPA der Probe Lipase 1,80 mg/kg konnte nicht durchgeführt werden, da das Brotvolumen zu gering war. Die gemessenen Einzelwerte (je 4 Scheiben à Vorder- und Rückseite) je Messtag sind im Anhang Tabelle A 8 notiert. In Abbildung 16 sind die Mittelwerte sowie die Standardabweichungen der an den Tagen 1, 3 und 7 gemessenen Härten [g] graphisch dargestellt.

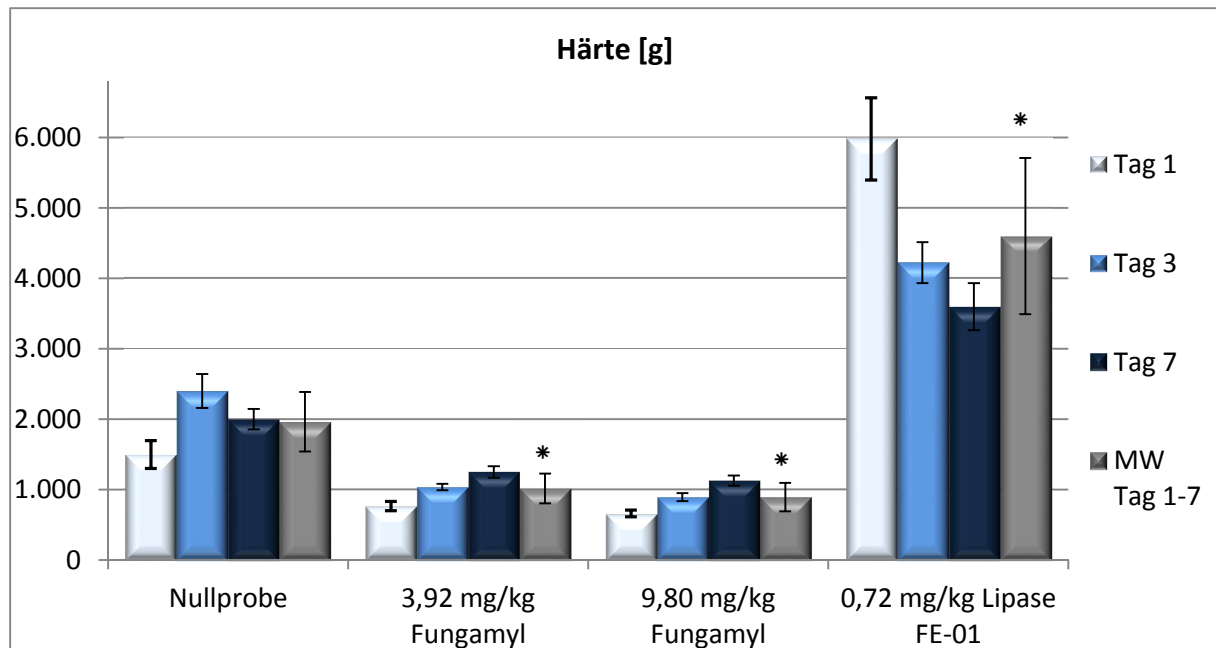


Abbildung 16: Gemessene Härten während der TPA

N=8; MW: Mittelwert; dargestellt ist jeweils der Mittelwert und die Standardabweichung der gemessenen Härten der Enzymfreien und -dotierten Brote an Tag 1, 3 und 7 sowie der Mittelwert und die Standardabweichung der gemessenen Härten aller 3 Tage (MW Tag 1-7; N=24); *: signifikant unterschiedlich bei 1 % Signifikanzniveau

Bei der Nullprobe konnte mit bis zu 2398 g eine deutlich höhere Härte gemessen werden, als bei den mit Fungamyl-dotierten Broten. Diese erreichten an Tag 7 eine Härte von 1249 g. Die Lipase FE-01 hatte negative Auswirkungen auf die Brotweichheit, was sich mit Härtegraden von bis zu 4222 g bestätigte. Bei der Nullprobe stieg die Härte an Tag 3 auf ein Maximum von über 2300 g an. Vergleichend dazu kam es bei den Fungamyl-dotierten Proben zu einem geringen Anstieg der Härte. Die höhere Konzentration der Fungamyl-Dotierung führte dazu, dass mit 660 g die geringste Härte an Tag 1 und mit 893 g die geringste Härte an Tag 3 gemessen werden konnte. Die mit Fungamyl-dotierten Brote blieben laut TPA länger weich und frisch. Das Lipase-dotierte Brot hatte an jedem Analyse-Tag eine Härte von mehr als 3500 g. Die Brote waren mehr als doppelt so hart wie das Nullbrot und zeigten laut TPA keine gute Frische.

Während der TPA wurde das Eindringen des Kolbens mit definierter Geschwindigkeit (1 mm/s) und Wegstrecke (1 cm) zweimal hintereinander ausgeführt (2 Brote mit je 4 Brotscheiben). In Abbildung 17 wurden exemplarisch die Kraft-Kurven der Nullprobe und der mit Fungamyl bzw. Lipase dotierten Brotproben an Tag 3 dargestellt um die Unterschiede im Härtegrad der enzymbehandelten Proben mit der Nullprobe zu analysieren.

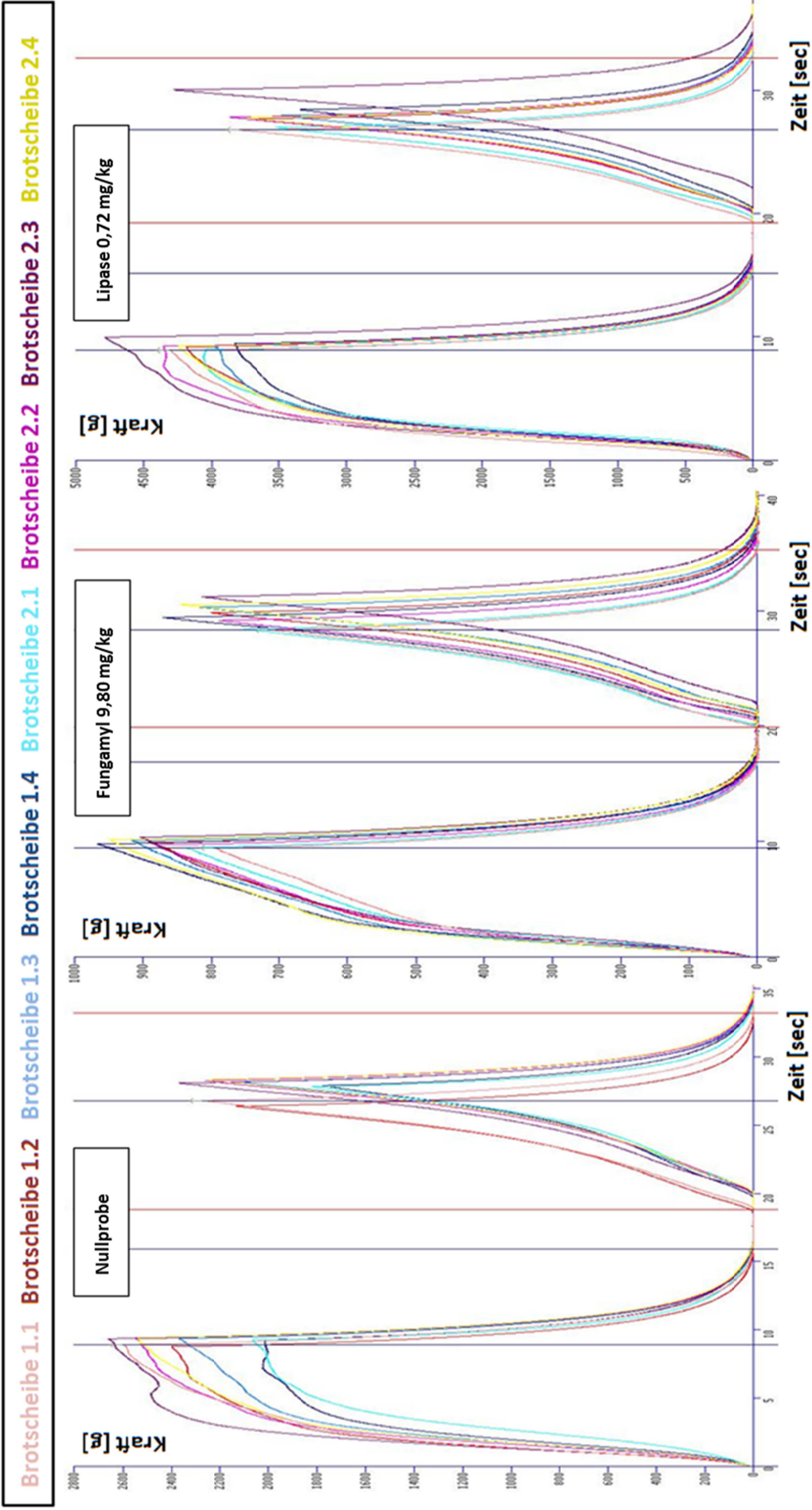


Abbildung 17: Kraft-Kurven aus der TPA

y-Achse: Kraft in g; x-Achse: Zeit in sec.; von links: Nullprobe, Fungamyl-dotiertes Brot (9,80 mg/kg) und Lipase-dotiertes Brot (0,72 mg/kg) an Tag 3 (2 Brote mit je 4 Brotscheiben)

Der F-Test zeigte, dass alle enzymhaltigen Brote im Bezug zum Nullbrot einen signifikanten Unterschied (1 % Signifikanzniveau) in der Härte hatten. Hierfür wurden die Varianzen aller Messergebnisse einer Brotserie (Nullbrot, Enzymdotierte Brote) berechnet, der Quotient der Varianzen (enzymbehandelt in Bezug zu enzymfrei) gebildet und mit dem Tabellenwert der F-Tabelle verglichen.

Der Textur-Profil-Analyser benötigte bei der Nullprobe an Tag 7 (Abbildung 17) eine Kraft von bis zu 2660 g. Das Eindringen in die Brotscheibe war an jeder Stelle etwa gleich schwer, sodass symmetrische Kurven entstanden. Vergleichend dazu ist in Abbildung 17 zu sehen, dass zum Eindringen in eine Brotscheibe des Fungamyldotierten Brotes (9,8 mg/kg) an Tag 7 eine Kraft von maximal 977 g eingesetzt werden musste. Das erste Eindringen in die Brotscheibe zeigt einen sehr flachen Kraftanstieg, was die Weichheit des Brotes bestätigt. Auch nach der Lagerdauer von 7 Tagen zeigten die Brote immer noch eine gute Weichheit und Frische. Bei den Brotscheiben des Lipasedotierten Brotes (0,72 mg/kg) musste mit bis zu 4795 g eine deutlich höhere Kraft aufgewendet werden (Abbildung 17). Der Kurvenverlauf des Eindringens des Kolbens in die Brotscheiben zeigt vergleichbare Formen mit der Nullprobe. Diese Brote zeigten eine starke Härte und mangelnde Frische. Die Ergebnisse der TPA belegen einen deutlichen positiven Effekt auf die Frische eines Brotes durch den Einsatz von Fungamyl. Wie bereits unter 1.1.2.1 beschrieben, führt der Zusatz von *alpha*-Amylasen in Kombination mit endogen vorhandenen *beta*-Amylasen im Mehl zu einer vermehrten Freisetzung von Zuckern aus Stärke, welche der Hefe als Substrat für den Gärprozess dienen [32]. Das dabei entstehende Kohlenstoffdioxid ist Ursache für eine verbesserte Teiglockerung. Auch die in Fungamyl vorhandene Endo-1,4-Xylanase katalysiert Reaktionen bei denen Wasser freigesetzt wird; dies fördert eine verbesserte Teiglockerung.

Der Einsatz der Lipase FE-01 hatte insgesamt negative Auswirkungen auf die Frische und Weichheit des Brotes. Es wird vermutet, dass das eingesetzte Fett (Spezialöl, bestehend aus C8/C10 Capryl-/Caprinsäure) in Zusammenhang mit dem Zusatz der Lipase FE-01 zu den hohen Härtegraden sowie zu einer vermehrten Freisetzung freier Fettsäuren (FS) geführt hat. Ungesättigte freie FS dienen als Substrat für das Enzym Lipoxygenase, welches endogen im Mehl vorhanden ist [163]. Lipoxygenasen benötigen Sauerstoff, welcher während der Teigbereitung ausschließlich durch die Hefe genutzt wird wodurch die Enzymaktivität eingeschränkt ist [164]. Aus der Literatur ist bekannt, dass Pilze Fettsäure Desaturase synthetisieren. Diese ist in der Lage langkettige gesättigte FS in einfach- und mehrfach ungesättigte FS umzuwandeln [165, 166]. Da das verwendete technische Enzym Lipase FE-01 von einem Pilz synthetisiert wurde, ist eine gleichzeitige Anwesenheit des Enzyms Desaturase in den Lipasedotierten Backprodukten möglich. Es wird vermutet, dass die Umsetzung der Capryl-/Caprinsäure durch die in der Lipase FE-01 enthaltene Desaturase zu einem Überschuss ungesättigter freier Fettsäuren führte [165, 166], sodass die Lipoxygenasen durch ein erhöhtes Substratangebot eine hohe Aktivität aufwiesen und es damit zum Sauerstoffmangel für die Hefe kam. Die Folge waren ein reduzierter Gärprozess sowie eine damit verbundene verringerte Kohlenstoffdioxidbildung. Das Lipasedotierte Brot wurde dementsprechend nicht richtig gebacken und hatte eine harte und kompakte Struktur. Die Hypothese wird dadurch gestützt, dass der negative Einfluss der Lipase (in Zusammenhang mit dem Spezialöl) mit steigender Lipasemenge stärker wird. In Annahme dessen, das ausreichend Substrat zur Verfügung steht, würden mehr freie ungesättigte Fettsäuren entstehen und der Gärprozess weiter reduziert werden. Die Brote werden als Konsequenz fester und kompakter. Die Vermutung, dass die Auswahl des Fettes für die Wirkung (positive als auch

negative) der Lipase eine große Rolle spielt, wird bestätigt. Eine fachgerechte Anwendung ist daher unabdingbar.

Die an Tag 1 erhaltene Frische der unterschiedlichen Brote veränderte sich in Abhängigkeit der eingesetzten technischen Enzyme im Laufe der beobachteten Lagerdauer. Hierbei zeigten die Fungamyl-dotierten Brote auch nach 7 Tagen eine deutlich geringere Härte als das Vergleichsbrot an Tag 1. Die Frischhaltung und die damit einhergehende Verlängerung der möglichen Lagerdauer wurden durch den Einsatz von Fungamyl verbessert. Ursache hierfür sind die im katalytischen Prozess der *alpha*- und *beta*-Amylase freigesetzten Dextrine, welche als Nebenprodukt Wasser abspalten. Das Wasser führt zu einer längeren Frischhaltung des Backproduktes [1]. Weiterhin katalysiert die Endo-1,4-Xylanase die vermehrte Umwandlung der unlöslichen in lösliche Pentosane, was eine gesteigerte Wasserbindungskapazität und einen erhöhten Frischhalteeffekt zur Folge hat [34].

Das Lipasidotierte Brot zeigte kaum Änderungen der Härte an Tag 3 und 7 im Vergleich zu Tag 1 (Härten an Tag 3 und 7 geringer als an Tag 1 aber dennoch deutlich höher als beim enzymfreien Brot). Es ist bekannt, dass im Gegensatz zu direkt zum Backprozess zugegebenen, emulgierend wirkenden Mono- und Diglyceriden, die durch enzymatische Freisetzung wirkenden Mono- und Diglyceride keine Auswirkungen auf die Lagerdauer haben [47]. Vermutet wird, dass die Prozesse der Stärke-Retrogradation nicht beeinflusst werden und eine damit verbundene Verzögerung des Altbackenwerdens ausbleibt [47]. Eine mögliche Erklärung dafür wäre, dass die gebildeten Mengen des Emulgators zu gering sind.

3.1.4 Einfluss auf die Volumenausbeute

Es wurde das Brotvolumen von je 2 Broten der gebackenen Testmaterialien an Tag 1 bestimmt. Die Messwerte sind im Anhang Tabelle A 9 notiert. Die Ergebnisse der gemessenen Brotvolumen sind in Abbildung 18 dargestellt.

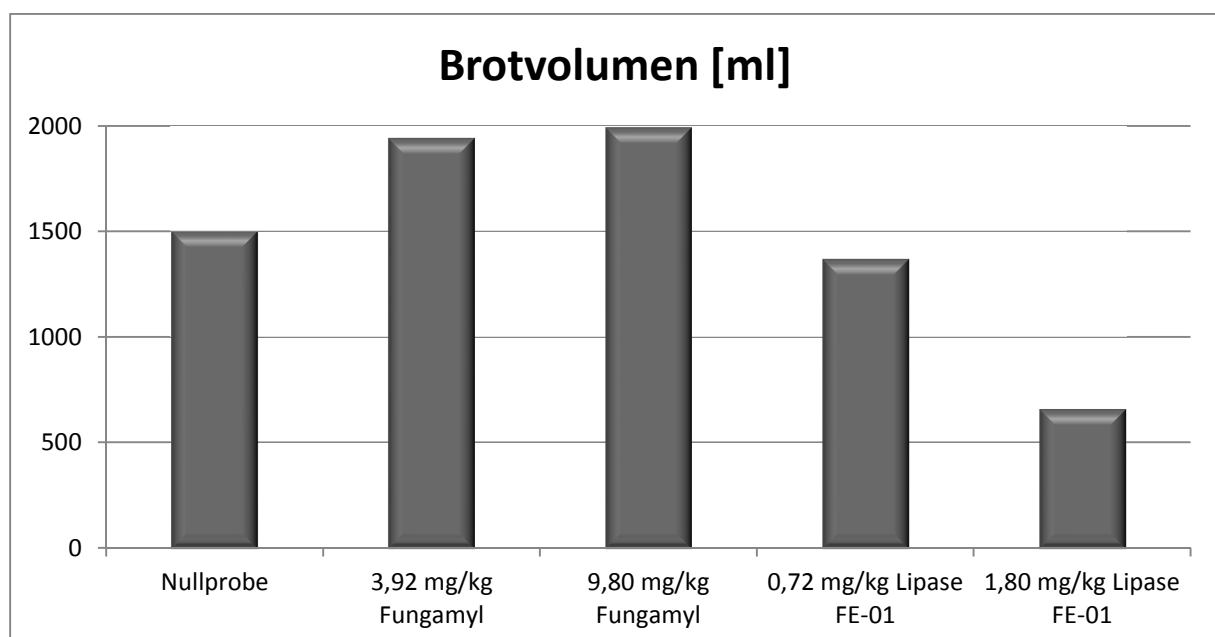


Abbildung 18: Brotvolumen ermittelt nach der Raps-Verdrängungsmethode

N=2; dargestellt ist jeweils der berechnete Mittelwert der Volumenbestimmung

Im Vergleich zur enzymfreien Nullprobe (1500 ml) zeigten die Fungamyl-dotierten Proben ein deutlich höheres Brotvolumen von 1940 ml (3,92 mg/kg Fungamyl) bzw. 1990 ml (9,80 mg/kg Fungamyl). Das Brotvolumen der mit Lipase FE-01 dotierten Proben ist im Vergleich zur Nullprobe mit einem Volumen von 1370 ml (0,72 mg/kg Lipase FE-01) bzw. 660 ml (1,80 mg/kg Lipase FE-01) geringer.

Der gezeigte positive Effekt von Fungamyl auf das Brotvolumen ist zum einen auf die darin enthaltene *alpha*-Amylase zurückzuführen. Unter Zusammenwirkung dieser mit der endogen im Mehl vorkommenden *beta*-Amylase wird die Katalyse der Stärke in Zucker und Oligosaccharide ermöglicht. Der Hefe stehen ausreichend Nährstoffe zur Verfügung, sodass ein optimaler Gärprozess stattfindet und Kohlenstoffdioxid als Ursache der verbesserten Teiglockerung und Volumenausbeute entsteht [32]. Zum anderen katalysiert ein weiterer Bestandteil von Fungamyl, die Endo-1,4-Xylanase, die Freisetzung von Arabinoxylanen, welche in der Lage sind große Mengen an Wasser zu binden [41]. Das wiederum in den Teig freigesetzte Wasser führt zu einem verbesserten Ofentrieb und einem erhöhten Brotvolumen [42, 43]. Der Effekt von Fungamyl auf das Brotvolumen ist konzentrationsabhängig, was eine fachgerechte Anwendung des technischen Enzyms zwingend erforderlich macht.

Lipase FE-01 zeigte einen negativen Einfluss auf das Brotvolumen, der sich ebenso konzentrationsabhängig verstärkte. Wie bereits diskutiert (3.1.3) sind die negativen Effekte des Spezialöls in Kombination mit der Lipase auf das Brotvolumen möglicherweise durch einen mangelnden Gärprozess bedingt, der auf die atypische Aktivität der Lipoxygenase unter Sauerstoffverbrauch zurückzuführen wäre.

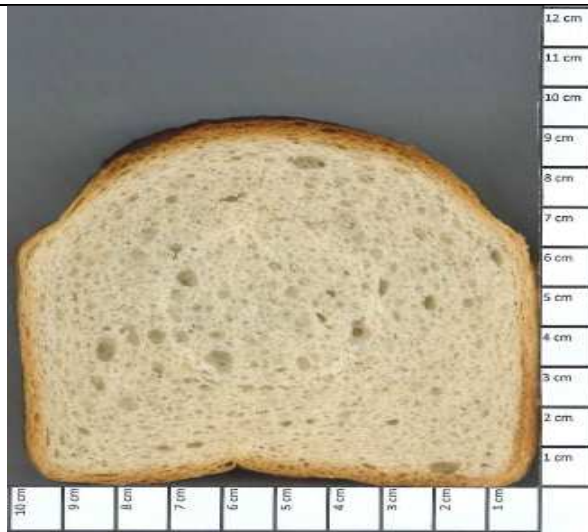
3.1.5 Einfluss auf die Lockerheit

Zum Vergleich der unterschiedlichen Lockerheit je nach Einsatz der technischen Enzyme wurde eine Porenanalyse der Testmaterialien durchgeführt. Hierfür wurde eine mittige 3 cm dicke Scheibe jedes Brotes mit einer Skala eingescannt und in Tabelle 32 und Tabelle 33 dargestellt.

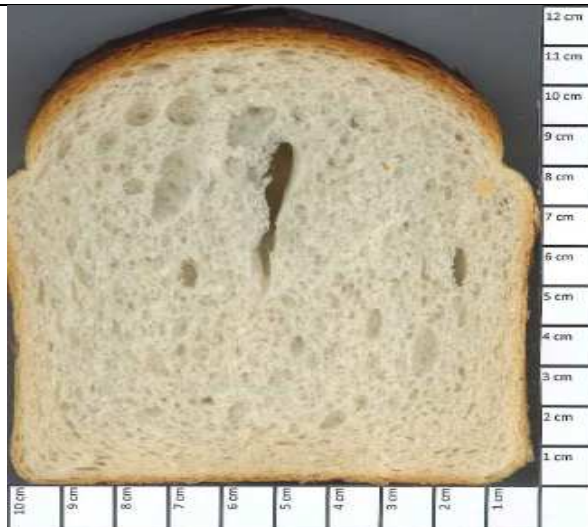
Tabelle 32: Darstellung der Porengröße einer mittleren Scheibe der Testmaterialien (Fungamyl)

Dargestellt ist die Nullprobe verglichen mit Fungamyl-dotierten Testmaterialien

Nullprobe



3,92 mg/kg Fungamyl



9,80 mg/kg Fungamyl

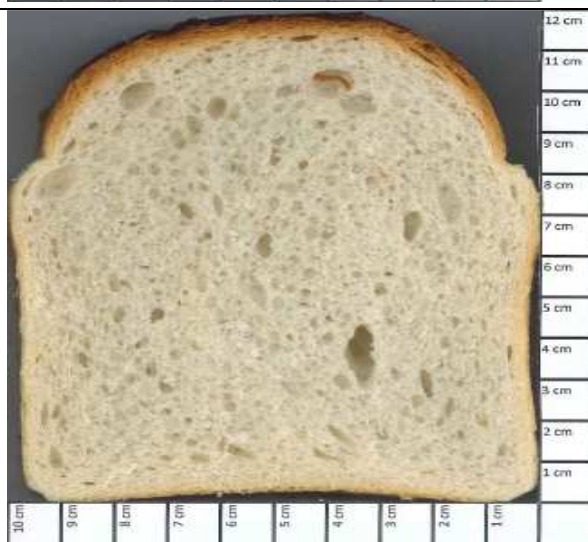
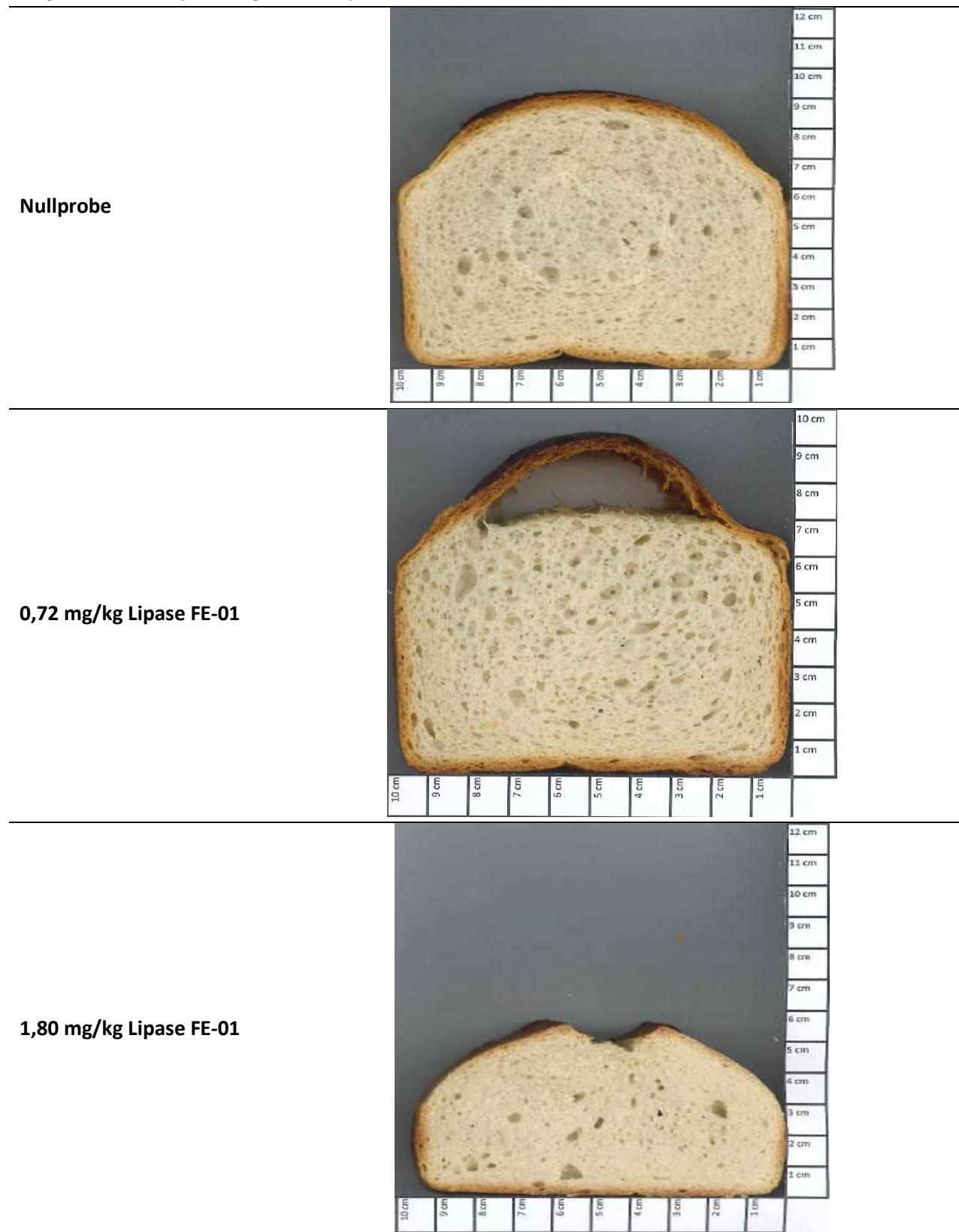


Tabelle 33: Darstellung der Porengröße einer mittleren Scheibe der Testmaterialien (Lipase)

Dargestellt ist die Nullprobe verglichen mit Lipasedotierten Testmaterialien



Im Vergleich zur Nullprobe (9 cm) wurde bei den Fungamyldotierten Testmaterialien eine Brothöhe von 12 cm erreicht. Die Nullprobe enthält größere Poren fast ausschließlich im Kernbereich der Brotscheibe. In den Randbereichen sind vorwiegend kleine Porengrößen zu verzeichnen. Im Vergleich

dazu sind die größeren Poren in den Fungamyldotierten Testmaterialien über die gesamte Brotscheibe verteilt. Die Poren sind im Vergleich zur Nullprobe deutlich größer.

Im Vergleich zur Nullprobe (9 cm) wurde bei den Lipasedotierten Testmaterialien eine Brothöhe von etwa 7 cm (0,72 mg/kg Lipase FE-01) bzw. 6 cm (1,80 mg/kg Lipase FE-01) erreicht. Ähnlich wie bei den Fungamyldotierten Testmaterialien sind die größeren Poren in den Lipasedotierten Testmaterialien über die gesamte Brotscheibe verteilt. Die Poren sind im Vergleich zur Nullprobe größer, aber gleichzeitig sehr eng zueinander gedrängt. Auffällig ist die Luftblase an der Oberkante des 0,72 mg/kg Lipase FE-01 Brotes, sowie die kompakte und daher fest wirkende Struktur des 1,80 mg/kg Lipasedotierten Brotes.

Die Porenanalyse bestätigt die in der TPA sowie Volumenbestimmung gemessenen Daten. Die durch den Einsatz von Fungamyl reduzierten Härten der Brotscheiben spiegeln sich in einem porenhaltigeren und luftigeren Brotmuster wieder. Die Fungamyldotierten Brote sind im Vergleich zur Nullprobe höher gebacken. Dies bestätigt den positiven Effekt von Fungamyl auf das Brotvolumen und auch die Brothöhe. Wie bereits erwähnt unterstützt die im Fungamyl enthaltene *alpha*-Amylase (Zuckerfreisetzung) den Gärprozess der Hefe, sodass ein damit verbundener höherer Kohlenstoffdioxidgehalt die Lockerheit des Brotes bedingt.

Die durch die Kombination Spezialöl und Lipase FE-01 erhaltene kompakte Struktur der Lipasedotierten Brote spiegelt sich in einer geringen Brothöhe wieder. Wie unter 3.1.3 beschrieben ist die verringerte Bildung von Kohlenstoffdioxid durch die Unterdrückung des Gärprozesses vermutlich ursächlich dafür. Lipasen werden im Backprozess als Emulgatorersatz verwendet und stabilisieren die Luftbläschen im Teig. Dies konnte bei der Porenanalyse der geringeren Lipasedotierung bestätigt werden. Hier war eine gleichmäßige Verteilung der Luftbläschen in der Brotscheibe zu sehen. Es konnte erneut gezeigt werden, dass die Auswahl des Fettes für eine optimale Wirkung der Lipase im Brot von Bedeutung ist.

3.1.6 Einfluss auf das Fettsäurespektrum

Das aus den Testmaterialien gewonnene Fett wurde verseift und nach gaschromatographischer Trennung mit dem FID detektiert. Ziele der Messung waren sowohl Unterschiede im Fettsäurespektrum zwischen den verschieden dotierten Testmaterialien als auch Unterschiede im Fettsäurespektrum in Abhängigkeit von der Lagerdauer zu analysieren. Im Verlauf der Lagerdauer wurden die FS erneut an Tag 3 und 7 gemessen. Alle gemessenen Werte sind im Anhang Tabelle A 10 zu finden.

Alle Brote wurden mit einem Spezialöl gebacken, welches ausschließlich aus den FS Capryl-/Caprinsäure bestand. Es wurde daher in Abbildung 19 zunächst die Veränderung des Gehaltes an Capryl-/Caprinsäure mit der Dotierungsart (Enzym und Konzentrationslevel) und Lagerdauer dargestellt.

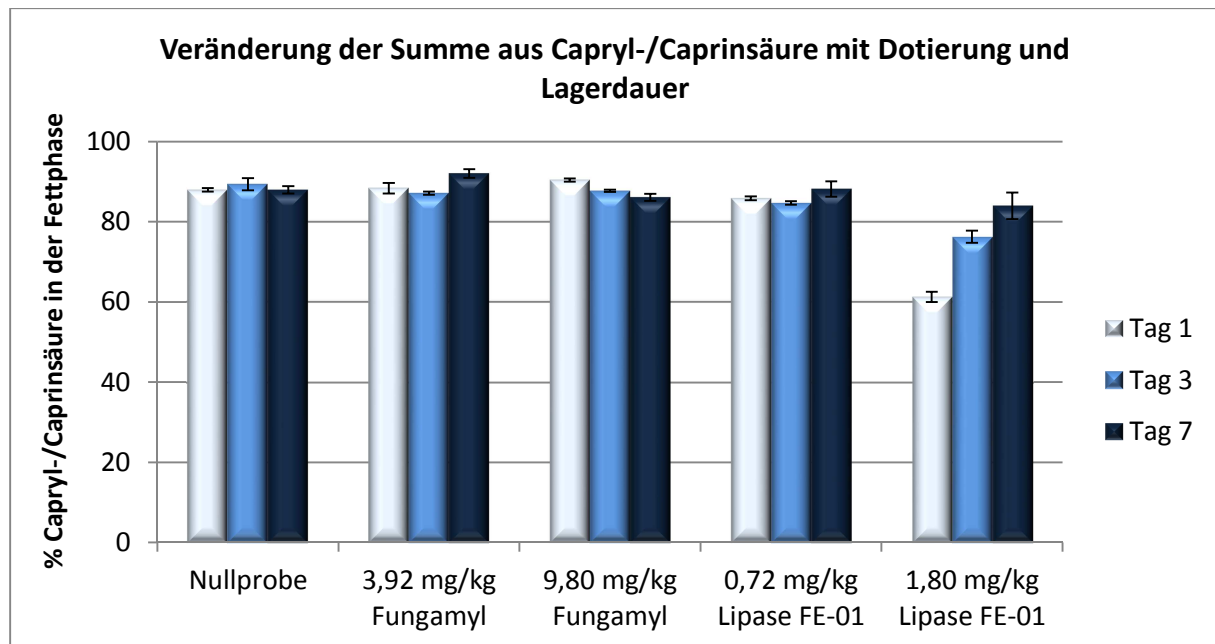


Abbildung 19: Veränderung der Summe aus Capryl-/Caprinsäure mit Dotierung und Lagerdauer

N=3; dargestellt ist jeweils der berechnete Mittelwert sowie die Standardabweichung der Summe aus Capryl- und Caprinsäure

Die Summe aus Capryl-/Caprinsäure nimmt wie erwartet bei allen gebackenen Broten mit mindestens 61 % den Hauptanteil der FS ein. Der Anteil dieser beiden FS ändert sich nicht durch Zugabe von Fungamyl sowie von Lipase FE-01 (0,72 mg/kg) vor dem Backen. Im Laufe der Lagerdauer bleibt sowohl bei der Nullprobe als auch bei den Fungamyl-dotierten sowie Lipasedotierten Broten in der kleinen Konzentration der Anteil an Capryl-/Caprinsäure größer 80 %. Änderungen konnten nur bei der höchsten Lipasedotierung festgestellt werden (nicht signifikant, da geringe Stichprobenzahl). Hier wurde eine Reduktion des Anteils an Capryl-/Caprinsäure auf 61,3 % festgestellt, welche im Verlauf der Lagerdauer (Tag 3: 76,3 %, Tag 7: 84 %) wieder auf Werte im Bereich der anderen Brote stieg. Lipasen katalysieren den Abbau der Lipide zu Di- und Monoglyceriden und freien FS. Der Anteil freier FS wurde nicht bestimmt, ein stark ranziger Geruch der Proben wies auf eine vermehrte Freisetzung freier FS hin.

Um Aussagen über eine mögliche Umwandlung der gesättigten Capryl-/Caprinsäure in andere FS zu schließen, wurden in Abbildung 20 die weiteren gesättigten (Laurinsäure, Myristinsäure, Palmitinsäure, Stearinsäure, Arachinsäure, Behensäure, Lignocerinsäure) sowie die einfach (Palmitoleinsäure, Ölsäure, Erucasäure) und mehrfach (Linolsäure, Linolensäure) ungesättigten FS an Tag 1 in Summe dargestellt. Die weiteren genannten FS stammen nicht aus dem zugegebenen Spezialöl sondern aus dem verwendeten Weizenmehl und der Hefe.

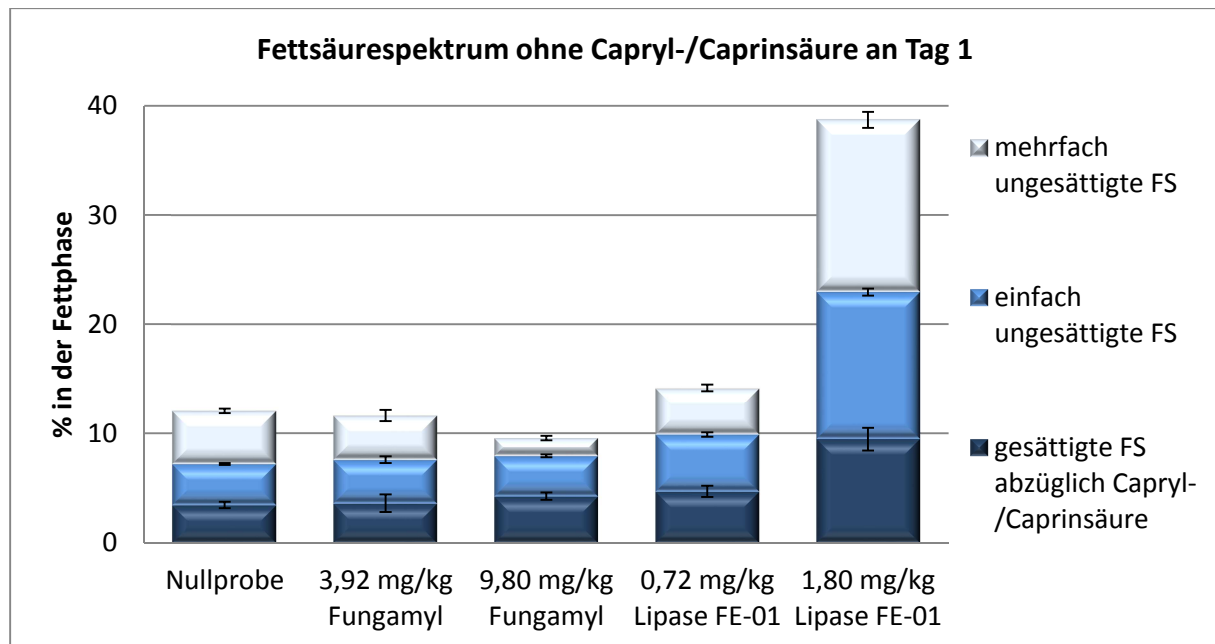


Abbildung 20: Fettsäurespektrum der Brote abzüglich der Werte der Capryl-/Caprinsäure an Tag 1

N=3; FS: Fettsäuren; dargestellt ist jeweils der berechnete Mittelwert sowie die Standardabweichung der Summe der gesättigten FS außer Capryl- und Caprinsäure, einfach ungesättigter FS und mehrfach ungesättigter FS

Auch bei Betrachtung der Zusammensetzung weiterer geprüfter FS (außer Capryl-/Caprinsäure) ist ein Unterschied zum Nullbrot ausschließlich bei der höchsten Lipase Dotierung zu sehen. Hier konnten neben dem Gehalt an Capryl-/Caprinsäure mit 9,5 % andere gesättigte sowie 13,5 % einfach und 15,8 % mehrfach ungesättigte FS analysiert werden. Dies bestätigt die Vermutung, dass es zu einer Umwandlung von Capryl-/Caprinsäure in andere FS verschiedener Art kommt. Das unter 3.1.3 diskutierte mögliche Vorliegen einer Desaturase in der technischen Lipase FE-01 geht mit der Verschiebung des Fettsäurespektrums von der ungesättigten Capryl-/Caprinsäure zu einfach und mehrfach ungesättigten FS einher. Im Verlauf der Lagerdauer kommt es korrelierend zum Anstieg des Capryl-/Caprinsäureanteils zu einem Abfall der restlichen gemessenen FS. Die entstandenen freien FS werden vermutlich einerseits über die β -Oxidation abgebaut und andererseits dem Lipoxygenaseweg zugeführt und so depletiert.

Um die Bedeutung der Auswahl des Fettes beim Einsatz einer technischen Lipase im Backprozess deutlich zu machen, wurden weiterhin Brote mit ähnlicher Rezeptur (Vergleich Tabelle 7 und Tabelle 16) und Lipasekonzentration (Vergleich 2.2.4.3 und 3.1), jedoch mit Erdnussöl anstelle des Spezialöls gebacken. Erdnussöl besteht hauptsächlich aus den FS Ölsäure (einfach ungesättigt), Linolsäure (mehrfach ungesättigt) und Palmitinsäure (gesättigt) und enthält keine Capryl-/Caprinsäure. Die Ergebnisse sind im Anhang Tabelle A 11 notiert. Abbildung 21 zeigt das Fettsäurespektrum der mit Erdnussöl gebackenen enzymfreien und -dotierten Brote.

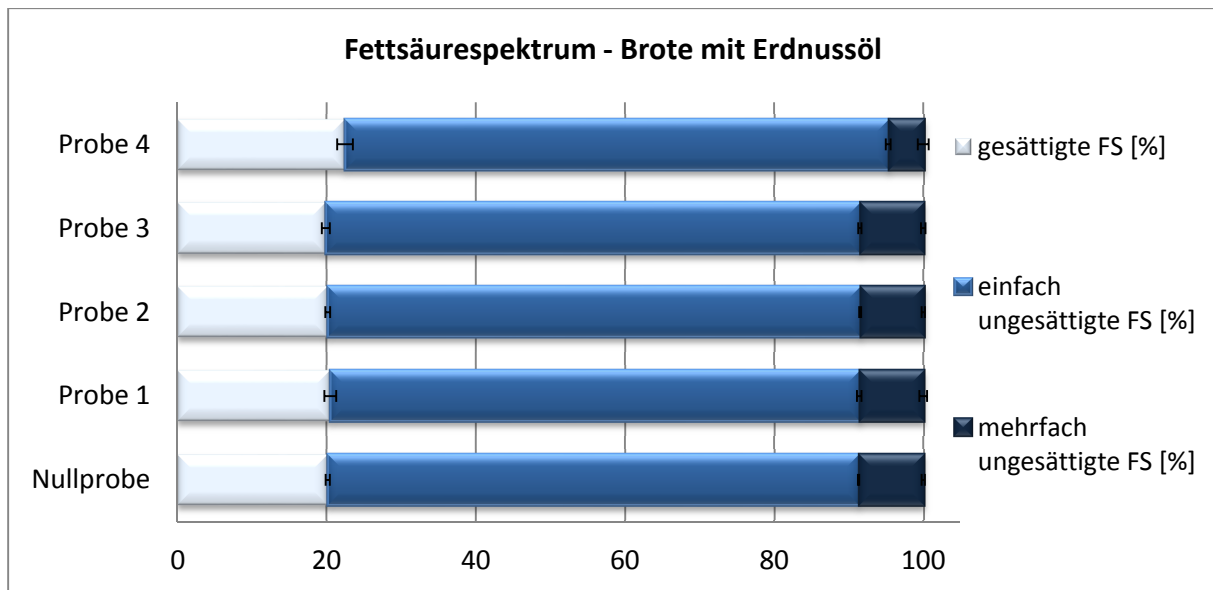


Abbildung 21: Fettsäurespektrum der Brote, gebacken mit Erdnussöl

N=3; FS: Fettsäuren; dargestellt ist jeweils der berechnete Mittelwert sowie die Standardabweichung der Summe der gesättigten FS, einfach ungesättigten FS und mehrfach ungesättigten FS

Das Fettsäurespektrum der mit Erdnussöl gebackenen Brote besteht aus etwa 20 % gesättigten sowie 70 % einfach (fast ausschließlich Ölsäure) und 10 % mehrfach ungesättigten FS. Es können nur bei der Probe 4 (höchste Dotierung von Fungamyl und Lipase FE-01) geringe Änderungen (Anstieg der gesättigten (20,1 % auf 22,5 %) und einfach ungesättigten (70,9 % auf 72,8 %) FS, Abfall der mehrfach ungesättigten FS (8,5 % auf 7,8 %)) im Fettsäurespektrum in Abhängigkeit der Enzymzugabe festgestellt werden, welche jedoch nicht signifikant sind und in einer Analyse mit größerer Stichprobenzahl wiederholt werden sollten. Die bei den Broten mit Spezialöl diskutierten Prozesse der Umwandlung gesättigter in ungesättigte FS durch die Enzymaktivität der Desaturase im Enzymmaterial scheint hier unterdrückt zu werden. Es wird vermutet, dass die hohe Konzentration von Ölsäure die Umwandlung stört. Eventuell handelt es sich um eine Art Substrat-Inhibierung bzw. – Unzugänglichkeit, sodass Capryl-/Caprinsäure leichter von dem Desaturase Enzym umgesetzt werden kann als die vorhandenen gesättigten FS (hauptsächlich Palmitin- und Stearinsäure) im Erdnussöhlhaltigen Brot.

Für einen Vergleich des Fettsäurespektrums mit kommerziell erhältlichen Broten wurden Daten von der IGV GmbH bereitgestellt (Anhang Tabelle A 12), da es in der Literatur keine Referenz-Fettsäurespektren gibt. Hierfür wurden die ermittelten Analysenwerte für den Fettgehalt sowie der Anteil gesättigter FS und einfach bzw. mehrfach ungesättigter FS von 10 Broten gemittelt und mit den Werten der Testmaterialien verglichen. Der im Durchschnitt ermittelte Gehalt von 11,6 % gesättigter FS, 60,8 % einfach ungesättigter FS sowie 27,6 % mehrfach ungesättigter FS ist mit den Werten der Erdnussöhlhaltigen Brote vergleichbar.

Die Anwendung eines Spezialöls aus Capryl-/Caprinsäure ist nicht Standard in der Backproduktion, verhalf aber dazu die Auswirkungen des Zusatzes einer technischen Lipase zu Backprodukten mit unterschiedlichen Fetten betrachten zu können. Es konnte gezeigt werden, dass die Lipase-Aktivität von der vorliegenden FS-Zusammensetzung abhängt und so die Brotqualität beeinflusst. Die Nutzung der Capryl-/Caprinsäure als Backfett hat dazu geführt, dass die bekannten positiven Effekte des Zusatzes technischer Lipase (verbessertes Brotvolumen und Emulgatorersatz) nur noch eingeschränkt nachweisbar waren. Genauso lässt sich vermuten, dass die Menge des Fettes einen Einfluss auf die

Wirkung der Lipase haben könnte. Möglicherweise wird die Lipase durch Zugabe von Fett von der eigentlichen Aufgabe, die endogenen Lipide im Mehl zu spalten, abgewendet. Es sind noch weitere, im Rahmen dieser Arbeit nicht erfasste Untersuchungen (weitere Fette und Fettgehalte, technische Lipasen, Konzentrationsbereiche), angebracht um die Ausmaße des Sachverhaltes zu konkretisieren. Auch dieses Beispiel konnte zeigen, dass es Anwendungsspielräume technischer Enzyme im Rahmen des Bäckerhandwerks gibt, die quantitativ (z.B. Messung der Enzymkonzentration im Teig) genauer erfasst werden sollten. Weiterhin wurde ein Einfluss der Enzyme auf die Lagerdauer nachgewiesen, was auf eine Restaktivität der Enzyme im gebackenen Produkt und damit auf einen Widerspruch zur rechtlichen Deklarationspolitik hindeutet.

3.1.7 Einfluss auf das Zuckerspektrum

Die Testmaterialien wurden auf die Zucker Glukose, Fruktose, Laktose, Saccharose und Maltose untersucht. Die Zucker Laktose und Saccharose konnten in keiner der Proben nachgewiesen werden. Der Gesamtzuckergehalt war mit 5,4 g/100 g (3,92 mg/kg Fungamyl) bzw. 5,6 g/100 g (9,80 mg/kg Fungamyl) in den mit Fungamyl dotierten Proben am höchsten. Die mit Lipase FE-01 dotierten Brote zeigten im Vergleich zur Nullprobe (2,75 g/100 g) ebenfalls einen erhöhten Zuckergehalt mit 3,8 g/100 g (0,72 mg/kg Lipase FE-01) bzw. 5 g/100 g (1,80 mg/kg Lipase FE-01). Die Verteilung der gemessenen Zucker ist in Abbildung 22 beispielhaft an Tag 1 dargestellt, da sich das Zuckerspektrum im Laufe der Tage nur geringfügig verändert hat.

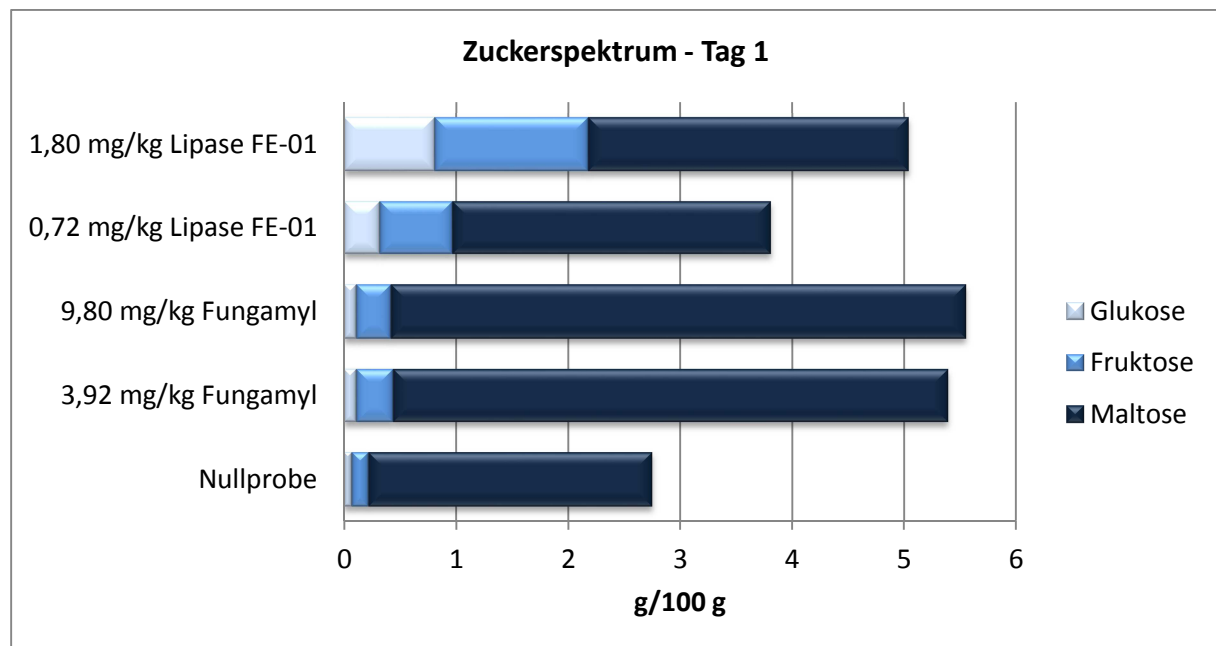


Abbildung 22: Zuckerspektrum an Tag 1

N=2; analysiert wurden die Zucker Glukose, Fruktose, Laktose, Saccharose und Maltose; dargestellt ist jeweils der berechnete Mittelwert der Zucker Glukose, Fruktose und Maltose; nicht nachgewiesen wurden die Zucker Laktose und Saccharose

In der Nullprobe wurde hauptsächlich Maltose gemessen. Eine leicht erhöhte Menge an Fruktose und ein starker Anstieg der Menge an Maltose wurden in den Fungamyl dotierten Proben nachgewiesen. Der prozentuale Anteil an Maltose ist aufgrund des starken Gesamtanstiegs der Zucker bei den Fungamyl dotierten Proben mit 92 % vergleichbar mit dem der Nullprobe. Das Zuckerspektrum der

Lipasedotierten Proben ist konzentrationsabhängig verändert. Ein höherer Glukose- und Fruktose-Anteil ging mit einer Reduktion des Maltoseanteils am Gesamtzucker auf 75 % (0,72 mg/kg Lipase FE-01) bzw. 57 % (1,80 mg/kg Lipase FE-01) einher. Die Rohdaten der Messung der Zuckerspektren sind im Anhang Tabelle A 13 festgehalten.

Das Hauptabbauprodukt der technisch eingesetzten *alpha*-Amylase (Fungamyl) ist bei Anwesenheit von *beta*-Amylase (in Weizenmehl natürlich vorhanden) Maltose, was durch den starken Anstieg des Gesamtzuckergehaltes sowie des Maltosegehaltes bestätigt wird. Der katalysierte Prozess des Stärkeabbaus durch *alpha*-Amylase führte zu einer erhöhten Zuckerfreisetzung, nicht zur Verschiebung des Zuckerspektrums. Dies wurde anhand der Daten bestätigt, da der prozentuale Anteil der Maltose am Gesamtzucker in der Nullprobe und den Fungamyl-dotierten Proben vergleichbar war.

Der gemessene Anstieg des Glukose- und Fruktosegehaltes in den Lipasedotierten Broten war nicht zu erwarten, da dieses technische Enzym laut Herstellerangaben ausschließlich aus einer Lipase besteht, die auf den Zuckerabbau keinerlei Einfluss hat. Es wird vermutet, dass auch stärkespaltende Enzyme in dem technischen Enzym vorhanden sind, was auf eine Unreinheit der industriellen Produkte hinweist.

3.1.8 Einfluss auf sensorische Parameter

Es wurden die sensorischen Parameter Form/Aussehen (Kruste/Krume), Frischeeindruck, Geruch, Biss/Kaueindruck/Löslichkeit und Geschmack an den Tagen 1, 3 und 7 geprüft. Die Ergebnisse sind im Anhang Tabelle A 14 bis Tabelle A 15 zu finden. Die sensorische Prüfung ergab eine Verbesserung aller untersuchten Kriterien mit ansteigendem Fungamyl-Gehalt. Die beste Bewertung erhielt das Brot mit 9,80 mg/kg Fungamyl. Die Lipasedotierten Testmaterialien zeigten mangelhafte Ergebnisse und wurden als „nicht verzehrfähig“ eingestuft. Hauptursache war ein stark ranziger Geruch und Geschmack.

In vorherigen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die in die sensorische Bewertung einfließenden Parameter wie Form und Aussehen durch den Zusatz von Fungamyl positiv ausfallen. Das durch die *alpha*-Amylase sowie Xylanase (Fungamyl) erhaltene Brotvolumen sowie durch die *alpha*-Amylase entstandene Braunfärbung der Kruste führte zu einer deutlich besseren sensorischen Bewertung als beim Nullbrot. Die durch die Aktivität der *alpha*-Amylase freigesetzten Zucker bilden mit den vorhandenen Aminosäuren im Zuge der Maillard-Reaktion Aroma- und Farbstoffe, die zu einer Krustenfärbung der Backware führen [33]. Auch alle weiteren geprüften sensorischen Parameter sind durch den Zusatz von *alpha*-Amylasen bzw. Xylanasen zu erreichen. Es konnte eine konzentrationsabhängige Steigerung des positiven sensorischen Effektes belegt werden. Dies spiegelt die Notwendigkeit eines kontrollierten quantitativen Einsatzes technischer Enzyme wieder. Für einen gleichbleibenden Einsatz technischer Enzyme und die verbundene Herstellung optimaler Produkte müssen quantitative Verfahren begleitend den Einsatz technischer Enzyme kontrollieren.

Die negativen sensorischen Ergebnisse der Lipasedotierten Brote werden in Zusammenhang mit dem Einsatz des Spezialöls (bestehend aus C8/C10 Capryl-/Caprinsäure) begründet. Die unter 3.1.3 beschriebene Umsetzung ungesättigter freier FS durch das Enzym Lipoxygenase führt zur Bildung von Fettperoxiden, die durch einen ranzigen Geschmack gekennzeichnet sind [167, 168]. Zudem können freie FS, die vermehrt durch die bereits diskutierte Katalyse der Umwandlung von Capryl-/Caprinsäure durch das Enzym Desaturase entstehen, ebenfalls ranzige Geschmacksmerkmale bedingen. Auch die im Verlauf der β -Oxidation gebildeten kurzkettigen freien FS können ursächlich

für die Ausprägung eines ranzigen Geschmacks sein. Freie FS reagieren mit Amylose zu Amylose-Lipid-Komplexen, sodass ihr pool depletiert wird. Letztlich ist dadurch die Bildung eines durch freie FS bedingten ranzigen Geschmacks limitiert [169]. Die Anwendung von Lipasen als Emulgator-Ersatz nimmt mehr und mehr an Bedeutung zu. Dass die Auswahl des Fettes für die positive Wirkung der Lipase von Bedeutung ist, konnte gezeigt werden. Eine fachgerechte Anwendung ist nötig, um gleichbleibend optimale Produkte zu erhalten.

3.2 Identifikation der Enzyme in Fungamyl, Amylase TXL und Lipase FE-01

Die technischen Enzyme Fungamyl und Lipase FE-01 wurden in Probenpuffer gelöst und mit SDS-PAGE aufgetrennt. Mit Hilfe eines zeitgleich aufgetragenen Proteinstandards erfolgte die Bestimmung des Molekulargewichts der Proteinbanden. Die Banden wurden anschließend ausgeschnitten und mit einem In-Gel-Verdau in Peptide zerlegt. Das so generierte Peptidspektrum wurde anschließend mit MALDI-TOF-MS-Messung aufgenommen und die Proteine der technischen Enzyme identifiziert. Unter Nutzung der Proteinsequenzdatenbank SwissProt 2013_02_, -_11 und „Fungi-EST“ erfolgte die Auswertung der Massenspektren mit der Software Bruker Daltonics Biotools (Ver. 3.2; Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany). Die verwendeten Suchkriterien sind in 2.2.2.3 beschrieben. Ein Protein galt als identifiziert wenn eine Sequenzabdeckung über 20 % sowie ein Protein Score größer 57 nachgewiesen wurden.

3.2.1 Aminosäuresequenzidentifikation der *alpha*-Amylase und Endo-1,4-Xylanase aus Fungamyl

Die Proteinbanden von Fungamyl sind in Abbildung 23 dargestellt. Es wurden 2 Proteinbanden nachgewiesen und die molekularen Massen von 24,8 kDa sowie 51,3 kDa ermittelt.

Die mit MALDI-TOF-MS erhaltenen Massenspektren der verdauten Proteinbanden (In-Gel-Verdau) sind in Abbildung 24 und Abbildung 25 dargestellt.

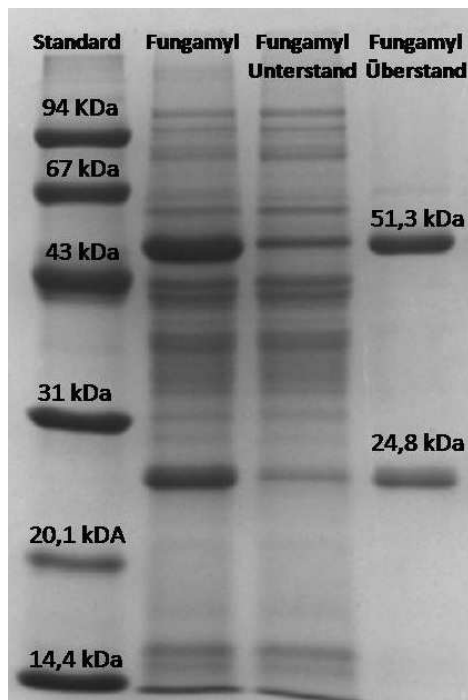


Abbildung 23: Gel-Abbildung der SDS-PAGE des technischen Enzyms Fungamyl

Von links: Pharmacia Standard, Fungamyl gesamt, Fungamyl Unterstand nach Zentrifugation, Fungamyl Überstand nach Zentrifugation (mit Probenpuffer verdünnt)

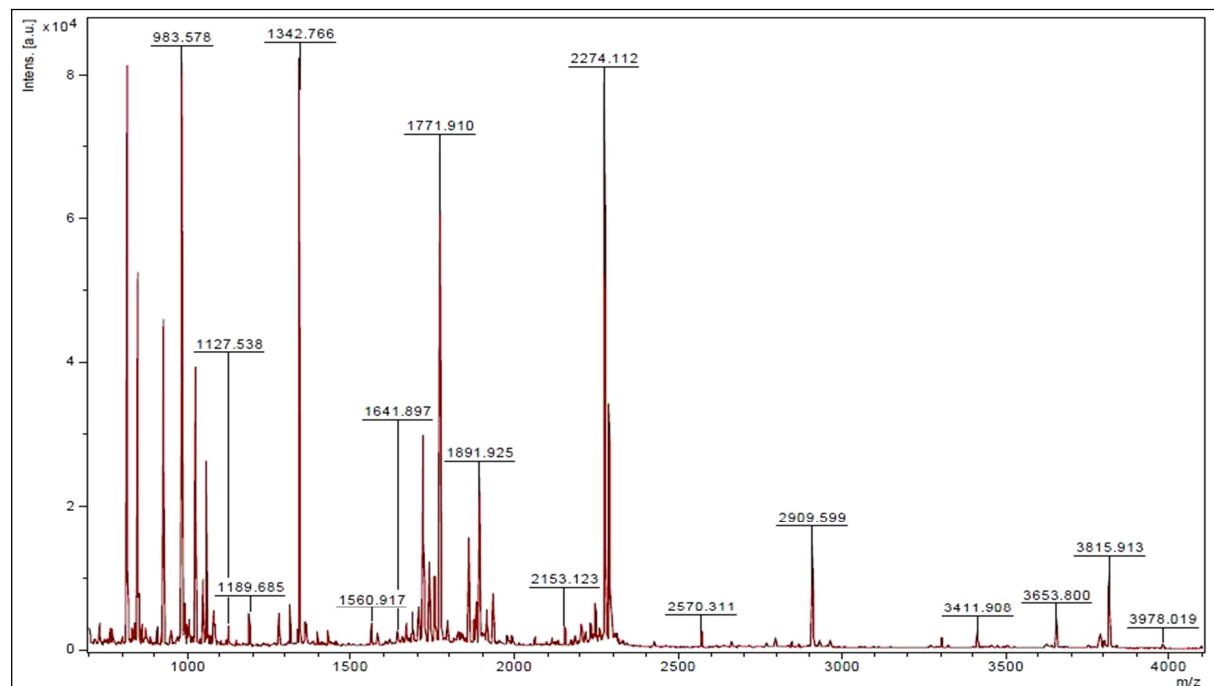


Abbildung 24: Massenspektrum von Fungamyl-Überstand (51,3 kDa) nach In-Gel-Verdau und MALDI-TOF-MS Messung

y-Achse: Intensität in a.u.; x-Achse: m/z: Masse-zu-Ladungsverhältnis

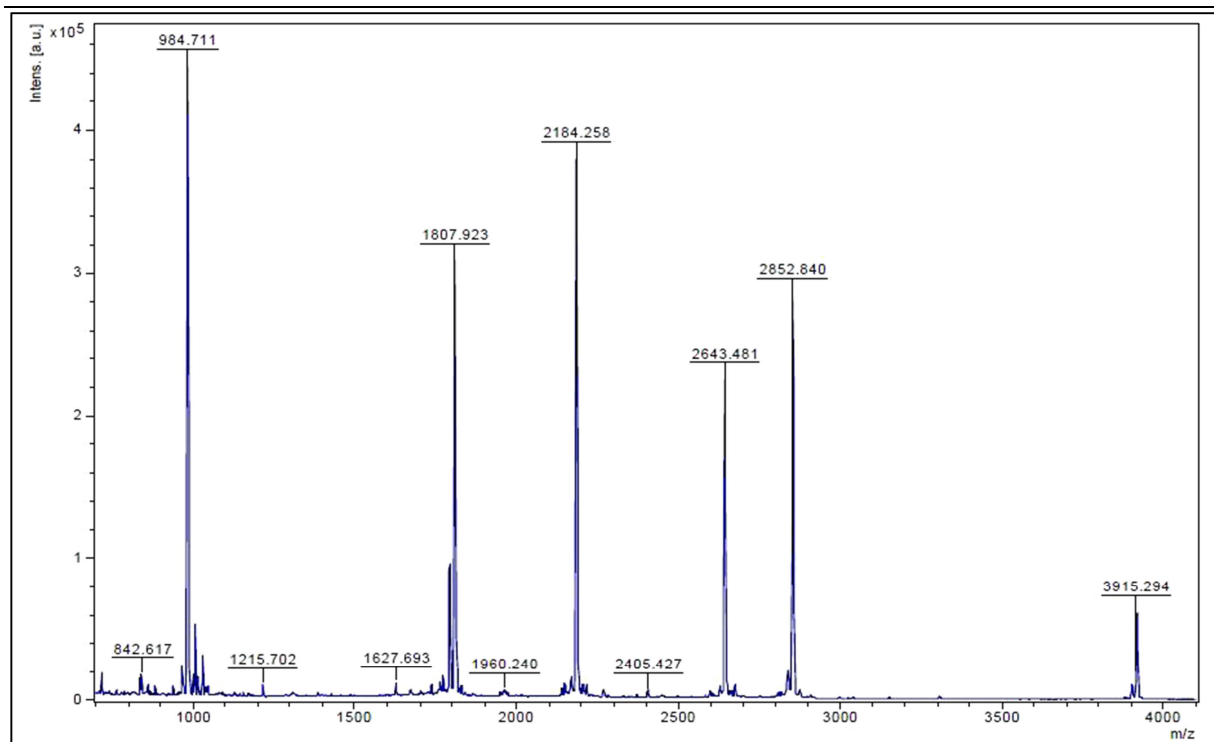


Abbildung 25: Massenspektrum von Fungamyl-Überstand (24,8 kDa) nach In-Gel Verdau und MALDI-TOF-MS Messung

y-Achse: Intensität in a.u.; x-Achse: m/z: Masse-zu-Ladungsverhältnis

Mit einem mittleren Protein Score von 78 und einer mittleren Sequenzabdeckung von 35 % konnte die Amylase von Fungamyl eindeutig als *alpha*-Amylase des Pilzes *Aspergillus oryzae* identifiziert werden. Abbildung 26 zeigt die rot markierten Peptide, die für die Identifikation der *alpha*-Amylase (*Aspergillus oryzae*) erkannt wurden.

| | | | | | | |
|------------|------------|-------------|------------|-------------------|------------|------------|
| 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | 60 | 70 |
| ATPADWRSQS | IYFLIHDRFA | RTDGSPTATC | NIADQK | YCGG TWQGLIIDLKLD | YIQMGFTAI | WITPVTALP |
| 80 | 90 | 100 | 110 | 120 | 130 | 140 |
| QITAYGDAYH | GYWQODIYSL | NENYGTADDL | KALSSALHER | GMYLMVDVVA | NHMGYDGAGS | SVDYSVEKPF |
| 150 | 160 | 170 | 180 | 190 | 200 | 210 |
| SSQDYFHPFC | FIQNYEDQIQ | VEDCWLGDNF | VSLPDLDTTK | DVVRNEWYDW | VGSLVSNYSI | DGLRIDIVKH |
| 220 | 230 | 240 | 250 | 260 | 270 | 280 |
| VQKDFWPCYN | KAAGVYCIGE | VLDGDPAYTC | PYQNVMDGVL | NYPIYYPLIN | AFKSTSGSMD | DLYNMINIVK |
| 290 | 300 | 310 | 320 | 330 | 340 | 350 |
| SDCPDSILIG | TFVENHDNPR | FASYINDIAL | AKNVAAFIL | NDGIPIIYAG | QEQHYAGGND | PANREAIWLS |
| 360 | 370 | 380 | 390 | 400 | 410 | 420 |
| GYPTDSELYK | LIASANAIRN | YAIKSDTGFV | TYKNWPIYKD | DTTIAMRKGF | DGSQIVTILS | NKGASGDSYT |
| 430 | 440 | 450 | 460 | 470 | 480 | |
| LSLSGAGYTA | GQQLIEVICG | TTVTIVGSDGN | VEVEMAGGLP | RVLYPTEKLA | GSKICSSS | |

Abbildung 26: Proteinsequenz *alpha*-Amylase (*Aspergillus oryzae*)

Identifizierte Peptide (rot) der Probe Fungamyl-Überstand (51,3 kDa); Sequenzabdeckung: 35 %, Protein Score: 78, Zahl der ermittelten Peptide: 76 (Mehrzahl in sehr niedriger Intensität); Zahl der gematchten Peptide: 13

Das identifizierte Enzym besitzt laut Proteindatenbank (UniProtKB - POC1B3 (AMYA1_ASPOR)) eine Molare Masse von 54,8 kDa. Die Abweichung zur elektrophoretisch ermittelten Molaren Masse

von 51,3 kDa kann darauf zurückzuführen sein, dass nicht alle Proteine der Gesetzmäßigkeit der Beweglichkeit in SDS-Polyacrylamidgelen (SDS-Proteinkomplex umgekehrt proportional zum Logarithmus des Molekulargewichtes) folgen. Die mittels SDS-PAGE ermittelten apparenten Molekulargewichte können daher geringfügig vom tatsächlichen Molekulargewicht abweichen. Aufgrund der geringen Differenz von 3,5 Da bestätigen die Ergebnisse der Molmassenbestimmung mittels SDS-PAGE die Ergebnisse der MS-Analyse.

Mit einem mittleren Protein Score von 92 und einer mittleren Sequenzabdeckung von 57 % konnte die Xylanase von Fungamyl eindeutig als Endo-1,4-Xylanase des Pilzes *Thermomyces lanuginosus* identifiziert werden. In Abbildung 27 sind die Peptide rot markiert, die für die Identifikation der Endo-1,4-Xylanase (*Thermomyces lanuginosus*) erkannt wurden.

| | | | | | | |
|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | 60 | 70 |
| MVGFTPVALA | ALAATGALAF | PAGNATELEK | RQTTPNSEGW | HDGYYYSWWS | DGGAQATYTN | LEGGTYEISW |
| 80 | 90 | 100 | 110 | 120 | 130 | 140 |
| GDGGNLVGGK | GWNPGLNARA | IHFEGVYQPN | GNSYLAVYGW | TRNPLVEYYI | VENFGTYDPS | SGATDLGTVE |
| 150 | 160 | 170 | 180 | 190 | 200 | 210 |
| CDGSIYRLGK | TTRVNAPSID | GTQTFDQYWS | VRQDKRTSGT | VQTGCHFDAW | ARAGLNVNGD | HYYQIVATEG |
| 220 | 230 | | | | | |
| YFSSGYARIT | VADV | | | | | |

Abbildung 27: Proteinsequenz Xylanase (*Thermomyces lanuginosus*)

Identifizierte Peptide (rot) der Probe Fungamyl-Überstand (24,8 kDa); Sequenzabdeckung: 57 %, Protein Score: 92; Zahl der ermittelten Peptide: 45 (Mehrzahl in sehr niedriger Intensität); Zahl der gematchten Peptide: 6

Das Enzym Endo-1,4-Xylanase (*Thermomyces lanuginosus*) hat laut Proteindatenbank (UniProtKB - O43097 (XYNA_THELA)) ein Molekulargewicht von 24,4 kDa. Das elektrophoretisch ermittelte Molekulargewicht weicht mit 24,8 kDa nur geringfügig ab und unterstützt das Ergebnis der MS-Analyse.

3.2.2 Proteinsequenzidentifikation der Lipase aus Lipase FE-01

Die Proteinbanden von Lipase FE-01 sind in Abbildung 28 dargestellt. Es wurde eine molekulare Masse von 34 kDa ermittelt. Das mit MALDI-TOF-MS erhaltene Massenspektrum des In-Gel-Verdau-Produktes ist in Abbildung 29 dargestellt.

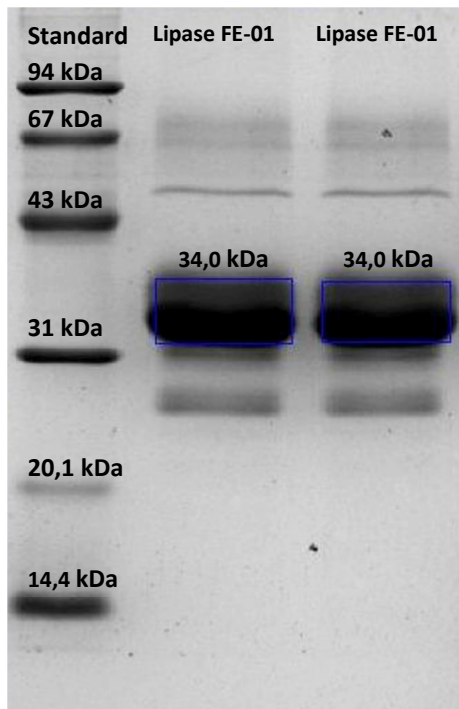


Abbildung 28: Gel-Abbildung der SDS-PAGE des technischen Enzyms Lipase FE-01

Von links: Pharmacia Standard, Doppelbestimmung Lipase FE-01 (Probe 1 und 2)

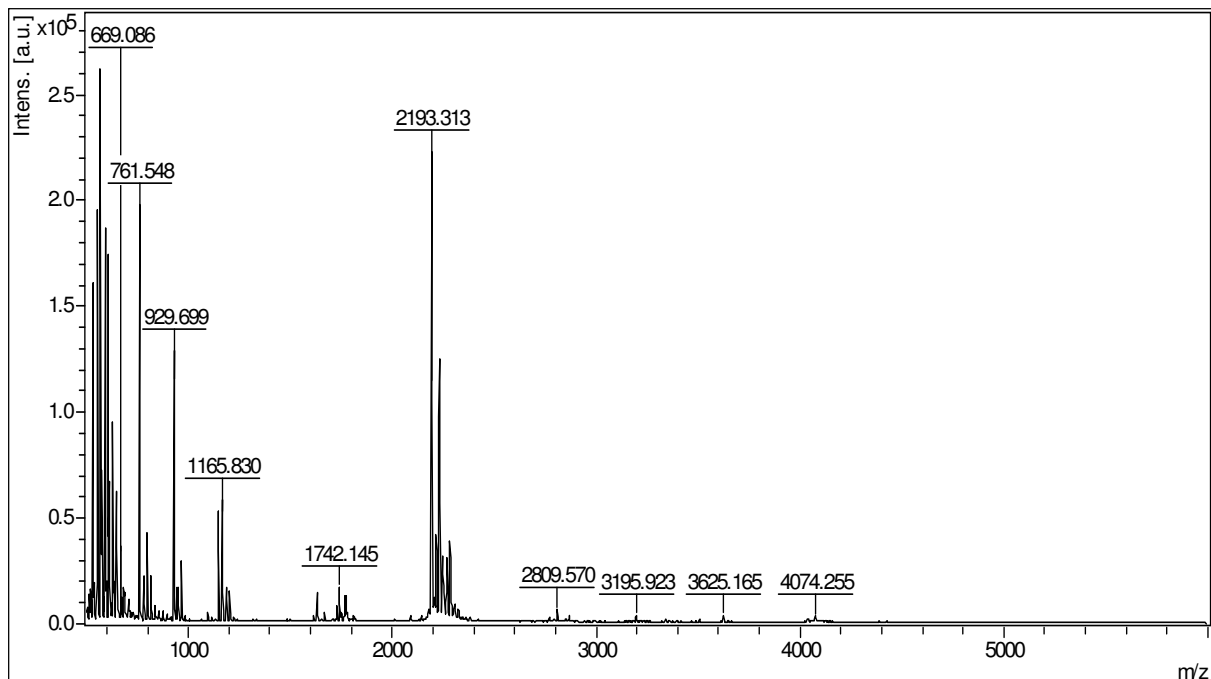


Abbildung 29: Massenspektrum von Lipase FE-01 (Probe 1) nach In-Gel-Verdau und MALDI-TOF-MS Messung

Mit einem mittleren Protein Score von 131 und einer mittleren Sequenzabdeckung von 57 % konnte die Lipase von Lipase FE-01 eindeutig als Lipase des Pilzes *Thermomyces lanuginosus* identifiziert werden. Abbildung 30 zeigt die rot markierten Peptide, die für die Identifikation der Lipase (*Thermomyces lanuginosus*) erkannt wurden.

| | | | | | | |
|------------|-------------|------------|-------------|------------|------------|------------|
| 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | 60 | 70 |
| MRSSLVLFV | SAWTALASPI | RREVSQDLFN | QFNLFQAQYSA | AAYCGKNDA | PAGTNICTG | NACPEVEKAD |
| 80 | 90 | 100 | 110 | 120 | 130 | 140 |
| ATFLYSFEDS | GVGDTVGFGLA | LDNTNKLIVL | SFRGSRSIEN | WIGNLNFDLK | EINDICSGCR | GHDGFTSSWR |
| 150 | 160 | 170 | 180 | 190 | 200 | 210 |
| SVADTLRQKV | EDAVREHPDY | RVVFTGHSLG | GALATVAGAD | LRNGYDIDV | FSYGAPRVGN | RAFAEFLTVQ |
| 220 | 230 | 240 | 250 | 260 | 270 | 280 |
| TGGTLYRITH | TNDIVPRLPP | REFGYSHSSP | EYWIKSGTLV | PVTRNDIVKI | EGIDATGGNN | QPNIPDIPAH |
| 290 | 300 | | | | | |
| LWYFGLIGTC | L | | | | | |

Abbildung 30: Proteinsequenz Lipase (*Thermomyces lanuginosus*)

Identifizierte Peptide (rot) der Probe 1 Lipase (34,0 kDa); Sequenzabdeckung: 57 %, Protein Score: 131; Zahl der ermittelten Peptide: 81 (Mehrzahl in sehr niedriger Intensität); Zahl der gematchten Peptide: 16

Das Enzym Lipase (*Thermomyces lanuginosus*) hat laut Proteindatenbank (UniProtKB - O59952 (LIP_THELA)) ein Molekulargewicht von 31,8 kDa. Das elektrophoretisch ermittelte Molekulargewicht weicht mit 34,0 kDa um 2,2 kDa ab und unterstützt dennoch das Ergebnis der MS-Analyse aufgrund der erwähnten Schwankungen bei der Molekulargewichtsermittlung mittels SDS-PAGE.

Aufgrund der Ähnlichkeit der Aminosäuresequenzen verschiedener Enzymgruppen (z.B. Amylasen) müssen die Ergebnisse der Identifikation besonders sorgfältig geprüft werden. Da die Identifikation der Aminosäuresequenz der untersuchten technischen Enzyme nur für die Auswahl spezifischer Markerpeptide (2.2.5) genutzt wurde, erfolgte kein Abgleich (BLAST) mit anderen Aminosäuresequenzen. Die ausgewählten Markerpeptide wurden jedoch intensiv auf Spezifität geprüft, sodass Fehler in Form von falsch positiven Ergebnissen ausgeschlossen werden können. Dass es sich bei der identifizierten Aminosäuresequenz tatsächlich um das Enzym des geprüften technischen Enzyms handelt, wurde durch die Messung ausgewählter Markerpeptide mit LC-MS/MS (2.2.5) erneut geprüft. Durch die Kombination aus SDS-PAGE, In-Gel Verdau und MALDI-TOF-MS Messung konnten 3 Enzyme mit eindeutigem Protein Score identifiziert werden. Technische Enzyme werden in der Backindustrie vor allem in Form von kommerziell erhältlichen Weizenmehl-Backmischungen eingesetzt. Durch die Vielzahl der darin vorhandenen ähnlichen aber unterscheidbaren Proteine (natürliche oder synthetische) kann es zu Problemen bei der Anwendung der beschriebenen Methode kommen [170]. Die uneindeutige oder fehlerhafte Zuordnung der Proteine aufgrund von Überlagerungen verschiedener Proteine mit ähnlichem Molekulargewicht würde eine Identifikation erschweren. Auch industriell gefertigte Weizenmehl-unabhängige Rohextrakte technischer Enzyme sind nicht rein, da Proteine des Syntheseorganismus ebenfalls vorhanden sind. Zu erkennen ist dies beispielsweise an den Gelabbildungen der SDS-PAGE der untersuchten technischen Enzyme (Abbildung 23, Abbildung 28). Als Beispiel wurde bereits im Abschnitt 3.1.6 erwähnt, dass Pilze Fettsäure Desaturase synthetisieren, welche möglicherweise in dem technischen Enzym Lipase FE-01 vorhanden war. Da dieses Enzym in der Literatur nur wenig diskutiert wird, konnte keine Angabe zum Molekulargewicht für eine annähernde Zuordnung einer Gelbande verwendet werden. Die zahlreichen zusätzlichen Banden konnten mit der angewandten Methode nicht identifiziert werden, da die Konzentrationen zu gering waren. Eine bessere Vortrennung der Proteingemische würde die eindeutige Zuordnung verschiedener Proteine verbessern und Fehler bei der Identifikation technischer Enzyme vor allem in Backmitteln oder unreinen Substanzen minimieren. Bisher wurde die zweidimensionale Gelelektrophorese (2-DE) als Möglichkeit der Kopplung an MS/MS-Techniken zur Separation und Identifikation von einzelnen

Proteinen ausgeschlossen [171]. Die gesteigerte Nachfrage nach quantitativer, sensitiver als auch reproduzierbarer Visualisierung von Proteinen in 2-DE führte dazu, dass die Differenz-Gelelektrophorese (2-DiGE) als quantitatives und standardisiertes Verfahren entwickelt wurde [172]. 2 Proben werden mit unterschiedlicher Fluoreszenzmarkierung versehen und auf ein Gel aufgetragen [172, 173]. Unterschiede durch die schlecht reproduzierbare Gelherstellung (Inhomogenität) können so vernachlässigt werden. Das Verfahren der DiGE würde die Quantifizierung eines technischen Enzyms im Backmittel vereinfachen und stellt eine Alternative zur beschriebenen Methodik dar.

3.2.3 Identifikation der *alpha*-Amylase aus Amylase TXL

Auf dem Zertifikat des Herstellers ASA Spezialenzyme GmbH ist als Enzymbeschreibung „Amylase“ angegeben. Das Enzym Amylase TXL wurde zunächst mit der qualitativen LC-MS/MS-Methode geprüft (2.2.5) und die Amylase als *alpha*-Amylase des Pilzes *Aspergillus oryzae* identifiziert (Abbildung 31).

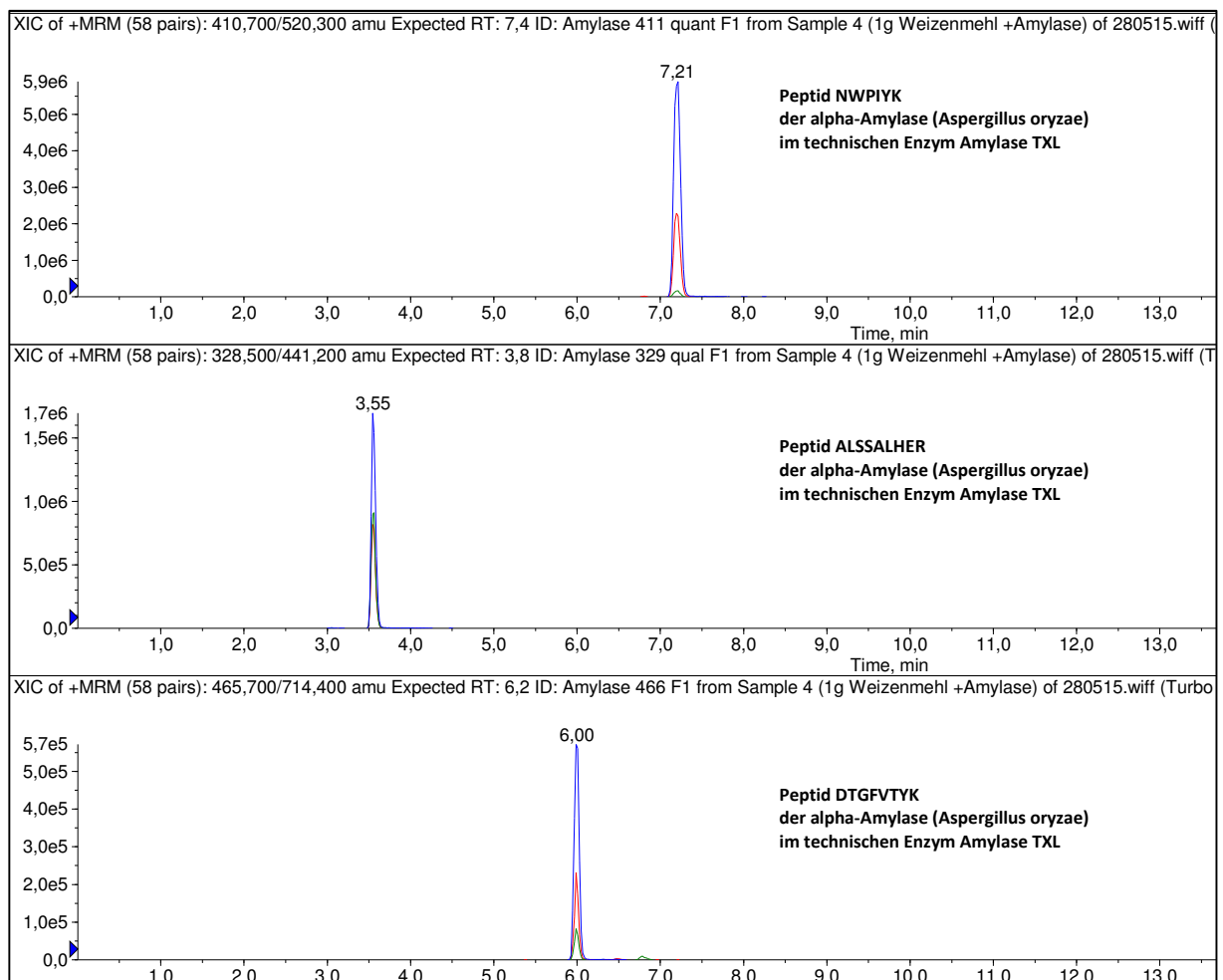


Abbildung 31: LC-MS/MS-Chromatogramm der *alpha*-Amylase in Amylase TXL

y-Achse: Intensität in cps; x-Achse: Retentionszeit in Minuten; der Nachweis erfolgte durch Messung von 3 Peptiden mit je 3 Fragmenten

Der Nachweis erfolgte durch die Messung von 3 Markerpeptiden (DTGFVTYK, ALSSALHER, NWPIYK) mit jeweils 3 Massenfragmenten in einem Verdauextrakt der Amylase TXL. Durch die zuvor geprüfte Spezifität der gemessenen Markerpeptide ist die Identifikation des genannten Proteins im Produkt

Amylase TXL zweifelsfrei nachgewiesen. Die weitere Zusammensetzung von Amylase TXL wurde jedoch nicht analysiert, sodass das Vorhandensein anderer Enzyme nicht auszuschließen ist.

3.3 Ermittlung und Berechnung der Proteingehalte der technischen Enzyme Fungamyl, Amylase TXL und Lipase FE-01

3.3.1 Ermittlung der Konzentrationen der *alpha*-Amylase und Endo-1,4-Xylanase in Fungamyl mit SDS-PAGE und BSA-Standard

5 mg/ml Fungamyl wurden in Probenpuffer gelöst und ansteigende Volumen von 5 µl bis 20 µl auf einem Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Die Proteinkonzentration der Fungamylproben wurde über die Proportionalität der Bandenintensität einer BSA-Standardreihe (Abbildung A 1, Anhang Tabelle A 17) quantifiziert. Die Reihen wurden viermal gemessen und der Mittelwert und die relative Standardabweichung aus den verschiedenen Probenvolumen berechnet (Anhang Tabelle A 17). Es konnte eine *alpha*-Amylase-Konzentration von 0,098 mg/ml und eine Endo-1,4-Xylanase-Konzentration von 0,052 mg/ml ermittelt werden (Tabelle 34). Dies entspricht einem Anteil von *alpha*-Amylase in Fungamyl von 9,8 % sowie 5,2 % Endo-1,4-Xylanase.

Tabelle 34: Ermittelte Gehalte der *alpha*-Amylase und Endo-1,4-Xylanase in Fungamyl

N=4; MW: Mittelwert; SD: Standardabweichung; RSD: relative Standardabweichung [%]

| Probe | Amylase [mg/ml] | Xylanase [mg/ml] |
|----------------|-----------------|------------------|
| 1 | 0,094 | 0,059 |
| 2 | 0,101 | 0,064 |
| 3 | 0,098 | 0,042 |
| 4 | 0,098 | 0,042 |
| MW | 0,098 | 0,052 |
| SD | 0,003 | 0,011 |
| RSD [%] | 2,9 | 22,0 |

Aufgrund der Vierfachbestimmung und den ermittelten Standardabweichungen der Amylase (2,9 %) und Xylanase (22,0 %) wird von einer Solidität der Werte ausgegangen. Es wurde nicht geprüft inwieweit sich eventuell verschiedene Chargen an Fungamyl unterscheiden. Dies sollte für weitergehende Versuche analysiert werden, um eine generelle prozentuale Verteilung der *alpha*-Amylase und Endo-1,4-Xylanase in Fungamyl bestätigen zu können. Weiterhin sollten die Versuche der Endo-1,4-Xylanase mit einer höheren Einwaage erfolgen, um eine bessere Reproduzierbarkeit zu erhalten.

3.3.2 Berechnung des Lipasegehaltes in Lipase FE-01 sowie des *alpha*-Amylasegehaltes in Amylase TXL

Die Amylase des technischen Enzyms Amylase TXL der Firma ASA Spezialenzyme GmbH wurde in Abschnitt 3.2.3 als *alpha*-Amylase (*Aspergillus oryzae*) qualitativ nachgewiesen. Laut Herstellerinformationen beträgt die Amylasekonzentration aus Amylase TXL 31 mg/g. Dieser Wert wurde genutzt um die Endkonzentration an *alpha*-Amylase in den Referenzmaterialien (3.4) zu ermitteln. Die Endkonzentration der in Abschnitt 3.2.2 identifizierten Lipase (*Thermomyces*

lanuginosus) in den Referenzmaterialien (3.4) wurde ebenfalls mit Hilfe der Herstellerinformationen (Lipase FE-01 18 mg/g) ermittelt.

Die Ergebnisse der quantitativen Bestimmungen der mit Amylase TXL und Lipase FE-01 versetzten Referenzmaterialien beruhen auf den Verpackungsangaben der zugesetzten technischen Enzyme und wurden nicht experimentell ermittelt. Aufgrund wahrscheinlicher Chargen-Differenzen und um den Umgang in der Praxis besser zu simulieren wurde mit den Konzentrationsangaben des Herstellers gearbeitet.

3.4 Referenzmaterialien – Beurteilung nach dem Leitfaden für die Entwicklung von Referenzmaterialien

Es wurden 3 verschiedene Matrizes Referenzmaterial (Mehl, Brot, Keks) mit je einer Nullprobe und vier ansteigenden Konzentrationsstufen der analysierten technischen Enzyme hergestellt.



Abbildung 32: Querschnitte der gebackenen Brote

Von rechts: Nullprobe, Brot Probe 1 - 4

Durch die Auswahl von Mehl als Rohstoff sowie Brot als fettarmes und Keks als fettreiches verarbeitetes Lebensmittel konnte ein großer Matrix-Bereich geprüft werden. Der Einsatz technischer Enzyme im Backgewerbe erfolgt vor allem durch die Zugabe von Backmittel (Gemisch technischer Enzyme mit Mehl als Basis) zum Mehl vor dem Backprozess. Bei fetthaltigeren Gebäckteigen ist ein großer Trend zum Einsatz technischer Enzyme vorhanden. Diese werden direkt zum Teig gegeben. Die zugegebene Menge an Backmittel bzw. technischen Enzymen wird selten genauestens verfolgt, da das Handwerk „nach-Gefühl“ dosiert. Es ist selten eine Beziehung zu Konzentration, Wirkung und Nutzen bekannt. Die dadurch bedingte vermehrte Anwendung technischer Enzyme oberhalb verfügbarer Substratkonzentrationen bzw. ausbleibende qualitative Effekte aufgrund von zu geringer Enzymkonzentration sind die Folge. Die Betrachtung der konzentrationsabhängigen Wirkung technischer Enzyme sowie die Einschätzung der detektierbaren Minimalkonzentrationen zum Nachweis technischer Enzyme sind von Bedeutung und konnten mit den hergestellten Referenzmaterialien geprüft werden. Der aufgrund der Anwendungspraxis angestrebte Konzentrationsbereich zwischen 1 bis 10 mg/kg wurde untersucht und auf Level kleiner 1 bzw. größer 10 mg/kg erweitert (Tabelle 14, Tabelle 18, Tabelle 21).

Die Brote wurden mit einem sehr hohen Reinheitsgrad gebacken, sodass mögliche Verschleppungen minimiert wurden. Um die hohe Angebotsvielfalt im Bereich Brot mit der quantitativen Messmethode bewerten zu können, wäre zukünftig die Herstellung und Prüfung weiterer Brotmatrizes (z. B. Vollkornbrot) sinnvoll.

Prüfung der Homogenität

Die Referenzmaterialien wurden nach Herstellung zerkleinert (Brot und Kekse) und auf mehrere Kunststoffbecher für die Lagerung verteilt. Hierbei wurde die komplette Masse von Mehl und Keks nach Fertigstellung zerkleinert und aliquotiert. Beim Referenzmaterial Brot wurde nur eine Hälfte vorgetrocknet, zerkleinert und aliquotiert. Die Homogenitätsprüfung erfolgte an aus 5 verschiedenen Kunststoffbechern entnommenen Proben. Von jeder Probe wurden 3 unabhängige Bestimmungen unter Wiederholbedingungen durchgeführt. Weiterhin wurden innerhalb eines Bechers 6 Proben bestimmt um die Streuung innerhalb eines Bechers zu messen. Die Messergebnisse befinden sich im Anhang Tabelle A 18 bzw. Tabelle A 19. Es wurde repräsentativ für alle 3 Matrices je ein Konzentrationslevel ausgewählt und die Homogenität anhand der analysierten Konzentration der Lipase FE-01 mittels LC-MS/MS bewertet. Die berechneten Mittelwerte der Lipasekonzentrationen in Becher 1-5 (Prüfung der Streuung zwischen den Kunststoffbechern) sowie Becher 6 (Prüfung der Streuung innerhalb eines Kunststoffbechers) wurden graphisch in Abbildung 33 dargestellt.

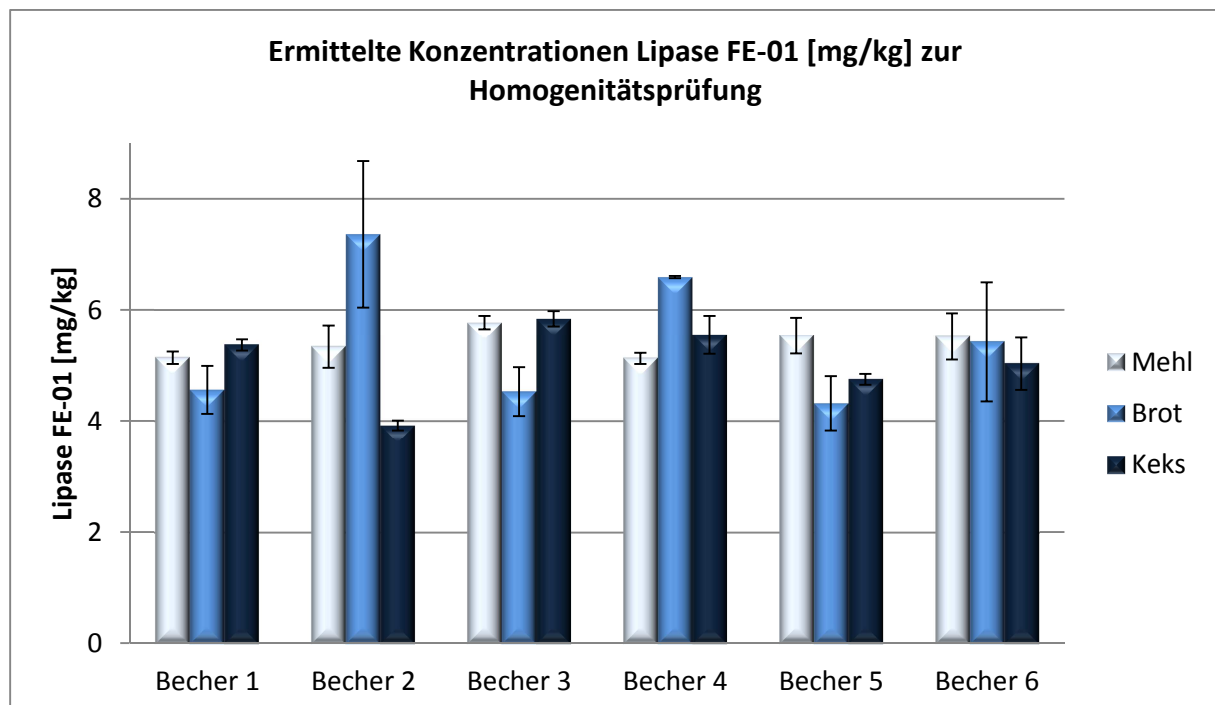


Abbildung 33: Ermittelte Konzentrationen Lipase FE-01 zur Homogenitätsprüfung

N=3 (Becher 1-5); N=6 (Becher 6); dargestellt sind die Mittelwerte sowie die Standardabweichungen der N-fachen Analyse

Die experimentellen Daten wurden mit Hilfe des Brown-Forsythe-Test (2.2.7.3) auf Homogenität der Varianzen geprüft. Sowohl innerhalb als auch zwischen den Kunststoffbechern konnte die Homogenität der Varianzen nachgewiesen werden (ermittelter Prüfwert kleiner Testwert der F-Tabelle). Es wird daher von einer ausreichenden Homogenität aller 3 Matrices ausgegangen.

Da die Produktion der Referenzmaterialien immer mit den gleichen Bedingungen und Geräten durchgeführt wurde, können keine gravierenden Unterschiede bezüglich der Homogenität zwischen den Konzentrationen vorhanden sein. Dennoch wurde die Homogenität repräsentativ an nur einem Konzentrationslevel je Matrix bestimmt, was bei der Bewertung der quantitativen Ergebnisse kritisch betrachtet werden sollte.

3.5 Nachweis der technischen Enzyme Fungamyl, Amylase TXL und Lipase FE-01 mittels LC-MS/MS-QTRAP

Die in 3.2 identifizierten Proteinsequenzen der Enzyme *alpha*-Amylase, Endo-1,4-Xylanase und Lipase wurden mit der Software Skyline theoretisch verdaut und mit einem positiven Testmaterial geeignete Peptide ausgewählt. Die chromatographische Trennung der Peptide wurde optimiert und die Spezifität der jeweiligen Enzyme geprüft. Der qualitative Nachweis der analysierten Enzyme in unbekanntem Proben wurde nach folgendem Schema umgesetzt (Abbildung 34).

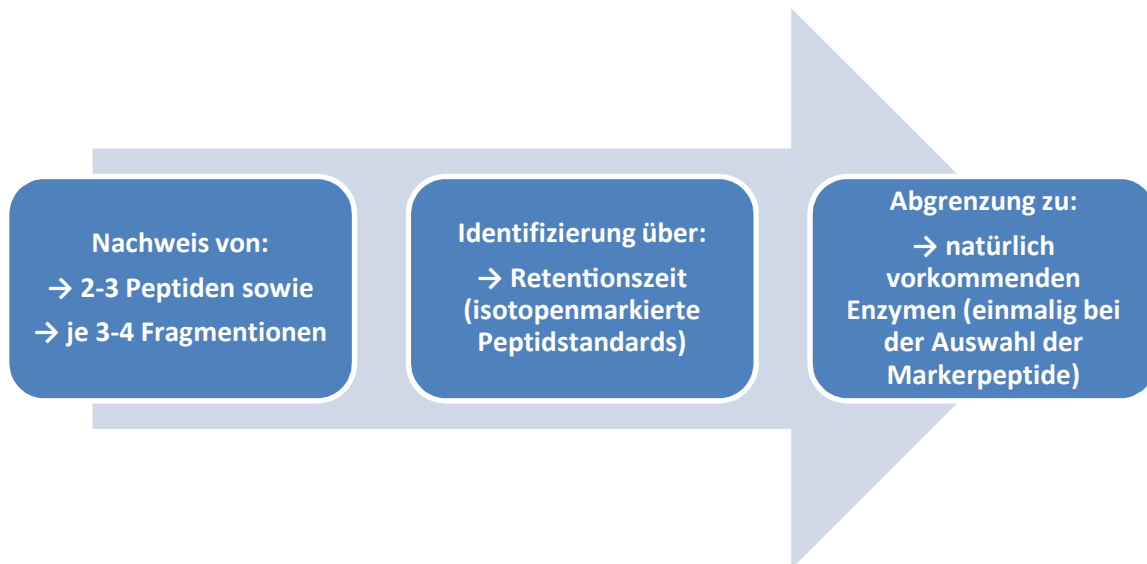


Abbildung 34: Identifikationsschema des qualitativen Nachweises technischer Enzyme in unbekanntem Proben

Da es keine Vorgaben über die notwendige Anzahl an nachzuweisenden Peptiden und Fragmentationen gibt, wurde in Anlehnung an Veröffentlichungen der Nachweis von zwei bis drei Peptiden mit jeweils drei bis vier Fragmentationen festgelegt [84, 114]. Bei den Peptiden handelt es sich um ausgesuchte Markerpeptide, die sowohl auf Sensitivität als auch Spezifität geprüft werden müssen. Dies ermöglicht den qualitativen und quantitativen Nachweis der im Spurenbereich eingesetzten Enzyme (Sensitivität) und verringert das Risiko falsch positiver Ergebnisse (Spezifität). Je höher die Anzahl der analysierten Peptide und Fragmentationen (γ - oder b -Ionen der spezifischen Peptide), desto höher ist die Evidenz für das Vorliegen des Enzyms im geprüften Produkt. Unter Mitführung isotopenmarkierter Peptidstandards können genaue Retentionszeiten der analysierten Peptide aufgenommen (Ansteigen der Masse ohne Veränderung der chemischen Eigenschaften) [174]. Die Zugabe isotopenmarkierter Peptide während der Extraktion führt zur verbesserten Kontrolle von Variabilitäten durch Antikörper, Chromatographie oder MS/MS [174]. Aufgrund matrixabhängiger Schwankungen der Retentionszeiten in der Proteinanalytik mittels LC-MS/MS ist das Mitführen isotopenmarkierter Peptidstandards ein bekanntes Hilfsmittel, was wiederum die Wahrscheinlichkeit falsch positiver Ergebnisse reduziert. Aufgrund des Vorkommens endogener Enzyme in der Matrix Getreide ist die Abgrenzung zu natürlich vorkommenden Enzymen von Bedeutung. Diese weisen häufig Ähnlichkeiten in der Aminosäuresequenz mit industriell erzeugten technischen Enzymen auf. Die Prüfung erfolgt während der Auswahl der Markerpeptide, indem mögliche Peptidsequenzen mit Proteindatenbanken verglichen und nur eindeutige (vorhanden im technischen jedoch nicht im natürlich vorkommenden Enzym) Peptidsequenzen ausgewählt werden.

3.5.1 Auswahl der Markerpeptide für die MRM-Messung

Es wurde ein theoretischer Verdau der identifizierten Proteinsequenzen mit der Software Skyline und den unter 2.2.5.1 genannten Einstellungen durchgeführt. Das Verdau-Enzym Trypsin schneidet nach den Aminosäuren Arginin und Lysin. Die dadurch entstehenden Peptide sind beispielhaft für das Enzym *alpha*-Amylase (*Aspergillus oryzae*) in Abbildung 35 markiert und wurden weiterhin theoretisch in MS/MS Fragmentmassen zerlegt. Aus den so erhaltenen Massenübergängen, die sich im messbaren Massenbereich des Massenspektrometers befinden sollten, wurde eine MRM-Methode erstellt. Es erfolgte die Analyse des hergestellten positiven Referenzmaterials mit der entwickelten Methode.

MMVAWWSLFLYGLQVAAPALAATPADWR **SQSIYFLTDR** FARTDGSTTATCNTADQKYCGGTWQGIIKLDYIQ
 GMGFTAIWITPVTAQLPQTTAYGDAYHGYWQQDIYSLNENYGTADDLK **ALSSALHER** GMYLMVDVVANHMGY
 DGAGSSVDYSVFKPFSSQDYFHPFCFIQNYEDQQTQVEDCWLGDNTVSLPDLDTTKDVVKNNEWYDWVGSLSVSNYSI
 DGLRIDTVKHVQK **DFWPGYNK** AAGVYCIGEVLDGDPAYTCPYQNVMDGVLNYPYPLLNAFKSTSGSMDDLYN
 MINTVKSDCPDSTLLGTFVENHDNPR **FASYNDIALAK** NVAAFIILNDGIPIYAGQEYHAGGNDPANR **EATWLS**
GYPTDSELYKLIASANAIRNYAISKDTGFVTYKNWPIYK DDTTIAMRK **GTDGSQIVTILSNK** GASGDSYTLSLSGAG
 YTAGQQLTEVIGCTTVTVGSDGNVPVPMAGGLPR **VLYPTEK** LAGSKICSSS

Abbildung 35: Theoretisch ermittelte Peptide des Enzyms *alpha*-Amylase

Es wurde von einem Verdau mit Trypsin ausgegangen sowie die Einstellungen unter 2.2.5.1 angewendet

Es zeigte sich, dass die Art der Matrix die Auswahl der intensivsten Markerpeptide nicht beeinflusst, daher wurde stellvertretend mit Mehl als Matrix des Positivmaterials gearbeitet, da es sich dabei um den Grundbestandteil aller geprüften Matrices (Mehl, Brot, Kekse) handelt. Die 2 bis 3 Peptide je Proteinsequenz mit der höchsten Intensität wurden als Markerpeptide für das jeweilige Enzym ausgewählt. Beispielhaft ist in Abbildung 36 die Auswahl der Peptide für das Enzym Lipase FE-01 dargestellt. Es konnten die Peptide SGTLVPVTR, LIVLSFR, GHDGFTSSWR sowie IHTNDIVPR mit jeweiligen Fragmentationen im Positivmaterial nachgewiesen werden. Da die Fragmente des Peptids LIVLSFR geringere Signalintensitäten zeigte, wurde dieses Peptid nicht weiter betrachtet. Analog wurde für die Auswahl der Peptide der anderen Enzyme verfahren. In Tabelle 35 sind die Markerpeptide für die Enzyme *alpha*-Amylase, Endo-1,4-Xylanase und Lipase für die LC-MS/MS-Messung aufgelistet. Für die selektierten Peptide wurde eine Optimierung der MS-Energien (*Declustering Potential* für das Markerpeptid und *Collision Energy* für das jeweilige Fragmention) durchgeführt. Die Auflistung der Massenübergänge aller Markerpeptide und Fragmente sowie die optimierten MS-Energieeinstellungen sind in Tabelle A 23 (Anhang) notiert.

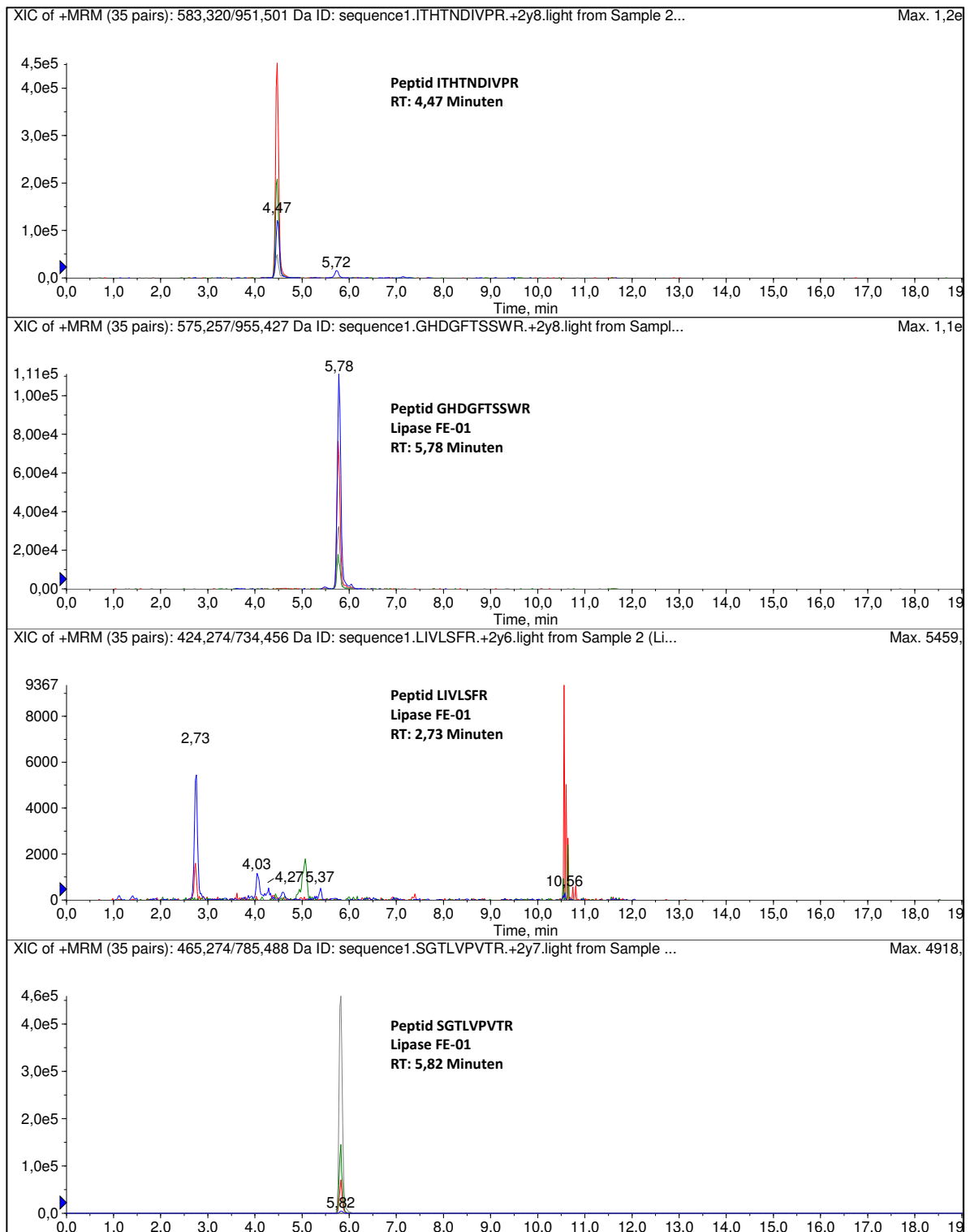


Abbildung 36: Darstellung der MRM-Übergänge von Lipase im Chromatogramm der LC-MS/MS-Messung

Matrix: Referenzmaterial Mehl; Konzentration: 7,42 mg/kg; y-Achse: Intensität in cps; x-Achse: Retentionszeit (RT) in Minuten; dargestellt sind die Fragmentationen des jeweiligen Peptids

Tabelle 35: Ausgewählte Markerpeptide der Enzyme durch Messung positiver Testmaterialien

z: Peptidladung

| Enzym | Aminosäuresequenz des Markerpeptids | Molekulargewicht [g/mol] | Ladung [z] |
|-----------------------------|--|--------------------------|------------|
| <i>alpha</i>-Amylase | NWPIYK | 821,4 | 2 |
| | ALSSALHER | 994,4 | 3 |
| | DTGFVTYK | 938,3 | 2 |
| Endo-1,4-Xylanase | GWNPGLNAR | 985,4 | 2 |
| | TSGTVQTGCHFDAWAR | 1749,2 | 3 |
| Lipase | SGTLVPVTR | 930,6 | 2 |
| | GHDGFTSSWR | 1160,5 | 2 |
| | ITHTNDIVPR | 1177,4 | 2 |

Die ausgewählten Markerpeptide bestehen aus mindestens sechs Aminosäuren. Laut Literaturangaben sind keine Mindestlängen der Aminosäuresequenz für die Auswahl von Markerpeptiden bekannt. Die sich aus der Kombination der Art der Aminosäuren, der Aminosäuresequenzlänge sowie der Peptidladung ergebende Molekülionenmasse muss in einem definierten Massenfenster (kleiner $m/z = 400$ nicht spezifisch; größer $m/z = 1250$ für das genutzte MS nicht messbar) liegen. Es ist daher möglich, dass auch ein Peptid mit einer sehr kurzen Aminosäuresequenz (z.B. *alpha*-Amylase, Peptid NWPIYK mit 6 Aminosäuren) als Markerpeptid geeignet sein kann. Je kleiner die Aminosäuresequenz ist, desto wahrscheinlicher ist das Vorkommen des Peptids in anderen Proteinsequenzen. Daher sollten nach Möglichkeit Peptide mit längerer Aminosäuresequenz gewählt werden. Aufgrund der durch das Verdauenzym festgelegten Schnittstellen ist dies jedoch nicht immer möglich. Bei Verwendung kleiner Peptide sollte die Spezifität besonders kritisch geprüft werden.

Das Molekulargewicht der ausgewählten Peptide beträgt mehr als 800 g/mol und schließt Störungen der Analyse durch die Anwesenheit vieler kleiner organischer Moleküle (Alkohole, Amine, Organometallverbindungen, usw.) im niedrigeren Massenbereich aus [175, 176]. Als weiteres Sicherheitskriterium dient die Information der Ladung des Peptids. So ist es möglich entstehende Massenübergänge, die nicht von dem gesuchten Peptid stammen, durch das Fehlen der Ladung auszuschließen. Die synthetischen Peptidstandards wurden im Zuge einer Eingangskontrolle überprüft und die Ladung kontrolliert (2.2.5.4). Von der Verwendung 4-fach (oder höher) geladener Peptide raten die Hersteller der Massenspektrometer ab. Diese Peptide (wenn kurze Aminosäuresequenz) geraten entweder in den Massenbereich unter $m/z = 400$ und sind damit nicht ausreichend spezifisch oder sind zu groß (wenn lange Aminosäuresequenz) um den Ionisierungsprozess erfolgreich zu überstehen (zerfallen schon häufig vor dem Zugang zu den Quadrupolen).

3.5.2 Chromatographische Trennung der Markerpeptide

Es wurde eine Gradienten-HPLC-Methode entwickelt, die eine optimale Trennung der Markerpeptide und eine bestmögliche Sensitivität der analysierten Massenübergänge ermöglicht. Exemplarisch sind in Abbildung 37 jeweils das intensivste Markerpeptid der untersuchten Enzyme dargestellt.

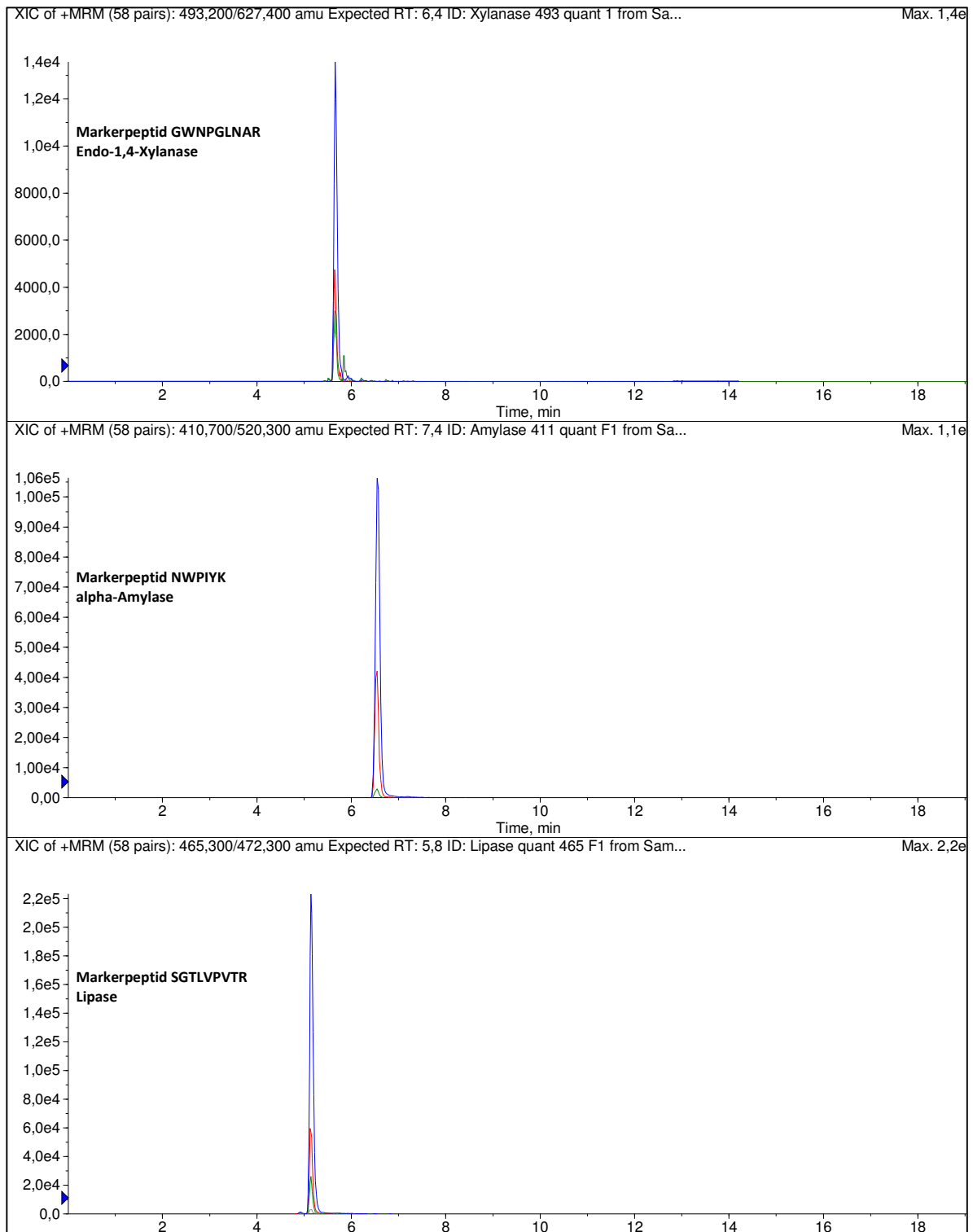


Abbildung 37: Chromatogramm der Fragmentationen der Markerpeptide

Markerpeptide in Lösung; Konzentration: 0,01 mg/kg; y-Achse: Intensität in cps; x-Achse: Retentionszeit in Minuten; dargestellt sind die Fragmentationen des jeweiligen Peptids

Die ausgewählten technischen Enzyme sind eindeutig mit einer Messzeit von weniger als 20 Minuten (siehe Anhang Tabelle A 23) qualitativ bestimmbar. Es erfolgt die Identifikation über 2 (Endo-1,4-Xylanase) bzw. 3 (*alpha*-Amylase, Lipase) ausgewählte Peptide mit je 3 (Endo-1,4-Xylanase, *alpha*-Amylase) bzw. vier (Lipase) Massenübergängen. Zusätzlich dient die Retentionszeit als Identifikationsmerkmal, da sie durch die Zugabe isotonenmarkierter Peptidstandards zu jeder Probe

eindeutig und matrixunabhängig bestimmt werden kann. Ursachen sind die zu den analysierten Peptiden nahezu identischen chemischen Eigenschaften und massenspektrometrischen Fragmentierungsmuster der isotopenmarkierten Peptide. Fehler die durch Variationen in der Probenvorbereitung (z.B. auch durch Verwendung anderer Matrices) oder durch MS-Bedingungen verursacht werden, können durch die Nutzung isotopenmarkierter Peptidstandards ausgeglichen werden [154].

Exemplarisch ist die Übereinstimmung der Retentionszeiten der Markerpeptide des Enzyms Lipase FE-01 mit den zugehörigen isotopenmarkierten Standards in Abbildung 38 dargestellt. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl das Peptid SGTLPVTR als auch das zugehörige isotopenmarkierte Peptid zur Retentionszeit 5,62 Minuten analysiert wurden. Eine Abweichung ist maximal in der zweiten Nachkommastelle der Retentionszeit tolerierbar. Für alle weiteren Peptide wurde die zeitliche Übereinstimmung der Retention mit dem isotopenmarkierten Peptid ebenfalls erfolgreich geprüft.

Die Anzahl der gemessenen Datenpunkte je Peak wurde auf ein Minimum von 15 festgelegt, sodass eine Quantifizierung über die Peakfläche möglich war.

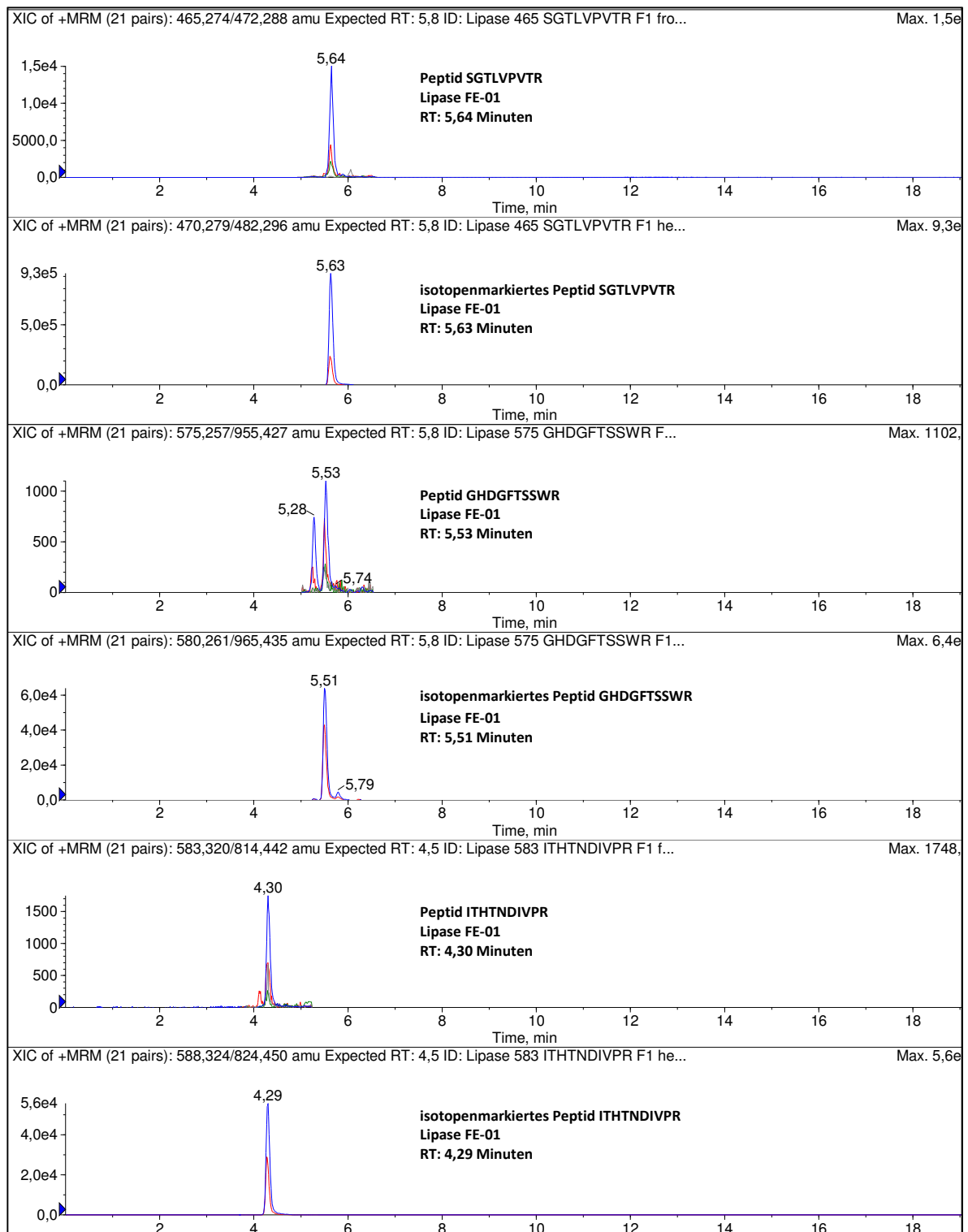


Abbildung 38: Darstellung der Retentionszeiten von Peptid und isotopenmarkiertem Peptid

Matrix: Referenzmaterial Mehl; Konzentration: 5,4 mg/kg; y-Achse: Intensität in cps; x-Achse: Retentionszeit (RT) in Minuten; dargestellt wurden beispielhaft die Markerpeptide des Enzyms Lipase FE-01 mit den jeweiligen Fragmenten

3.5.3 Prüfung der Massenübergänge der Markerpeptide

Im Zuge des Validierungsverfahrens wurden die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen der Enzyme für die entwickelte LC-MS/MS-Methode ermittelt (3.6.4). Da für den qualitativen Nachweis sowohl das Vorhandensein von jeweils zwei bis drei Peptiden sowie je drei bis vier Massenfragmenten Bedingung war, (Abbildung 34) wurden die Massenübergänge dahingehend überprüft, dass alle

Massenfragmente auch an der Bestimmungsgrenze messbar waren. Exemplarisch sind alle ausgewählten Markerpeptide sowie Fragmentationen des jeweiligen Enzyms für die Matrix Mehl an der Bestimmungsgrenze in Abbildung 39 bis Abbildung 41 dargestellt. Die Überprüfung, dass alle Massenübergänge an den Bestimmungsgrenzen der getesteten Matrices (Mehl, Brot, Keks) ein eindeutiges Signal zeigen, wurde mit positivem Ergebnis durchgeführt.

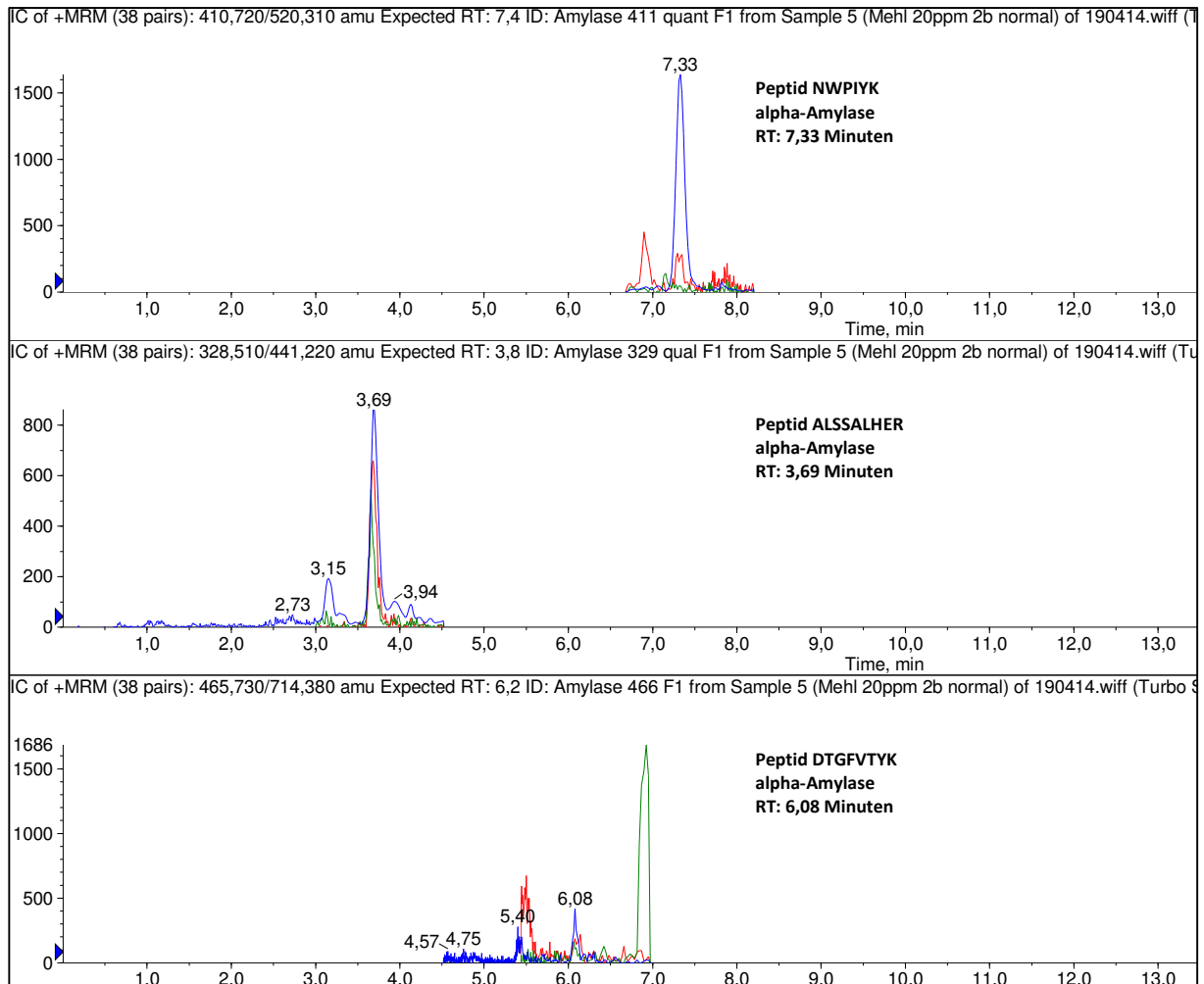


Abbildung 39: Markerpeptide des Enzyms *alpha*-Amylase an der Bestimmungsgrenze

Matrix: Referenzmaterial Mehl; Konzentration: 2,58 mg/kg; y-Achse: Intensität in cps; x-Achse: Retentionszeit (RT) in Minuten; dargestellt wurden die Markerpeptide des Enzyms *alpha*-Amylase mit den jeweiligen Fragmentationen

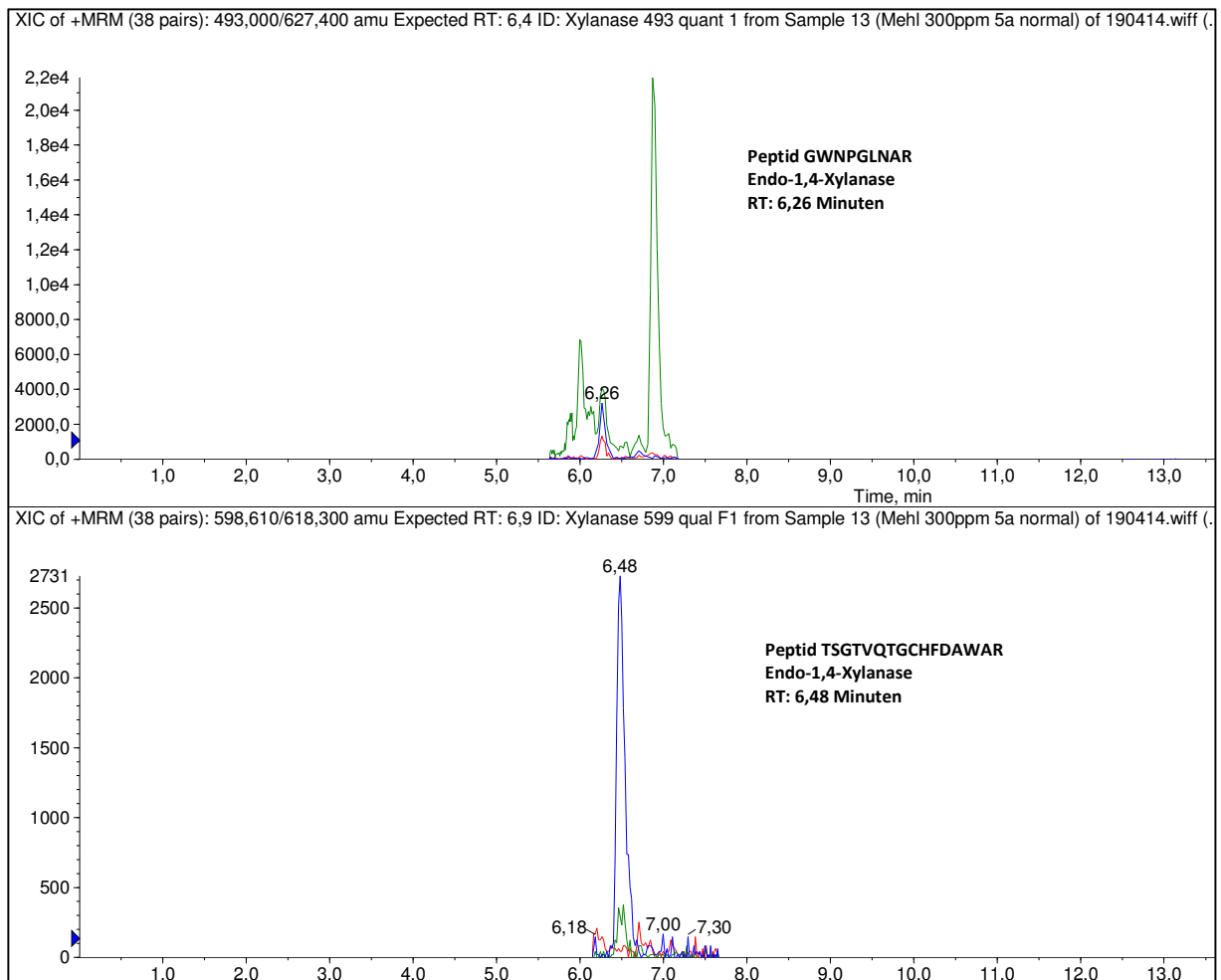


Abbildung 40: Markerpeptide des Enzyms Endo-1,4-Xylanase an der Bestimmungsgrenze

Matrix: Referenzmaterial Mehl; Konzentration: 15,60 mg/kg; y-Achse: Intensität in cps; x-Achse: Retentionszeit (RT) in Minuten; dargestellt wurden die Markerpeptide des Enzyms Endo-1,4-Xylanase mit den jeweiligen Fragmentationen

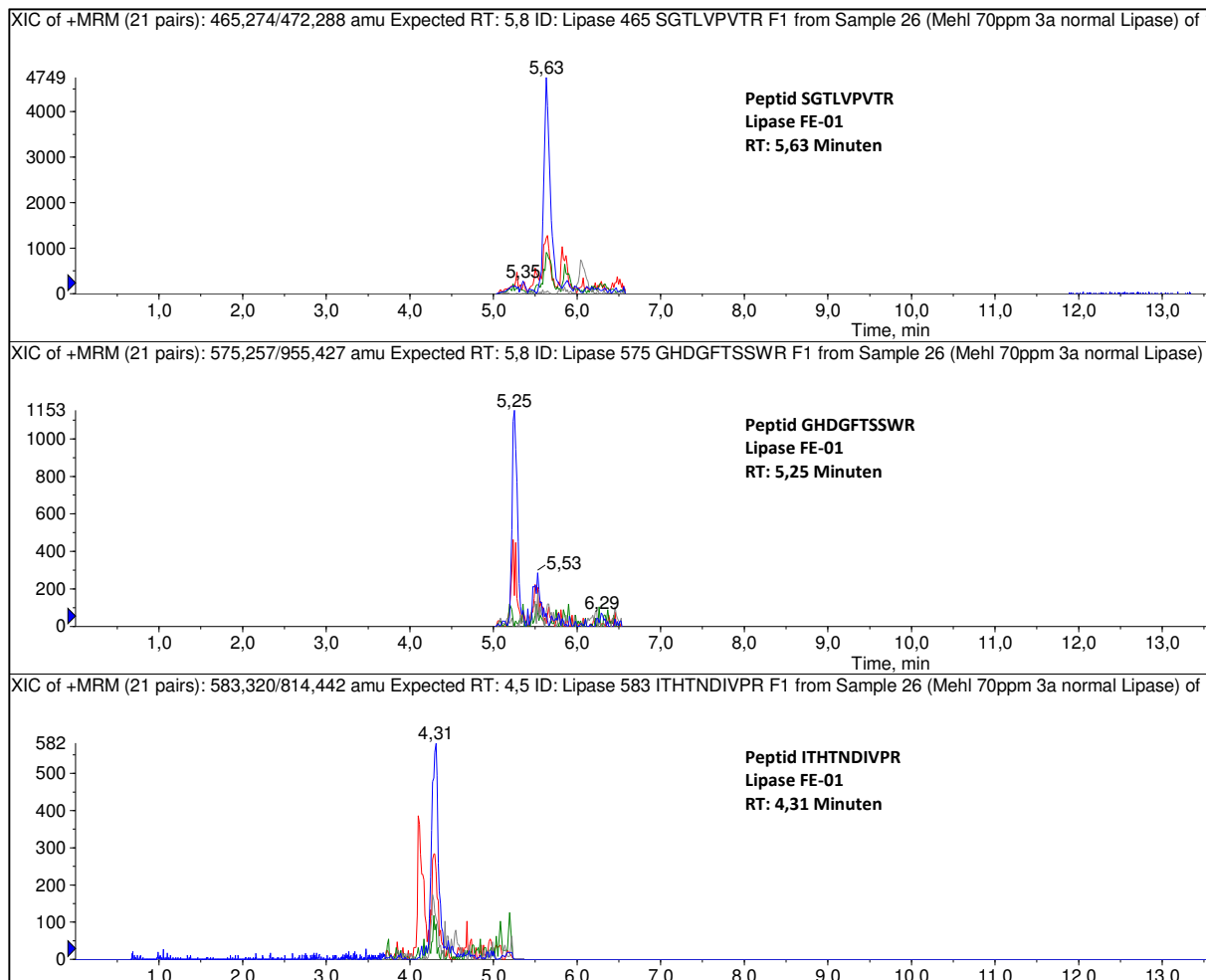


Abbildung 41: Markerpeptide des Enzyms Lipase an der Bestimmungsgrenze

Matrix: Referenzmaterial Mehl; Konzentration: 1,26 mg/kg; y-Achse: Intensität in cps; x-Achse: Retentionszeit (RT) in Minuten; dargestellt wurden die Markerpeptide des Enzyms Lipase mit den jeweiligen Fragmentionen

Weiterhin wurden die Ionenverhältnisse der verschiedenen gemessenen MRM-Massenübergänge aufgenommen und betrachtet. In der Literatur sind keine Anforderungen für Schwankungen der definierten Verhältnisse für die Proteinanalytik mittels LC-MS/MS bekannt. Daher wurde auf die Anforderungen der Pestizidanalytik zugegriffen, da diese ebenfalls mit LC-MS/MS analysiert werden. Im Dokument SANCO/12571/2013, welches sowohl Qualitäts- als auch Validierungskriterien für die Pestizidanalytik beschreibt, ist eine maximale relative Toleranz der Ionenverhältnisse bei der Messung mit LC-MS/MS von 30 % festgelegt [177]. Die Variabilität der Ionenverhältnisse sollte laut SANCO/12571/2013 vorzugsweise aus Kalibrierungsstandards bei der Methodvalidierung und anschließend während der routinemäßigen Analyse bestimmt werden. In Tabelle 36 sind die ermittelten und festgelegten Ionenverhältnisse (Peakhöhe Fragment 1 dividiert durch Peakhöhe Fragment 2, 3 oder 4) der etablierten LC-MS/MS-Methode zum Nachweis technischer Enzyme zusammengefasst.

Tabelle 36: Übersicht der festgelegten Ionenverhältnisse der MRM-Massenübergänge

IV: Ionenverhältnis; MÜ: Massenübergang; F: Fragment

| Bezeichnung MÜ | IV | Bezeichnung MÜ | IV | Bezeichnung MÜ | IV |
|-----------------------|------|----------------------|------|---------------------|-----|
| Xylanase 493 quant F1 | 1,0 | Xylanase 599 qual F1 | 1,0 | | |
| Xylanase 493 quant F2 | 2,4 | Xylanase 599 qual F2 | 20,8 | | |
| Xylanase 493 quant F3 | 0,9 | Xylanase 599 qual F3 | 16,6 | | |
| Amylase 411 quant F1 | 1,0 | Amylase 329 qual F1 | 1,0 | Amylase 466 qual F1 | 1,0 |
| Amylase 411 quant F2 | 7,6 | Amylase 329 qual F2 | 2,2 | Amylase 466 qual F2 | 2,5 |
| Amylase 411 quant F3 | 42,1 | Amylase 329 qual F3 | 1,9 | Amylase 466 qual F3 | 3,7 |
| Lipase 465 quant F1 | 1,0 | Lipase 575 qual F1 | 1,0 | Lipase 583 qual F1 | 1,0 |
| Lipase 465 quant F2 | 3,8 | Lipase 575 qual F2 | 1,6 | Lipase 583 qual F2 | 2,5 |
| Lipase 465 quant F3 | 5,9 | Lipase 575 qual F3 | 2,5 | Lipase 583 qual F3 | 9,1 |
| Lipase 465 quant F4 | 65,1 | Lipase 575 qual F4 | 7,0 | Lipase 583 qual F4 | 4,5 |

Die Verhältnisse wurden während der Validierung der Methode an KP4 festgelegt und mit den Ionenverhältnissen anderer Kalibrierpunkte sowie Proben der Referenzmaterialien abgeglichen. Es wurde geprüft ob das Maximum der Schwankungen der Ionenverhältnisse von 30 % eingehalten wurde. In Tabelle 37 sind die Schwankungen der Ionenverhältnisse am Beispiel der Lipasebestimmung im Referenzmaterial Keks dargestellt. Die Rohdaten befinden sich im Anhang Tabelle A 24.

Tabelle 37: Ermittelte Schwankungen der Ionenverhältnisse der MRM-Massenübergänge

N=3; es wurde beispielhaft das Enzym Lipase (Probe 3 und 4 der Matrix Mehl) betrachtet; IV: Ionenverhältnis; F: Fragment

| Probe 3 | IV Soll | IV Ist | Schwankung [%] |
|---------------------|---------|--------|----------------|
| Lipase 465 quant F2 | 3,8 | 3,9 | 2.7 |
| Lipase 465 quant F3 | 5,9 | 7,0 | 19.4 |
| Lipase 465 quant F4 | 65,1 | 69,1 | 6.2 |
| Lipase 575 qual F2 | 1,6 | 1,5 | 3.3 |
| Lipase 575 qual F3 | 2,5 | 2,0 | 18.4 |
| Lipase 575 qual F4 | 7,0 | 6,8 | 2.9 |
| Lipase 583 qual F2 | 2,5 | 2,3 | 6.7 |
| Lipase 583 qual F3 | 9,1 | 8,0 | 11.4 |
| Lipase 583 qual F4 | 4,5 | 4,0 | 12.9 |
| Probe 4 | IV Soll | IV Ist | Schwankung [%] |
| Lipase quant 465 F2 | 3,8 | 3,8 | 0.7 |
| Lipase quant 465 F3 | 5,9 | 7,4 | 26.3 |
| Lipase quant 465 F4 | 65,1 | 60,0 | 7.8 |
| Lipase 575 qual F2 | 1,6 | 1,4 | 13.0 |
| Lipase 575 qual F3 | 2,5 | 2,2 | 12.0 |
| Lipase 575 qual F4 | 7,0 | 5,7 | 18.0 |
| Lipase 583 qual F2 | 2,5 | 2,2 | 10.2 |
| Lipase 583 qual F3 | 9,1 | 8,0 | 11.6 |
| Lipase 583 qual F4 | 4,5 | 4,0 | 12.3 |

Es konnte gezeigt werden, dass gemäß den Forderungen laut SANCO die Schwankungen der Ionenverhältnisse in den Keksproben (Lipase) kleiner als 30 % waren (Tabelle 37). Die Auswertung der Schwankungen der Ionenverhältnisse wurde nicht weiter dargestellt, es waren jedoch alle Ionenverhältnisse der Validierungsproben im erforderlichen Bereich. Die Auswertung der Ionenverhältnisse ist ein Qualitätsparameter für die qualitative Analyse und verhindert vor allem bei matrixbedingten Änderungen der MRM-Massenübergänge die Ermittlung falsch positiver Ergebnisse. Durch den Einfluss von Bestandteilen in der Matrix, die nicht vom Enzym stammen, werden die Fragmentverhältnisse verändert und damit für die Analytik zweifelhaft. Ursache dieser Änderung ist die Tatsache, dass es sich möglicherweise nicht um ein Peptid handelt und daher ein anderes Fragmentspektrum (damit auch die Verhältnisse der verschiedenen Fragmentionen einer Molekülmasse) entsteht. Mit Hilfe von speziellen quantitativen Analysen, wie z.B. der Quantifizierung mittels Standardaddition, würden diese Matrixpeaks bei Dotierung des Extraktes mit dem eigentlichen Peptid nicht wachsen und daher als „Blindpeaks“ identifiziert werden. Durch den Abgleich der Ionenverhältnisse mit den Sollwerten der Peptidfragmente kann meist auf Standardaddition verzichtet werden, da die veränderten Istwerte bereits auf Matrixeffekte hindeuten.

3.5.4 Abgrenzung zu natürlich vorkommenden Enzymen bzw. anderen Proteinen

Die Spezifität der ausgewählten Markerpeptide wurde mit Hilfe eines umfangreichen Datenbankabgleichs (BLAST, UniProtKB/Swiss-Prot) geprüft. Die Proteinsequenzen der technischen Enzyme unterscheiden sich sowohl von den natürlich vorkommenden Enzymen als auch von anderen Proteinen. Bei den zum Teil vorhandenen Sequenzhomologien handelt es sich um identische Proteine (Nomenklatur). Weiterhin gibt es Sequenzen die anteilig homolog sind und nicht das gleiche ausgewählte Peptid besitzen (Abbildung 42). Alle ausgewählten Markerpeptide wurden auf ihre Spezifität geprüft (Tabelle 38). Abbildung 43 zeigt den Sequenzabgleich des technischen Enzyms *alpha*-Amylase (*Aspergillus oryzae*) mit der natürlich vorkommenden *alpha*-Amylase aus Weizen.

Tabelle 38: Übersicht der Ergebnisse des Datenbankabgleichs der Markerpeptide

Es wurde die Datenbank UniProtKB/Swiss-Prot verwendet; Sequenz unterstrichen: In 3.2 identifizierte Proteinsequenz

| Peptidsequenz | Uni Prot ID | Ergebnis Blast | Spezifität |
|-----------------|-------------------------|---|-------------------|
| NWPIYK | Q02905 | <i>alpha</i> -Amylase (<i>Aspergillus awamori</i>) | ✓ (Unterarten) |
| ALSSALHER | P30292 | <i>alpha</i> -Amylase (<i>Aspergillus shirousami</i>) | ✓ (Unterarten) |
| | Q02906 | <i>alpha</i> -Amylase (<i>Aspergillus awamori</i>) | ✓ (Unterarten) |
| | <u>POC1B4</u> | | |
| DTGFVTYK | POC1B3 | <i>alpha</i> -Amylase (<i>Aspergillus oryzae</i>) | ✓ (Unterarten) |
| | | <i>alpha</i> -Amylase (<i>Aspergillus oryzae</i>) | ✓ (Unterarten) |
| GWNPGLNAR | P81536 | Peptidsequenz nicht 100 % identisch (Aminosäureaustausch) | ✓ |
| TSGTVQTGCHFDWAR | <u>O43097</u> | Peptidsequenz nicht 100 % identisch (Aminosäureaustausch) | ✓ |
| SGTLVPVTR | <u>O59952</u> Q3B121 | Lipase (<i>Thermomyces lanuginosus</i>) und Ribosomal RNA small subunit methyltransferase H | ✓ |
| GHDGFTSSWR | <u>O59952</u> | Lipase (<i>Thermomyces lanuginosus</i>) | ✓ |
| ITHTNDIVPR | <u>O59952</u> | Lipase (<i>Thermomyces lanuginosus</i>) | ✓ |

```

Lipase technisch (O59952)      1 .....-MRSSLVLFVSAW TALASPIRR 22
BLAST Hit (Q3B121)           1 MPRSPDSYHDPVLLHECVDALVRGPGLYVDGTLGGGGHSMALRALESGGWLEGSLLVGI 60

Lipase technisch (O59952)     23 EVSQD-LFNQFNLFAYSAAYC-----GKNNDAPAGTNITCTGNACP 64
BLAST Hit (Q3B121)           61 DQDDEALHEAGSRLAAYPGRAVAVKGNFQDIARLASREAVQKGLEPRARAILLDLGVSSR 120

Lipase technisch (O59952)     65 EVEKADATFLYSFED-----SGVGDVTGFLALDNTNKLIVLSFRGSRSIENWIGNLN 116
BLAST Hit (Q3B121)           121 QIDRAERGFPSYMR TGPLDMRMDSSASTTAADILNDADERELAAIFFRYGEEPR----- 173

Lipase technisch (O59952)    117 FDLKEINDICSGCRGHDGFTSSWRSVADTLRQKVEDAVREHPDYRVVFTGHSLG--GAL 174
BLAST Hit (Q3B121)           174 --SRAIARAVIAARMKHGCLSSSTEDLADIVRSVYHGROPSIRLSRVVFOALRIAVNRELD 231

Lipase technisch (O59952)    175 ----TVAGADLRGNGYDIDVFSYGAPRVGNRAFAEFLVQTGGTLRYITHTNDIVPRLP 229
BLAST Hit (Q3B121)           232 VLQRVLEDGVSVLDEGGRIAVISYHSL--EDRMVKQYFAAQ-----S 271

Lipase technisch (O59952)    230 PREFYSHSSPEYWIKSGTLVPVTRNDIVKIEGI-----DATGGNNQPN 274
BLAST Hit (Q3B121)           272 KCDWCPKGVGLREPLSRGTLVPVTRKAVVASDEVRVNPRSRSAKLRVAEKTGGVQ---- 327

Lipase technisch (O59952)    275 PDIPAHLWYFGLIGTCL
BLAST Hit (Q3B121)           .....
    
```

Abbildung 42: Abgleich der Sequenz des Enzyms Lipase (*Thermomyces lanuginosus*) mit RSMH_CHLL7 (Ribosomal RNA small subunit methyltransferase H)

BLAST-Hit Q3B121 des Markerpeptids SGTLVPVTR


```

alpha-Amylase technischPOC1B3 1 MMVAWWSLFYGLQVAAPALAAPADWRSQSIFLLTDRFARTDGSSTATCTADQKCYCGGTWQGIIDKLDYIQG 76
alpha-Amylase WeizenP08117 1 --MGKHSATLCLLVYVLCASSLA---QAQILF-----QGFNWESWKTGGWYKFMQCKVEEIAS 56

alpha-Amylase technischPOC1B3 76 MGFTAIWITVYTAQLPQTAYGDAYHGYWQDDIYSLNENYGTADDLKASSALHERGMYLMDVYANHMGYDGAG 150
alpha-Amylase WeizenP08117 57 TGATHVWLPPPSQSV-----SPEGYLPGQLYNLNSKYGSGADLKSLIQAFRGKNISCVADIINHRCADKKD 123

alpha-Amylase technischPOC1B3 151 S SVDYSVFKPFSSQDYFH---PFCFIQ-NYEDQTQVEDCWLGDNTVSLPDLDTTKDVVKNEWYDWVGSLVSNYS 220
alpha-Amylase WeizenP08117 124 GRGVYCIFEEGGTSDNRLDWGPDEICSDDTKYSNGR--GHRDTGGGFDAAPDIDHLNPRVQRELSAWLNWLKTDLG 196

alpha-Amylase technischPOC1B3 221 IDGLRIDTVKHVQKDFWPGYN-KAAGVYCIGEVLDGDPAYTCPYQNVMDGV--LNYPIYYPLLNAFKSTSSMD 291
alpha-Amylase WeizenP08117 197 FDGWRLDFAKGYSAAMAKIYVDNSKPAFVVGELYDRDRQLLANWVRGVGGPATAFDFPTKGVLQEAVQGDLGRMR 271

alpha-Amylase technischPOC1B3 292 DLYNMINTVKSDCPDSTLLGTFVENHDNPR--FASYNDIALAKNVAAFILNDGIPIYAGQEQHYAGGNDPA 363
alpha-Amylase WeizenP08117 272 GSDGKAPGMIGWMPEK--TVTFIDNHDTGSTRQLWPPPSDK--VMQGYAYLTHPGIPCFYDHVFD----- 334

alpha-Amylase technischPOC1B3 364 NREATWLSGYPDSELYKLIASANAIRNYAISKDTGFVTYKNWPIYKDDTTIAMRKGTDSSQIVTILSNKASGD 438
alpha-Amylase WeizenP08117 335 .....WKLKQEITALATVRSRNGIHPOSTLDILKAEDD 367

alpha-Amylase technischPOC1B3 439 SYTLSLSCA-----GYTAGQQLTEVIGCTTVYVGSDGNVPPVMAGGLPRVLYPTEKLASKISSS---- 499
alpha-Amylase WeizenP08117 368 LYVAKIGGKVITKIGSRYNIGDNIVIP---SGFKIAA-----KNNYVWEKSGL 413

```

Abbildung 43: Abgleich der Sequenz der technischen *alpha*-Amylase (*Aspergillus oryzae*) mit der *alpha*-Amylase (*Triticum aestivum*)

Im Fall der *alpha*-Amylase gab es Probleme bezüglich der Datenbanknomenklatur. Es wurde davon ausgegangen, dass es sich bei den genannten *alpha*-Amylasen (*Aspergillus awamori*, *Aspergillus shirousami*, *Aspergillus oryzae*) um den gleichen Organismus, aber eine mehrfache Namensvergabe bzw. Unterarten handelt. Die in Abbildung 43 gegenübergestellten Aminosäuresequenzen der analysierten *alpha*-Amylase mit der *alpha*-Amylase aus Weizen zeigt, dass es sowohl homologe als auch inhomologe Bereiche gibt. Jenachdem welche Peptide ausgewählt werden, kann es zu Übereinstimmungen der Aminosäuresequenz zwischen natürlichem und industriell produziertem Enzym kommen. Die ausgewählten Markerpeptide der *alpha*-Amylase befinden sich ausschließlich in inhomologen Sequenzbereichen und schließen damit einen Nachweis der natürlichen Weizenamylase aus. Dies wurde durch die Ergebnisse des Datenbankabgleichs mittels BLAST bestätigt (Tabelle 38).

Bei der Endo-1,4-Xylanase wurde das Peptid GWNPGLNAR in einer weiteren Sequenz nachgewiesen. Da zur qualitativen Bestätigung alle ausgewählten Markerpeptide vorhanden sein müssen, ist die Spezifität des Nachweises der Endo-1,4-Xylanase dennoch gegeben. Bei den ausgewählten Markerpeptiden der Lipase wurde das Peptid SGTLVPVTR bis auf die erste Aminosäure Serin in einer weiteren Proteinsequenz nachgewiesen (*Ribosomal RNA small subunit methyltransferase H*) (Abbildung 42). Aufgrund der nicht zu 100 % vorliegenden Sequenzhomologie kommt es zur Bildung anderer Molekülonen- sowie Fragmentionenmassen aus dem genannten Markerpeptid der Lipase. Das Protein *Ribosomal RNA small subunit methyltransferase H* würde somit nicht nachgewiesen werden. Sowohl das Peptid SGTLVPVTR als auch die weiteren ausgewählten Markerpeptide der Lipase zeigen eine ausreichende Spezifität, sodass falsch positive Ergebnisse ausgeschlossen sind. Die Spezifität für die Zuordnung der Markerpeptide zu den Proteinsequenzen konnte gesichert werden. Auch die beiden kleinen Peptide (NWPIYK und DTGFVTYK) mit einer Sequenzlänge von 6 bzw. 7 Aminosäuren konnten in keiner weiteren Sequenz der genutzten Proteindatenbank nachgewiesen werden. Die Auswahl der Datenbank zur Recherche der zugehörigen Proteinsequenzen sollte immer kritisch betrachtet werden. Einige Datenbanken lassen gewisse Einstellungen nicht zu und führen dadurch zu unterschiedlichen Ergebnissen. Die fehlende tryptische Spaltung von Lysin nach Prolin kann in einigen Datenbanken nicht eingestellt werden, sodass es zu unterschiedlichen Ergebnissen bei der Datenbankrecherche kommen kann [178]. Für die Zukunft sollten weitere Datenbanken in die Recherche mit einbezogen werden. Die Absicherung des Nachweises von zwei bis drei Peptiden (mit je drei bis vier Fragmentionen) je Enzym schafft die

Sicherheit falsch positive Ergebnisse zu reduzieren, da z.B. der Einfluss durch die Probenmatrix (Vorhandensein von „Blindpeaks“ mit Massenübergängen der Peptidfragmente) mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht mehrere Peptide gleichzeitig betreffen wird.

3.5.5 Quantitative Bestimmung der technischen Enzyme

Die quantitative Bestimmung der technischen Enzyme Fungamyl, Amylase TXL und Lipase FE-01 mittels der entwickelten LC-MS/MS-Multimethode wurde in einem Methoden-Validierungsverfahren geprüft. Vorherige Ergebnisse zeigten, dass das technische Enzym Fungamyl aus den beiden Enzymen *alpha*-Amylase (*Aspergillus oryzae*) und Endo-1,4-Xylanase (*Thermomyces lanuginosus*) besteht (3.2.1). Die *alpha*-Amylase (*Aspergillus oryzae*) konnte in Abschnitt 3.2.3 eindeutig im technischen Enzym Amylase TXL nachgewiesen werden. In dem technischen Enzym Lipase FE-01 wurde die Lipase (*Thermomyces lanuginosus*) identifiziert (3.2.2). In der entwickelten LC-MS/MS-Multimethode mussten nachfolgend somit die 3 Enzyme *alpha*-Amylase, Endo-1,4-Xylanase sowie Lipase quantitativ bestimmt werden.

Für die Quantifizierung wurde das jeweils intensivste Massenfragment der Markerpeptide des jeweiligen Enzyms (Tabelle 35; *alpha*-Amylase: NWPIYK, Xylanase: GWNPGLNAR, Lipase: SGTLPVTR) ausgewählt. Es wurde eine Lösungsmittel-Kalibrierreihe mit den synthetisch hergestellten Markerpeptiden analysiert und die Enzymkonzentration der Referenzmaterialien durch Umstellung der erhaltenen Geradengleichung berechnet. Als interner Standard wurde ein spezifisches Peptid der Amylase (*Bacillus licheniformis*) ausgewählt. Zusätzlich wurden die isotope markierten Markerpeptide zur Extraktion zugegeben, was eine eindeutige Zuordnung der Retentionszeit der einzelnen Markerpeptide ermöglichte (siehe 3.5.2). Das Validierungsverfahren soll abschließend prüfen, ob die quantitativen Anforderungen (siehe Kriterien der Validierung 2.2.6) der Methode erfüllt werden. In diesem Zusammenhang wurden weiterhin verschiedene Möglichkeiten der Quantifizierung (Matrix-Kalibrierung, Standardaddition, isotope markierte Peptide als interner Standard) geprüft. Der Vergleich verschiedener Quantifizierungsmethoden auf die Effizienz der Methode wurde über den Parameter Richtigkeit durchgeführt. Die ermittelten Wiederfindungsraten der entwickelten Methode (Quantifizierung über Standardkalibriergerade und Internes-Standardpeptid) wurden mit den Wiederfindungsraten aus weiteren Möglichkeiten der Quantifizierung (Matrix-Kalibrierung 2.2.5.7, Standardadditionsverfahren 2.2.5.6, Quantifizierung über isotope markierten Standard als interner Standard 2.2.5.7) verglichen und im nächsten Kapitel (3.6.3.3 bis 3.6.3.5) diskutiert.

3.6 Validierung der LC-MS/MS-Multimethode zum quantitativen Nachweis der technischen Enzyme Fungamyl, Amylase TXL und Lipase FE-01

Im Zuge der Validierung wurden die Eigenschaften der Methode geprüft. Hierzu gehörten sowohl die Linearität, Präzision, Spezifität und Selektivität als auch die Ermittlung der Nachweis- und Bestimmungsgrenzen der eingesetzten Matrices (Mehl, Brot und Keks). Zur Prüfung der quantitativen Genauigkeit der Methode wurden die Konzentrationen der hergestellten Referenzmaterialien (2.2.4) berechnet und die Wiederfindungsraten ermittelt (Richtigkeit). Anhand dieser Ergebnisse sowie deren statistischer Auswertung wurden die Validierungskriterien (Tabelle 28) geprüft und die Eignung der Methode zur quantitativen Bestimmung der technischen Enzyme Fungamyl, Amylase TXL und Lipase FE-01 bewertet.

Es wurde weiterhin untersucht inwieweit Änderungen im Methodenaufbau zu Veränderungen des Prüfbereiches Richtigkeit führen. Hierbei wurden Anpassungen der Extraktionen durch Anwendung eines zeitlich effektiveren Verdau vorgenommen. Der In-Lösung-Verdau wurde nicht über Nacht bei 37 °C sondern mittels eines Temperaturprogrammes (2.2.5.1) durchgeführt. Die erhaltenen Wiederfindungsraten der getesteten Referenzmaterialien wurden mit den Wiederfindungsraten der Extraktion über Nacht verglichen.

3.6.1 Prüfung der Linearität

Für die Prüfung der Linearität wurden die sechs Kalibrierkonzentrationen der Enzyme einmal hergestellt, sechsfach gemessen und die Daten auf Ausreißer geprüft. Eine relative Standardabweichung aller Konzentrationsstufen kleiner 20 % sowie ein Bestimmtheitsmaß der einzelnen Kalibrierkurven der Sechsfachbestimmung größer 0,99 wurden als Kriterien für die Linearität betrachtet. Als weiteres Kriterium der Prüfung ob die lineare Funktion im Vergleich zur quadratischen Funktion für die Ermittlung der Ergebnisse besser geeignet ist, galt die Aussage des Linearitätstests nach Fisher. Die für den Fisher-Test nachzuweisende Voraussetzung der Homogenität der Varianzen wurde zwischen dem ersten und letzten Konzentrationslevel geprüft.

Die Messdaten sowie die berechneten Daten (MW, SD) sind im Anhang Tabelle A 25 zu finden. Es konnten keine Ausreißer nachgewiesen werden. Die Daten der Stichproben sind normalverteilt (überprüft mit Anderson-Darling-Test). Die ermittelten relativen Standardabweichungen aller Konzentrationslevel der Kalibriergeraden waren für alle 3 technischen Enzyme kleiner 10 % (Tabelle 39).

Tabelle 39: Relative Standardabweichungen der Kalibrierreihe der Enzyme

N=6; RSD: relative Standardabweichung; KP: Kalibrierpunkt - Konzentrationen wie in 2.2.5.3 beschrieben

| Endo-1,4-Xylanase | Konzentration [mg/kg] | | | | | |
|--------------------------|------------------------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| | KP1 | KP2 | KP3 | KP4 | KP5 | KP6 |
| RSD [%] | 7,9 | 6,2 | 6,9 | 3,6 | 3,3 | 4,4 |
| alpha-Amylase | Konzentration [mg/kg] | | | | | |
| | KP1 | KP2 | KP3 | KP4 | KP5 | KP6 |
| RSD [%] | 5,2 | 2,1 | 4,3 | 2,1 | 2,2 | 2,5 |
| Lipase | Konzentration [mg/kg] | | | | | |
| | KP1 | KP2 | KP3 | KP4 | KP5 | KP6 |
| RSD [%] | 9,0 | 1,9 | 2,5 | 3,4 | 1,7 | 2,5 |

Die Auswertung des Bestimmtheitsmaßes der gemessenen Kalibrierkurven ist in Tabelle 40 dargestellt. Es konnte ein R^2 größer 0,994 für die Sechsfachbestimmung der Kalibrierkurve nachgewiesen werden.

Tabelle 40: Ergebnisse der Prüfung des BestimmtheitsmaßesN=6; MW: Mittelwert; R²: Bestimmtheitsmaß

| Messung | R ² Endo-1,4-Xylanase | R ² <i>alpha</i> -Amylase | R ² Lipase |
|-------------------------|----------------------------------|--------------------------------------|-----------------------|
| 1 | 1,000 | 0,995 | 0,998 |
| 2 | 1,000 | 0,998 | 0,996 |
| 3 | 1,000 | 0,998 | 0,997 |
| 4 | 0,999 | 0,999 | 0,994 |
| 5 | 0,997 | 0,998 | 0,998 |
| 6 | 0,998 | 0,996 | 0,997 |
| MW R² | 0,999 | 0,997 | 0,997 |

Die Homogenität der Varianzen wurde mit dem Brown-Forythe-Test überprüft. Hierfür wurden jeweils der Median aller errechneten Konzentrationsstufen der Sechsfachbestimmung mit einbezogen. Die ermittelte Prüfgröße war kleiner als der Prüfwert, sodass die Nullhypothese (Homogenität der Varianzen) nicht abgelehnt werden konnte.

Der Linearitätstest nach Fisher konnte nach erfolgreicher Prüfung der Normalverteilung sowie der Homogenität der Varianzen ausgeführt werden. Es konnte gezeigt werden, dass es bei dem Enzym Endo-1,4-Xylanase keine signifikanten Unterschiede zwischen einer linearen und einer quadratischen Kalibrierung gibt, da der Prüfwert (PW: 10,72) kleiner war als die ermittelte Prüfgröße (28,71). Die Nullhypothese konnte somit nicht abgelehnt werden. Es konnte ausgeschlossen werden, dass die quadratische Funktion besser ist als die lineare, sodass die Nullhypothese nicht abgelehnt werden konnte. Für die Enzyme *alpha*-Amylase (PW: 33,21) und Lipase (PW: 35,46) konnten Unterschiede der Varianzen der linearen und quadratischen Funktionen gezeigt werden, sodass die Nullhypothese abgelehnt werden musste. Es wurde gezeigt, dass die quadratische Kalibrierung besser geeignet ist als die lineare Regression.

In der Lebensmittelanalytik wird hauptsächlich die lineare Regression für die Quantifizierung von Rückständen oder Kontaminanten angewendet. Ein Hauptziel der Weiterentwicklung von Massenspektrometern in den letzten Jahren war es einen weiten linearen Quantifizierungsbereich zu ermöglichen, sodass andere Regressionsarten nur als Ausnahme genutzt werden müssen. Die Verwendung einer linearen Regression ermöglicht eine einfach kalkulierbare Ergebnisangabe sowie eine optisch messtäglich leicht prüfbare Genauigkeit der Kalibrierfunktion. Weiterhin ist eine vorzeitige Abschätzung möglicher Befunde außerhalb des Messbereiches für die Adaptierung des Kalibrierbereiches leicht möglich. Aufgrund der stabilen Messwerte und Bestimmtheitsmaße aller Kalibrierreihen größer 0,99 werden auch für die *alpha*-Amylase und Lipase entgegen des Ergebnisses des Fisher-Tests eine lineare Regression für die Quantifizierung unbekannter Proben verwendet. Da die Prüfwerte sowohl bei der *alpha*-Amylase als auch der Lipase nur knapp von der Prüfgröße abweichen, konnte bestätigt werden, dass beide Regressionsmodelle fast gleich gut für die Ergebnisermittlung geeignet sind. In Abbildung 44 sind die geprüften Regressionsmodelle der Lipase und die minimalen Unterschiede dieser dargestellt. Eine Anwendung des praxisnahen linearen Regressionsmodells wurde somit vorgezogen.

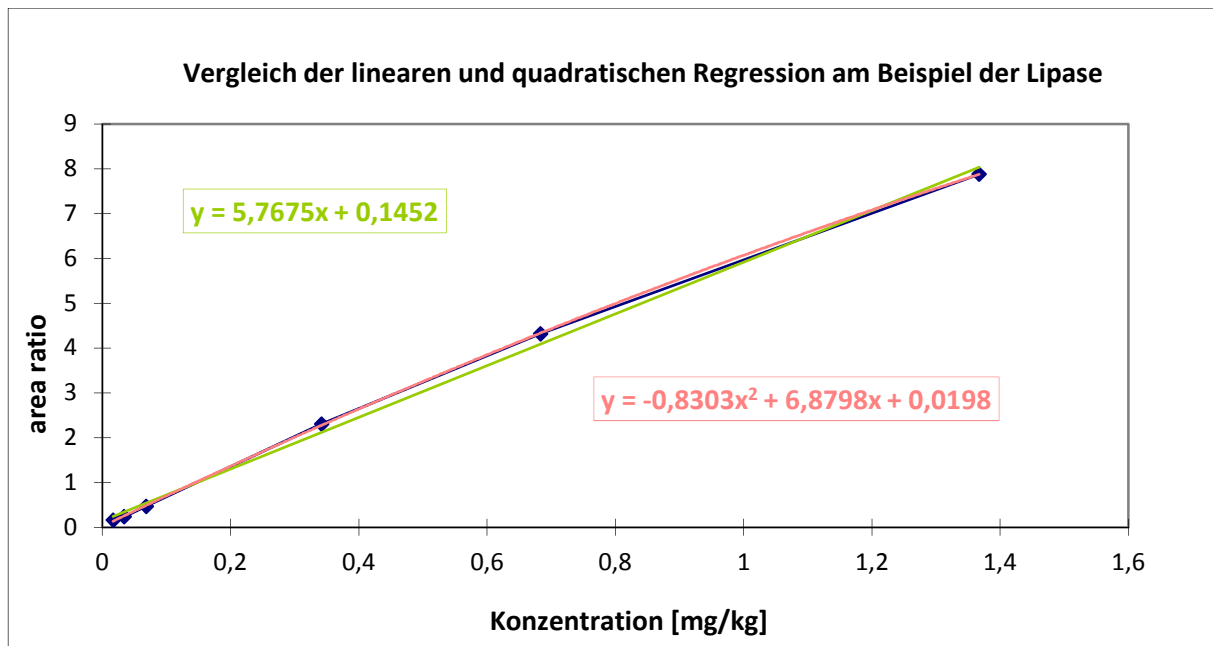


Abbildung 44: Vergleich der linearen und quadratischen Regression im Fisher-Test am Beispiel der Lipase

y-Achse: area ratio: Flächenverhältnis Analyt zu Interner Standard; x-Achse: Konzentration in mg/kg; grün: lineare Funktion; rot: quadratische Funktion

Durch die Auswahl des Konzentrationsbereiches wird die Linearität der Messmethode und damit einhergehend die Quantifizierung in diesem Bereich geprüft und gesichert. Proben höherer Konzentrationen müssen verdünnt oder der Kalibrierbereich individuell erweitert werden.

3.6.2 Prüfung der Wiederhol- und Laborpräzision

Es wurden die Wiederhol- als auch Laborpräzision geprüft. Hierfür wurden durch eine Dreifachbestimmung an einem Tag (Wiederholpräzision, RSD_R) sowie eine Einfachbestimmung an 3 aufeinander folgenden Tagen (Laborpräzision RSD_{WR}) die Konzentrationen der *alpha*-Amylase (Laborpräzision, Wiederholpräzision) sowie der Endo-1,4-Xylanase und Lipase (Wiederholpräzision) analysiert (Messdaten sowie berechnete Daten MW, SD siehe Anhang Tabelle A 26 bis Tabelle A 29). Es wurden die Matrices Mehl, Brot und Keks (Wiederholpräzision) bzw. Brot und Keks (Laborpräzision) geprüft.

Die mithilfe des Dean & Dixon Tests ermittelten Ausreißer wurden aus der Bewertung der Ergebnisse ausgeschlossen (gekennzeichnet im Anhang Tabelle A 26 bis Tabelle A 29). Die Ergebnisse sind in Tabelle 41 (Wiederholpräzision) sowie in Tabelle 42 (tagesverschiedene Laborpräzision) zusammengefasst. Eine Normalverteilung der Messwerte konnte nachgewiesen werden.

Tabelle 41: Wiederholpräzision der Messmethode

N=3; RSD_r: Wiederholpräzision in %; berechnet aus den ermittelten Konzentrationen der analysierten Referenzmaterialien in Dreifachbestimmung; Konzentrationslevel wie in 2.2.4 beschrieben

| | Konzentrationslevel | | | |
|--|---------------------|-----|-----|-----|
| Endo-1,4-Xylanase - RSD _r [%] | 1 | 2 | 3 | 4 |
| Mehl | 21,6 | 1,5 | 9,7 | 6,0 |
| Brot | 6,4 | 2,2 | 1,3 | 1,4 |
| Keks | 0,7 | 1,5 | 1,7 | 1,6 |
| <i>alpha</i> -Amylase – RSD _r [%] | 1 | 2 | 3 | 4 |
| Mehl | 3,0 | 0,7 | 0,5 | 0,7 |
| Brot | 2,4 | 0,5 | 0,2 | 1,5 |
| Keks | 7,4 | 1,4 | 1,0 | 1,1 |
| Lipase - RSD _r [%] | 1 | 2 | 3 | 4 |
| Mehl | 2,2 | 0,4 | 1,0 | 1,3 |
| Brot | 0,0 | 4,6 | 5,5 | 0,4 |
| Keks | 3,5 | 2,4 | 0,4 | 1,9 |

Tabelle 42: Tagesverschiedene Laborpräzision der Messmethode (*alpha*-Amylase)

N=3; RSD_{WR}: tagesverschiedene Laborpräzision; berechnet aus den ermittelten Konzentrationen der analysierten Referenzmaterialien in Einfachbestimmung an 3 aufeinanderfolgenden Tagen; Konzentrationslevel wie in 2.2.4 beschrieben

| <i>alpha</i> -Amylase – RSD _{WR} [%] | Konzentrationslevel | | | |
|---|---------------------|------|------|------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 |
| Brot | 3,0 | 17,1 | 16,7 | 7,9 |
| Keks | 11,8 | 6,8 | 9,6 | 13,5 |

Das Kriterium der Präzision war eine relative Standardabweichung für Wiederhol- als auch Laborpräzision bei allen Konzentrationsleveln kleiner 20 %. Dies konnte nachgewiesen und bestätigt werden. Eine Ausnahme stellen die Laborpräzisions-Werte des kleinsten Konzentrationslevels der Endo-1,4-Xylanase dar. Die Kriterien der Laborpräzision wurden mit einer relativen Standardabweichung von 21,6 % nicht erfüllt. Da die Bestimmungsgrenze der Endo-1,4-Xylanase bei der Matrix Mehl erst bei der Konzentrationsstufe 4 beginnt, werden Messdaten unterhalb dieser Konzentrationsstufe nicht quantifiziert. Die mangelnde Präzision im untersten Konzentrationslevel muss nicht näher beachtet werden. Die Methode wurde bezüglich der Präzision geprüft und ist robust, was die Reproduzierbarkeit zwischen Proben als auch die Reproduzierbarkeit im Laboralltag betrifft.

3.6.3 Prüfung der Richtigkeit (Wiederfindungsrate)

Vier verschiedene Konzentrationen je Matrix (Mehl, Brot, Keks) wurden in Dreifachbestimmung extrahiert, mit der entwickelten LC-MS/MS-Methode gemessen und die Konzentrationen der technischen Enzyme quantitativ bestimmt. Der Verdau (Extraktion) der analysierten technischen Enzyme erfolgte bei 37 °C über Nacht (2.2.5.1). Die quantitative Auswertung wurde über eine Standard-Kalibrierkurve mit linearer Regression und unter Einbezug eines ISTD-Proteins (*Amylase, Bacillus licheniformis*) vorgenommen.

Anhand der bekannten Konzentrationen an *alpha*-Amylase, Endo-1,4-Xylanase und Lipase in den Referenzmaterialien (2.2.4.2-2.2.4.4) konnten die Wiederfindungsraten (WFR) berechnet und als Kriterium einer ausreichenden Richtigkeit beurteilt werden. Es gibt keine einheitlichen, gesetzlich festgelegten Anforderungen für die Wiederfindungsraten einer analytischen Methode. Für die Pestizidanalytik sind im SANCO Dokument Wiederfindungsraten zwischen 70 bis 120 % vorgeschrieben [139]. Weitere Rechtsvorschriften bei der Ergebnisangabe für Schadstoffe, Kontaminanten und Mykotoxine sind vorhanden, welche die Einbeziehung der Wiederfindungsraten im Ergebnis beschreiben [156]. Aufgrund der großen Anzahl an Fehlerquellen (Waagen, Pipetten, Trypsinwirkung, pH-Abhängigkeit, Temperaturschwankungen, HPLC-Anlage, MS/MS-Anlage, Lösungsmittelreinheit usw.) und einem nicht vorhandenen Richtwert wurde das Kriterium der Richtigkeit auf eine WFR (Mittelwert der Dreifachbestimmung) zwischen 50 – 150 % festgelegt. Alle Messdaten befinden sich im Anhang Tabelle A 30 bis Tabelle A 32. Die ermittelten Ausreißer wurden gekennzeichnet und bei der Berechnung des Mittelwertes ausgeschlossen.

Im Zuge der Validierung wurden mit Hilfe des Vergleiches der Wiederfindungsraten Optimierungen der Methode geprüft. Es wurden sowohl ein zeitlich optimierter Verdau mittels Temperaturprogramm als auch alternative Quantifizierungsverfahren (Matrix-Kalibrierung, Standardadditionsverfahren, Quantifizierung über isotoopenmarkierte Standards als interner Standard) getestet. Alle Nullproben, denen kein technisches Enzym zugesetzt wurde, waren auch analytisch frei von Enzym.

3.6.3.1 WFR nach Trypsin-Verdau über Nacht

Die Referenzmaterialien Mehl, Brot und Keks (Probe 1-4) wurden mit einem In-Lösung-Verdau über Nacht mit Trypsin verdaut (2.2.5.1). Die Enzymkonzentration im Referenzmaterial wurde mit einer Lösungsmittelkalibrierreihe aus synthetisch angefertigten Peptiden quantifiziert und die WFR ermittelt. Die Ergebnisse sind im Anhang Tabelle A 30 bis Tabelle A 32 zu finden und wurden in Abbildung 45 bis Abbildung 47 zusammengefasst.

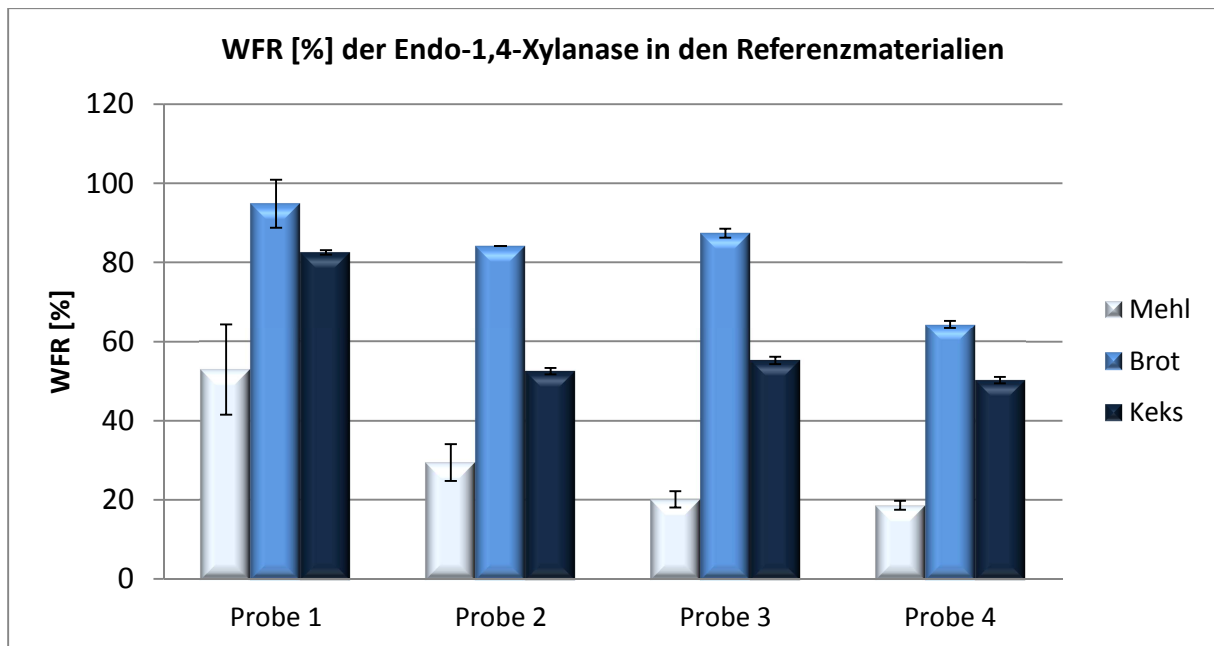


Abbildung 45: WFR der Endo-1,4-Xylanase nach Verdau über Nacht

N=3; dargestellt ist jeweils der Mittelwert sowie die Standardabweichung; Konzentration Probe 1-4: wie in 2.2.4 beschrieben

Die Endo-1,4-Xylanase in Brot und Keks zeigte WFR zwischen 50,3 % und 94,8 %, wobei die Werte im Mehl mit 18,6 % bis 52,9 % deutlich geringer waren. Die Bestimmungsgrenzen für die Endo-1,4-Xylanase liegen bei Mehl (15,60 mg/kg entspricht Probe 4) deutlich höher als bei Brot (7,75 mg/kg entspricht Probe 3) bzw. Keks (7,80 mg/kg entspricht Probe 3). Quantitative Werte unter diesem Konzentrationsbereich sind nicht abgesichert.

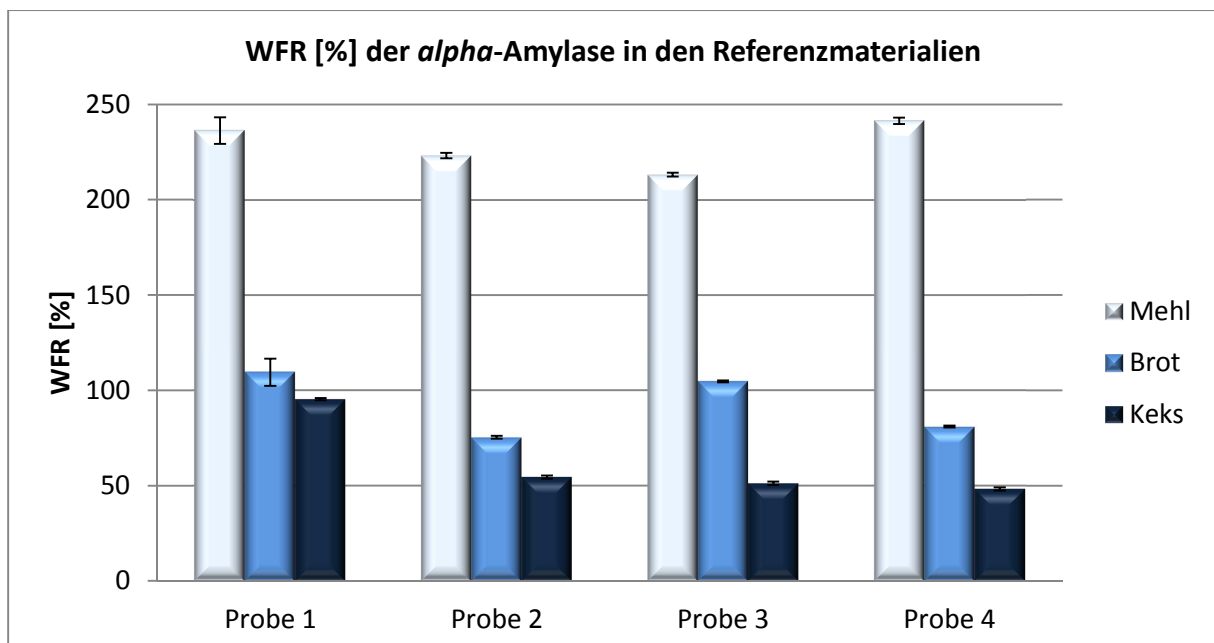


Abbildung 46: WFR der *alpha*-Amylase nach Verdau über Nacht

N=3; dargestellt ist jeweils der Mittelwert sowie die Standardabweichung; Konzentration Probe 1-4: wie in 2.2.4 beschrieben

Die WFR der *alpha*-Amylase zeigten Werte zwischen 75,4 % und 109,5 % (Brot), 48,2 % bis 95,3 % (Keks) bzw. 213,2 % bis 241,4 % (Mehl). Die Bestimmungsgrenzen der *alpha*-Amylase liegen für Mehl bei 2,58 mg/kg (entspricht 1/3 der Probe 1), für Brot bei 7,61 mg/kg (entspricht Probe 2) bzw. für Keks bei 2,58 mg/kg (entspricht Probe 1). Die quantitativen Werte der Matrix Brot für Probe 1 (da Konzentration kleiner als Bestimmungsgrenze) sind nicht abgesichert.

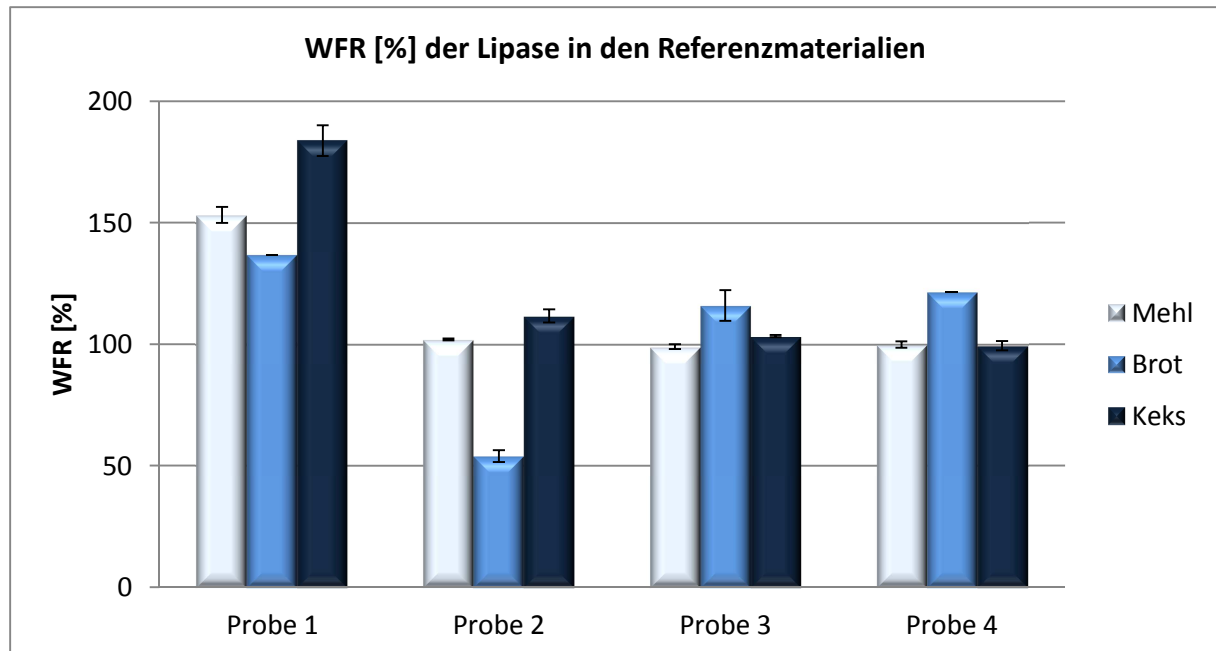


Abbildung 47: WFR der Lipase nach Verdau über Nacht

N=3; dargestellt ist jeweils der Mittelwert sowie die Standardabweichung; Konzentration Probe 1-4: wie in 2.2.4 beschrieben

Die Lipase wurde insgesamt mit geringerer Konzentration zu den Referenzmaterialien zugefügt. Die ermittelten Bestimmungsgrenzen liegen für Mehl bzw. Keks bei 1,26 mg/kg (entspricht Probe 2) bzw. für Brot bei 2,68 mg/kg (entspricht Probe 3). Die quantitativen Werte der Probe 1 (Keks) sowie der Probe 1 und 2 (Brot) sind nicht abgesichert. Die Wiederfindungsraten der anderen Konzentrationen sowie Matrices liegen zwischen 99 % und 121,5 %.

Die Standardabweichungen betragen weniger als 20 % (Ausnahme Endo-1,4-Xylanase, Probe 1) und bestätigen die Präzision der Methode.

Es konnten sehr gute Wiederfindungsraten aller drei Enzyme ermittelt werden (Ausnahme Mehl *alpha*-Amylase), was die Genauigkeit der Messmethode bestätigt. In weiteren Versuchen sollten neue Referenzmaterialien hergestellt werden, die vor allem für Endo-1,4-Xylanase als auch Lipase höhere Konzentrationsbereiche abdecken. Im Falle der Endo-1,4-Xylanase konnte im Mehl aufgrund der hohen Bestimmungsgrenze nur eine Dotierkonzentration quantifiziert werden und daran die Methode geprüft werden. Im Brot und im Keks konnten 2 Konzentrationen zweifelsfrei quantifiziert und geprüft werden. Die maximal dotierte, quantifizierte und geprüfte Konzentration der Lipase lag bei 5,4 mg/kg. Diese Konzentration entspricht dem praktisch angewandten Konzentrationsbereich bei der Zugabe von Lipase während des Backprozesses. Es sollten dennoch Referenzmaterialien höherer Lipasekonzentration produziert werden um den linear quantifizierbaren Bereich der Lipase in höheren Konzentrationsbereichen (bis etwa 10 mg/kg) abzusichern.

Die hohen WFR der *alpha*-Amylase in Mehl von über 200 % sind nicht konform mit Validierungskriterien. Es muss ein Faktor für die Ermittlung der *alpha*-Amylase-Gehalte in Mehl angewandt werden. Weiterhin ist zu prüfen ob die Extraktionsmethode für die Matrix Mehl weiter angepasst werden muss, sodass diese starken Überbefunde nicht mehr auftreten. Um den Einfluss der Matrix auf die Quantifizierung mittels linearer Lösungsmittel-Kalibrierung der *alpha*-Amylase auszuschließen, wurden weitere Quantifizierungsverfahren angewandt und geprüft (Matrix-Kalibrierung 2.2.5.5, Standardadditionsverfahren 2.2.5.6, Quantifizierung mit isotopenmarkierten Peptidstandards 2.2.5.7).

3.6.3.2 WFR nach Trypsin-Verdau mit Temperaturprogramm

Die Referenzmaterialien Brot und Kekse (Probe 1-4) wurden mit einem In-Lösung-Verdau und einem Temperaturprogramm (TP) mit Trypsin verdaut (2.2.5.1). Die Enzymkonzentration im Referenzmaterial wurde mit einer Lösungsmittelkalibrierreihe aus synthetisch angefertigten Peptiden quantifiziert und die WFR ermittelt. Die Ergebnisse sind im Anhang Tabelle A 33 zu finden und wurden in Abbildung 48 bis Abbildung 50 zusammengefasst.

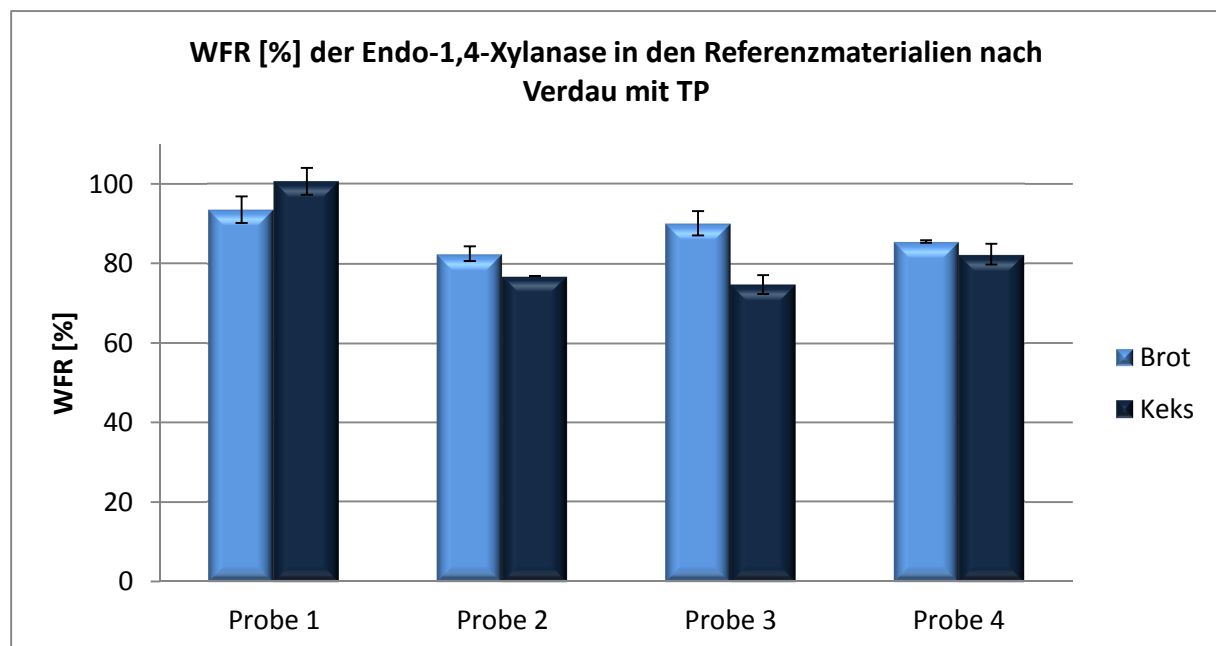


Abbildung 48: WFR der Endo-1,4-Xylanase nach Verdau mit Temperaturprogramm (TP)

N=3; dargestellt ist jeweils der Mittelwert sowie die Standardabweichung; Konzentration Probe 1-4: wie in 2.2.4 beschrieben

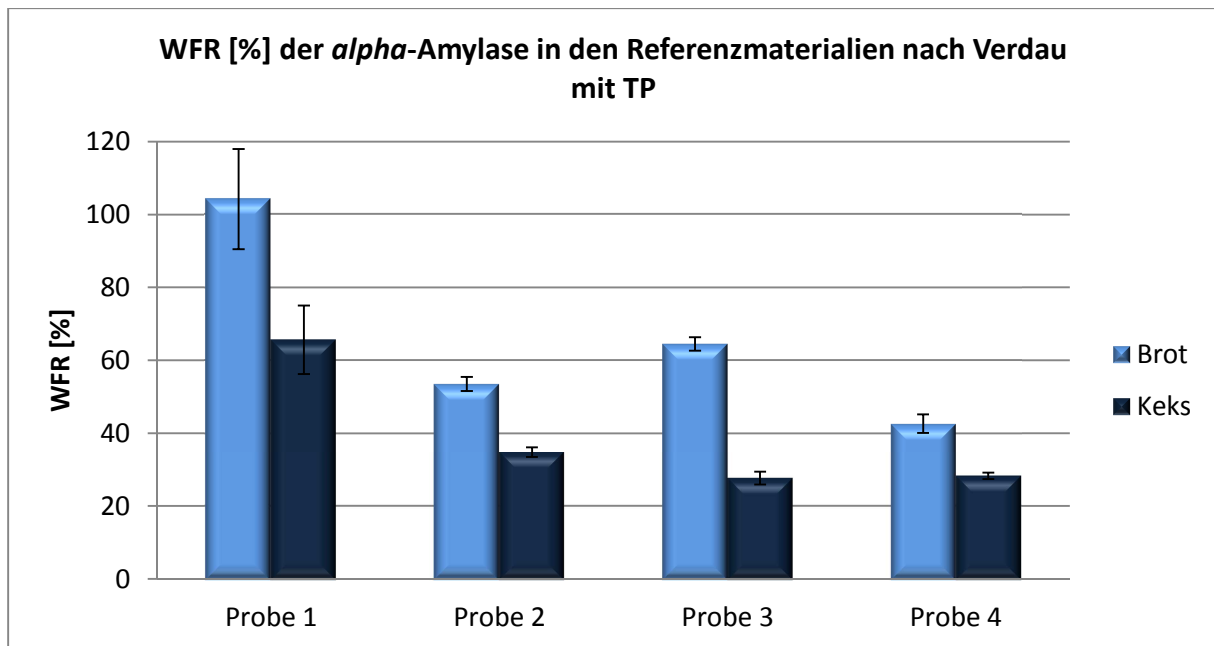


Abbildung 49: WFR der α -Amylase nach Verdau mit Temperaturprogramm (TP)

N=3; dargestellt ist jeweils der Mittelwert sowie die Standardabweichung; Konzentration Probe 1-4: wie in 2.2.4 beschrieben

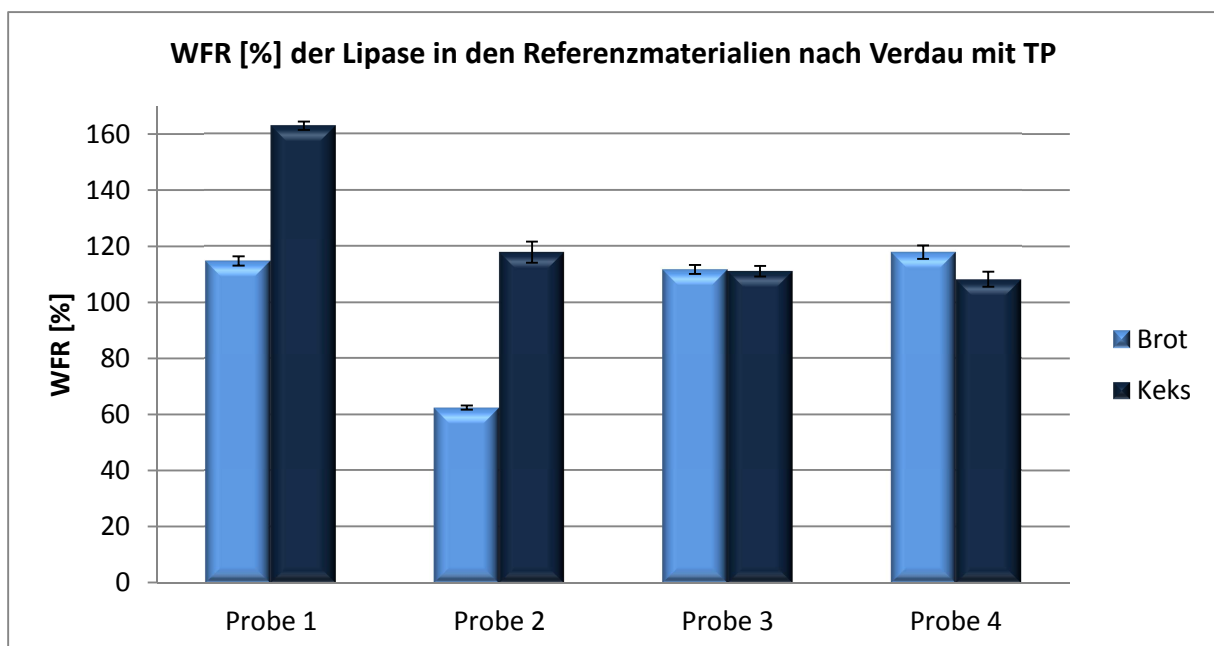


Abbildung 50: WFR der Lipase nach Verdau mit Temperaturprogramm (TP)

N=3; dargestellt ist jeweils der Mittelwert sowie die Standardabweichung; Konzentration Probe 1-4: wie in 2.2.4 beschrieben

Die quantitativen Werte der mit LC-MS/MS gemessenen Extrakte nach Verdau mit Temperaturprogramm zeigen insgesamt geringere WFR als nach dem Verdau über Nacht. Für die Endo-1,4-Xylanase in Brot und Kekse wurden Wiederfindungsraten zwischen 74,7 % und 100,6 % bestimmt. Die oberhalb der Bestimmungsgrenze der Endo-1,4-Xylanase quantifizierbaren Proben (Brot und Kekse ab Probe 3) lagen im Wiederfindungsbereich zwischen 74,7 % und 90,1 %. Die Wiederfindungsraten der α -Amylase zeigten Werte zwischen 42,6 % und 104,2 % (Brot) bzw.

27,7 % und 65,6 % (Keks). Die Wiederfindungsraten der quantitativ abgesicherten Lipase-Konzentrationen (Brot: ab Probe 3; Keks: ab Probe 2) befanden sich zwischen 108,2 % und 117,9 %. Die relativen Standardabweichungen betragen kleiner 7 % und bestätigen die Robustheit der Methode. Die Extraktion der etablierten Methode ist durch den Verdau über Nacht auf eine Minimumdauer von 2 Tagen festgelegt. Da die schnellstmögliche Analyse der Lebensmittelzutaten angestrebt wird um dem Verbraucher Informationen bezüglich der Lebensmittelzusammensetzung zeitnah zukommen zu lassen, müssen Verfahren dieser Art zeitlich optimiert werden. Es wurden die WFR der hergestellten Referenzmaterialien nach dem Trypsin-Verdau mit Temperaturprogramm in weniger als 2 Stunden ermittelt um die Qualität der verkürzten Extraktionsmethode einschätzen zu können. Hierfür wurden die Matrices Brot und Keks betrachtet. Die WFR der Endo-1,4-Xylanase sowie der Lipase lagen im angestrebten Bereich zwischen 70 % bis 120 %. Die sehr guten quantitativen Werte der Extrakte mit Verdau über Nacht haben sich bei der Lipase bestätigt und bei der Endo-1,4-Xylanase sogar deutlich verbessert. Der Verdau mit Temperaturprogramm ist für die Matrices Brot und Keks sowie die technischen Enzyme Endo-1,4-Xylanase und Lipase geeignet. Die Werte der *alpha*-Amylase fallen im Vergleich zum Verdau über Nacht deutlich geringer aus und liegen mit WFR zwischen 27,7 % bis 104,2 % nur teilweise im Normbereich (50-150 %) einer guten, reproduzierbaren Quantifizierungsmethode. Möglicherweise handelt es sich bei der *alpha*-Amylase um eine komplexere Molekülstruktur (auch Molekülmasse höher als Lipase und Xylanase), sodass ein Verdau über Nacht geeigneter ist. Dies würde erklären warum der Verdau mit Temperaturprogramm für die beiden Enzyme Lipase sowie Endo-1,4-Xylanase geeignet ist, für die *alpha*-Amylase aber mangelnde Wiederfindungsraten gemessen wurden. In weiteren Versuchen muss geprüft werden, inwieweit der Verdau mit Temperaturprogramm optimiert werden kann (zum Beispiel höhere Zyklustemperatur und –Anzahl), um die quantitative Bestimmung der *alpha*-Amylase ohne Verluste zu ermöglichen [179]. Bis dahin sollte auf die Verdauart für dieses Enzym verzichtet werden. Aufgrund der erhaltenen Ergebnisse wurde für alle weiteren Analysen der Verdau über Nacht angewendet.

3.6.3.3 WFR nach Quantifizierung mit Matrix-Kalibrierung

Für die Matrix-Kalibrierung wurden sechs Mehleinwaagen mittels einer Fungamyl-Lösung in ansteigender Konzentration dotiert, extrahiert und gemessen (2.2.5.5). Fungamyl besteht aus den Enzymen *alpha*-Amylase und Endo-1,4-Xylanase (3.2.1). Mit Hilfe der so erhaltenen Matrix-Kalibrierkurve konnten die WFR im Mehl (Probe 1-4) für die *alpha*-Amylase und Endo-1,4-Xylanase ermittelt werden. Die Ergebnisse sind im Anhang Tabelle A 34 zu finden und wurden in (Abbildung 51) zusammengefasst.

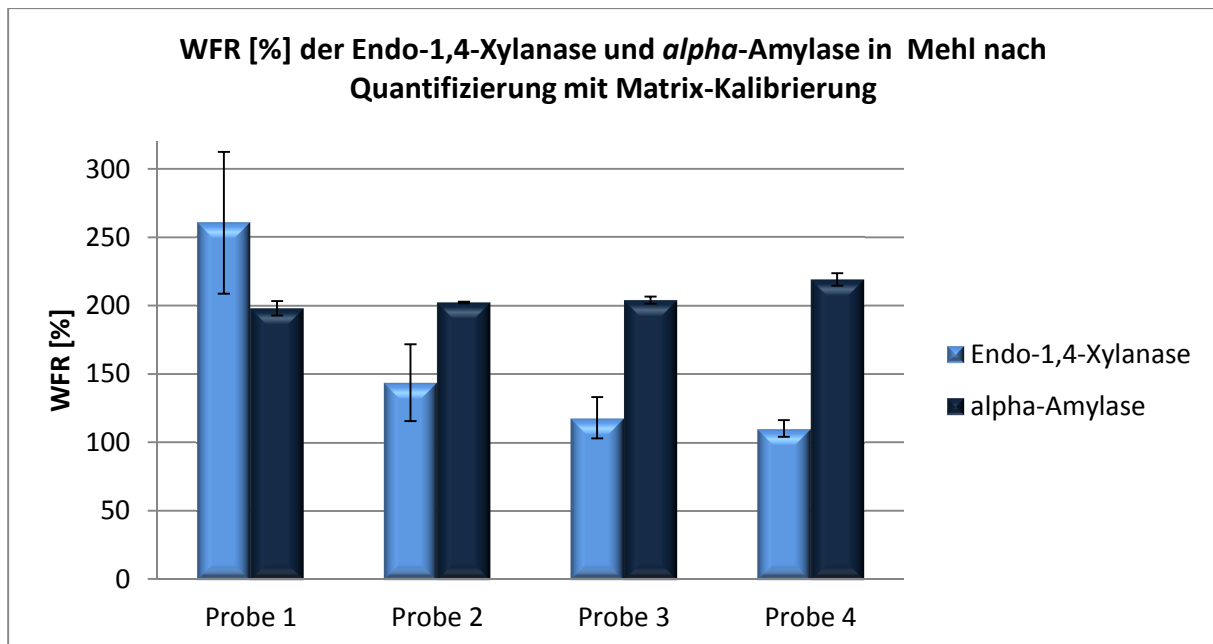


Abbildung 51: WFR der Endo-1,4-Xylanase und *alpha*-Amylase in Mehl nach Quantifizierung mit Matrix-Kalibrierung

N=3; dargestellt ist jeweils der Mittelwert sowie die Standardabweichung; Konzentration Probe 1-4: wie in 2.2.4 beschrieben

Die quantitativen Werte der mit Hilfe einer Matrix-Kalibrierung berechneten Konzentrationen im Mehl zeigten insgesamt ähnliche Werte wie mit einer Lösungsmittel-Kalibrierung. Die Endo-1,4-Xylanase konnte in Probe 4 sicher quantifiziert werden und hatte dort eine WFR von 110,0 %. Die WFR der *alpha*-Amylase lagen zwischen 198,1 % und 204,0 %. Die Standardabweichungen der Proben im quantifizierbaren Bereich, waren kleiner 20 % und bestätigen die Robustheit der Methode.

Der Matrixeinfluss bei (ESI)-MS/MS-Messungen ist sehr groß. Daher ist es wichtig zu prüfen, ob es Unterschiede zwischen Lösungsmittelbasierten und matrixangepassten Quantifizierungsverfahren gibt. Matrixeffekte sind als Änderung des MS-Signals eines Analyten durch koeluiierende Matrixkomponenten einer Probe im Vergleich zur Injektion des Analyten in reinem Lösungsmittel definiert [180]. Hierbei ist die wichtigste Störung die sogenannte Ionensuppression, welche auftritt wenn Matrixbestandteile mit den Zielanalyten um die verfügbare limitierte Oberflächenspannung konkurrieren und es zu Unterbefunden kommt. Weiterhin wird durch Matrixbestandteile die Oberflächenspannung der ESI-Tröpfchen verändert und die Coulomb-Explosion beeinflusst [181]. Die Bildung von unerwünschten Addukten von Matrixbestandteilen mit dem Zielanalyten kann zur Entstehung anderer Ionen (z.B. $[M + Na]^+$) führen als bei der Kalibrierung mit reinem Lösungsmittel ($[M + H]^+$). Je nach Koelution störender Matrixbestandteile kann es bei der Lösungsmittel-Kalibrierung zu gravierenden Fehlquantifizierungen kommen [182]. Um die Einwirkung von Matrixeffekten zu überprüfen wird die Quantifizierung über Standardaddition oder Matrix-Kalibrierung empfohlen [183]. Diese Methoden führen zu quantitativ exakten Ergebnissen, da die Matrix auch in den Kalibrierproben vorhanden ist.

Die mit Hilfe der Matrix-Kalibrierung erhaltenen WFR für Mehl bestätigen die quantitativen Ergebnisse der Berechnung mit Lösungsmittel-Kalibrierung. Die erforderlichen WFR wurden bei der Endo-1,4-Xylanase mit 110 % erreicht, wohingegen die *alpha*-Amylase erneut Werte über 200 %

lieferte. Es deutet darauf hin, dass der Sollwert der *alpha*-Amylase im Mehl nicht der Realität entspricht. Dies kann ausgeschlossen werden, da *alpha*-Amylase und Endo-1,4-Xylanase als Gemisch Fungamyl zum Mehl dotiert wurden und bei einer Fehleinwaage beide Enzyme ähnliche WFR zeigen müssten. Es wird von einer Matrixstörung ausgegangen, die explizit die Quantifizierung der *alpha*-Amylase in Mehl stört. Mit der wiederholten Herstellung eines mit *alpha*-Amylase dotierten Mehls unter Verwendung einer anderen Mehlsorte (z. B. Maismehl) könnten die Matrixeffekte möglicherweise visualisiert werden.

3.6.3.4 WFR nach Quantifizierung mit Standardaddition

Für die Quantifizierung mit Standardaddition wurden je 3 Proben des Mehls bekannter Enzymkonzentration (Probe 2 und 4) eingewogen (1 g) und mit einer ansteigenden Menge an Fungamyl (*alpha*-Amylase und Endo-1,4-Xylanase) dotiert (KP 1: 0 mg, KP 2: 10 mg, KP 3: 20 mg). Der Gehalt an *alpha*-Amylase mittels Standardaddition sollte ermittelt werden. Alle Proben wurden extrahiert und mit LC-MS/MS gemessen. Aus den erhaltenen Peakflächen des Quantifizierungspeptids der *alpha*-Amylase der mit Fungamyl dotierten Proben (KP 1-3) wurde eine Kalibrierreihe (Abbildung 52) erstellt und mittels linearer Regression der Gehalt der Mehlproben (Probe 2 und 4) ermittelt. Die Daten sind im Anhang Tabelle A 35 zu finden.

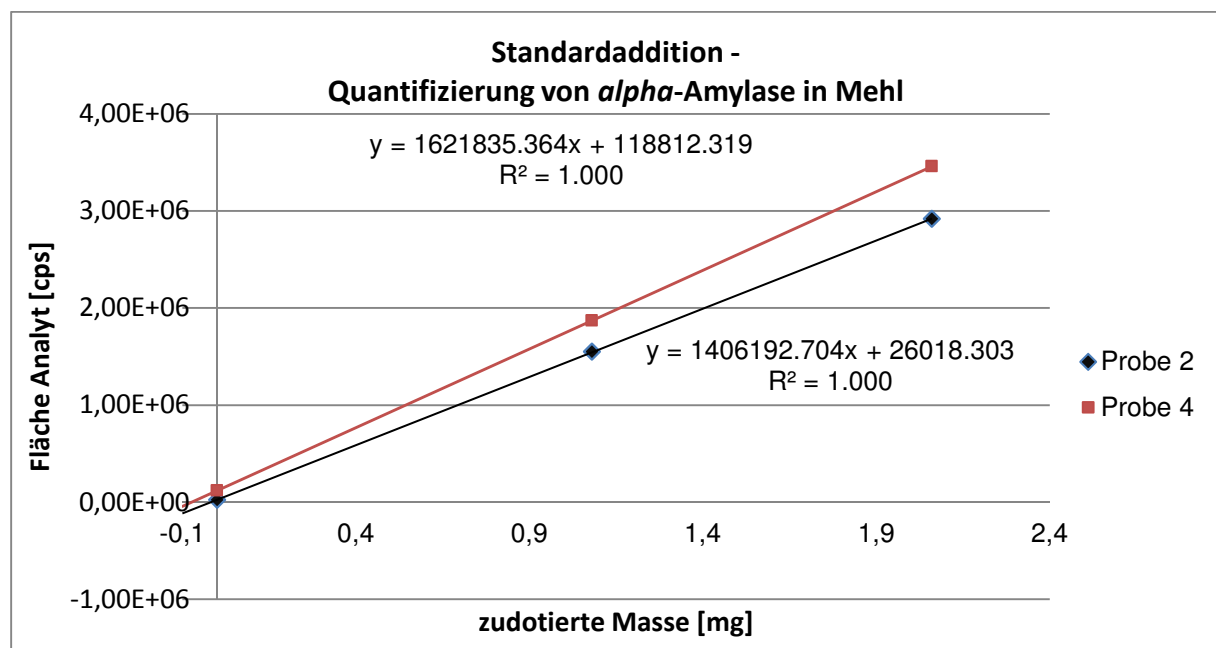


Abbildung 52: Kalibrierreihe für die Quantifizierung von *alpha*-Amylase in Mehl mit Standard-addition

N=1; dargestellt ist jeweils der Mittelwert sowie die Standardabweichung; Konzentration Probe 2 und 4: wie in 2.2.4 beschrieben

Für Probe 2 konnte eine WFR von 204,9 % und für Probe 4 eine WFR von 189,3 % errechnet werden. Aufgrund der aufwendigen Extraktion wurde eine Einfachbestimmung durchgeführt. Die Ergebnisse der Quantifizierung der *alpha*-Amylase in Mehl mittels Standardadditionsverfahren bestätigen die Ergebnisse der Quantifizierung mittels Lösungsmittel- und Matrix-Kalibrierung. Trotz sehr guter linearer Regression der gespickten Probe 2 und Probe 4 wurden für das Referenzmaterial WFR um 200 % berechnet. Wie bereits erwähnt wird ein Matrixeffekt des Mehls auf die Extraktion bzw. LC-MS/MS-Messung der *alpha*-Amylase vermutet, der zu den starken Überbefunden führte.

3.6.3.5 WFR nach Quantifizierung mit isoto­penmarkierten Peptidstandards

Die Referenzmaterialien Mehl, Brot und Keks (Probe 1-4) wurden mit einem In-Lösung-Verdau über Nacht mit Trypsin verdaut (2.2.5.1). Die Enzymkonzentration im Referenzmaterial wurde mit einer Lösungsmittelkalibrierreihe aus synthetisch angefertigten Peptiden quantifiziert und die WFR ermittelt. Anstelle des bei den vorherigen Versuchen verwendeten ISTD-Proteins (Amylase, *Bacillus licheniformis*) wurde das isoto­penmarkierte Peptid des jeweiligen Quantifizierungspeptids jedes Enzyms als interner Standard ausgewählt (Zugabe zur Extraktion sowie zur Kalibrierreihe). Die Ergebnisse sind im Anhang Tabelle A 36 bis Tabelle A 38 notiert und wurden in Abbildung 53 bis Abbildung 55 zusammengefasst.

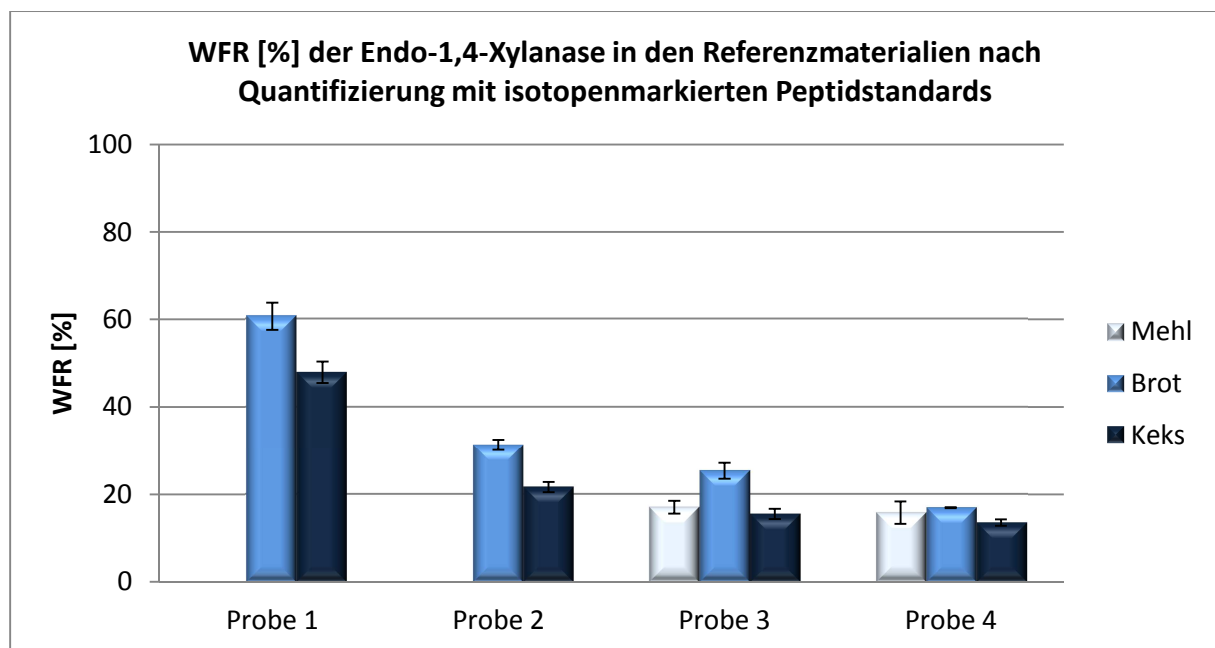


Abbildung 53: WFR der Endo-1,4-Xylanase nach Quantifizierung mit isoto­penmarkierten Peptidstandards

N=3; dargestellt ist jeweils der Mittelwert sowie die Standardabweichung; Konzentration Probe 1-4: wie in 2.2.4 beschrieben

Die Endo-1,4-Xylanase in Brot (17,0 % bis 60,7 %), Keks (13,5 % bis 47,9 %) und Mehl (15,8 % und 16,8 %) lagen bis auf die Ausnahme Brot Probe 1 alle unterhalb der in den Kriterien festgelegten 50 % WFR.

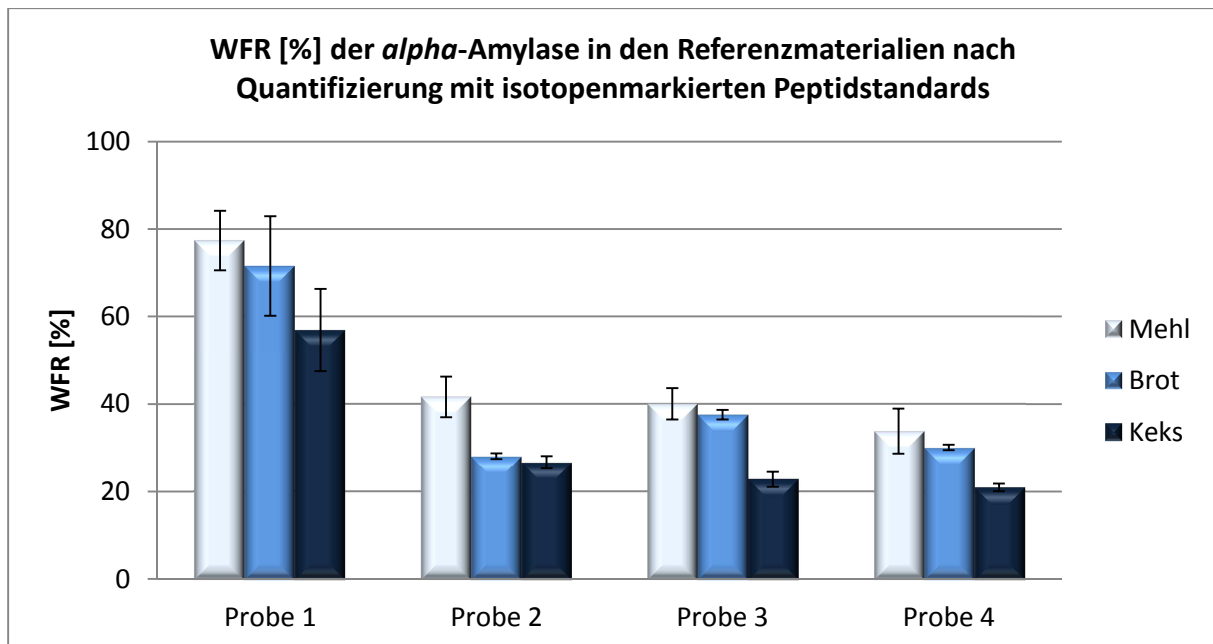


Abbildung 54: WFR der *alpha*-Amylase nach Quantifizierung mit isotonenmarkierten Peptidstandards

N=3; dargestellt ist jeweils der Mittelwert sowie die Standardabweichung; Konzentration Probe 1-4: wie in 2.2.4 beschrieben

Die WFR der *alpha*-Amylase zeigten Werte zwischen 28,1 % und 71,5 % (Brot), 21,0 % bis 56,9 % (Keks) bzw. 33,8 % bis 77,4 % (Mehl). Die quantitativen Werte der Matrix Brot für Probe 1 sind nicht abgesichert, da die Konzentration kleiner der Bestimmungsgrenze ist.

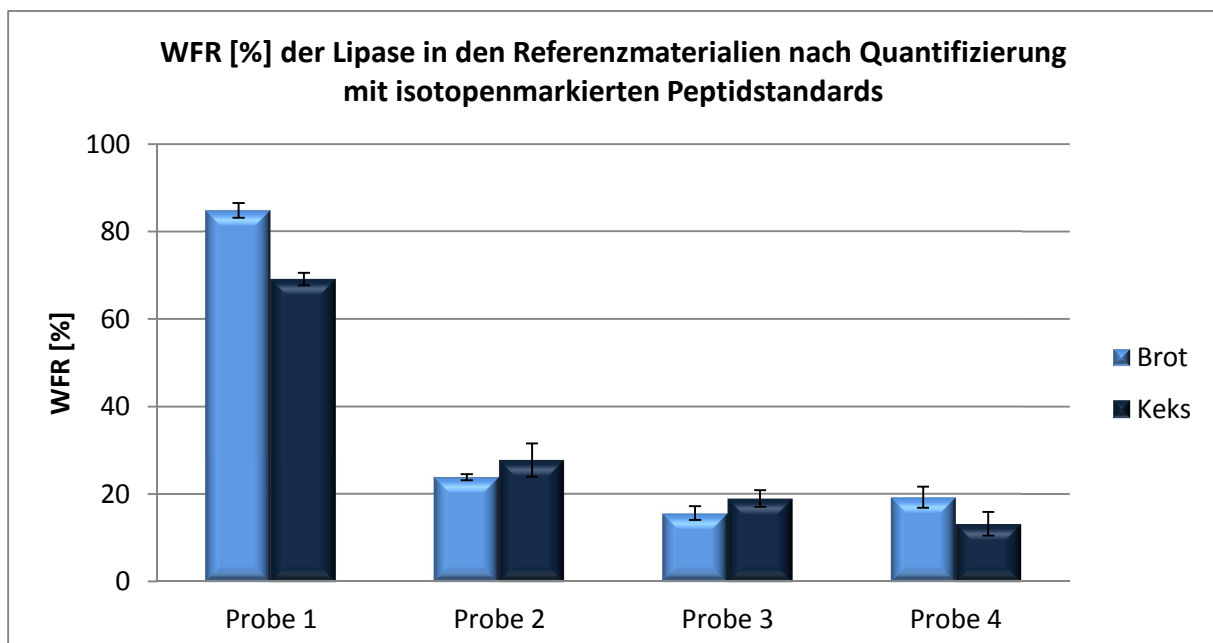


Abbildung 55: WFR der Lipase nach Quantifizierung mit isotonenmarkierten Peptidstandards

N=3; dargestellt ist jeweils der Mittelwert sowie die Standardabweichung; Konzentration Probe 1-4: wie in 2.2.4 beschrieben

Die Lipase wurde insgesamt mit geringerer Konzentration zu den Referenzmaterialien zugefügt. Die ermittelten Bestimmungsgrenzen liegen für Mehl bzw. Keks bei 1,26 mg/kg (entspricht Probe 2) bzw. für Brot bei 2,68 mg/kg (entspricht Probe 3). Die quantitativen Werte der Probe 1 (Keks) sowie der

Probe 1 und 2 (Brot) sind nicht abgesichert, da es sich um Konzentrationen kleiner der Bestimmungsgrenze handelt. Die WFR der anderen Konzentrationen sowie Matrizes liegen zwischen 13,2 % bis 27,8 %.

Eine relative bzw. absolute Quantifizierung über synthetische Peptidstandards sowie isotope-markierten Peptidstandards wird mehr und mehr von Interesse [184, 185]. Der Einsatz von isotope-markierten Peptidstandards während der Analyse der technischen Enzyme wurde geprüft und publiziert [154]. Zusammenfassend konnten geringere WFR erzielt werden als mit der beschriebenen Quantifizierung über das externe Protein ISTD-Amylase. Vor der Anwendung der Methode unter Nutzung der Quantifizierung mit isotope-markierten Peptidstandards müssten weitere Optimierungsversuche durchgeführt werden. Darauf wurde in dieser Arbeit verzichtet, da die Methode unter Nutzung der Quantifizierung über das externe Protein ISTD-Amylase bereits optimale Ergebnisse liefert.

Es wird vermutet, dass die Zuverlässigkeit des Trypsinverdaus als Hauptschritt der Extraktion zu Verlusten führt. Die Anwesenheit weiterer Matrixbestandteile (neben den Nährstoffen) wie z.B. Phytinsäure [186, 187] oder Phenolverbindungen [188] sowie sterische Hinderungen können den tryptischen Verdau in der Matrix beeinflussen. Vor allem für Mehl und Teig, welche der Verbraucher als vorgefertigtes Zwischenprodukt konsumiert, konnten in der Regel geringe und schwankende Ausbeuten unter Nutzung von Trypsin während des Verdaus festgestellt werden [154]. Der Verdau durch Proteasen wie Trypsin oder Chymotrypsin wird weiterhin durch endogene *alpha*-Amylase-Trypsin-Inhibitoren sowie Serin-Protease-Inhibitoren von Chymotrypsin-ähnlichen Enzymen behindert [171, 189–191]. Weiterhin können im Verlauf der Maillard-Reaktion während des Backprozesses Lysin- und Argininreste blockiert sein, sodass diese spezifischen Schnittstellen nicht für den tryptischen Verdau zur Verfügung stehen. Generell führt die im Backvorgang genutzte Temperatur zur Inaktivierung der genannten proteinhaltigen Inhibitoren im Weizenmehl. Da das externe Protein ISTD-Amylase gleichermaßen von den Schwankungen des Trypsinverdaus betroffen ist, werden die Verluste vermutlich ausgeglichen, sodass diese Quantifizierung zunächst die bessere Variante darstellt.

3.6.4 Ermittlung der Nachweis- und Bestimmungsgrenzen verschiedener Matrizes

Es wurden vier verschiedene Konzentrationen je Matrix (Mehl, Brot, Kekse) in Dreifachbestimmung unter Wiederholbedingungen quantitativ bestimmt. Das Signal-Rausch-Verhältnis (S/N-Verhältnis) wurde ermittelt und die Bestimmungsgrenze (BG) festgelegt (Konzentration bei einem S/N-Verhältnis bei allen 3 Messungen > 10:1). Die Nachweisgrenze (NG) wurde bei der Konzentration festgelegt, bei der das S/N-Verhältnis aller 3 Messungen > 3:1 war. Die NG der *alpha*-Amylase für Mehl und Kekse wurde abgeschätzt, indem die Konzentration der BG durch 3 geteilt wurde. Ursache dafür war die hohe Sensitivität der *alpha*-Amylase-Messung, die auch für das niedrigste Konzentrationslevel der hergestellten Referenzmaterialien zu Signalen oberhalb des definierten S/N führte. Repräsentative Chromatogramme der Analytenpeaks an der Bestimmungsgrenze mit dem ermittelten S/N-Verhältnis sind im Anhang Abbildung A 4 bis Abbildung A 6 hinterlegt. Alle ermittelten S/N ratios sind im Anhang Tabelle A 39 abgelegt. Die Ergebnisse der Bestimmung von NG und BG sind in Tabelle 43 dargestellt.

Tabelle 43: Nachweis- und Bestimmungsgrenzen der Enzyme

N=3; NG: Nachweisgrenze in mg/kg; BG: Bestimmungsgrenze in mg/kg; ermittelt wurden die Grenzen anhand des Signal-Rausch-Verhältnisses (NG: 3:1; BG; 10:1); *: mathematisch bestimmte NG

| | Endo-1,4-Xylanase | | <i>alpha</i> -Amylase | | Lipase | |
|-------------|-------------------|-------|-----------------------|------|--------|------|
| | NG | BG | NG | BG | NG | BG |
| Mehl | 7,80 | 15,60 | 0,86* | 2,58 | 0,36 | 1,26 |
| Brot | 3,07 | 7,75 | 1,94 | 7,61 | 1,06 | 2,68 |
| Keks | 1,04 | 3,64 | 0,86* | 2,58 | 0,36 | 1,26 |

Es konnten matrixabhängige NG und BG ermittelt werden. Dies bestätigt den großen Einfluss der Matrix auf die Extraktions- und Messmethodik und macht eine Validierung 3 repräsentativer Matrizes aus dem Bereich Getreide unabdingbar. Die Bestimmung der S/N-Verhältnisse, die der Festlegung der NG und BG zugrunde liegt, ist dabei vor allem vom Rauschen abhängig. Ein solides Messsignal kann durch ein hohes Grundrauschen möglicherweise nicht zur Identifikation bzw. Quantifizierung des Analyten führen. Eine intensive Probenreinigung während der Extraktion (SPE-Aufreinigung) war nötig und führte zu diesen für die Praxis optimalen Nachweis- und Bestimmungsgrenzen. Während des Backprozesses werden sehr geringe Mengen technischen Enzyms zugesetzt, sodass die Analytik dieser sehr sensitiv sein muss (einstelliger ppm Bereich). Die für die Identifikation ermittelten NG liegen mit maximal 7,80 mg/kg (Endo-1,4-Xylanase, Mehl) bzw. maximal 1,94 mg/kg (*alpha*-Amylase, Brot) sowie maximal 1,06 mg/kg (Lipase, Brot) in diesem Spurenbereich und ermöglichen die Identifikation eingesetzter technischer Enzyme im geforderten Konzentrationsbereich. Die für die Quantifizierung der identifizierten Enzyme wichtigen BG sind mit maximal 7,61 mg/kg (*alpha*-Amylase, Brot) sowie maximal 2,68 mg/kg (Lipase, Brot) in einem praxisorientierten Konzentrationsbereich. Im Falle der *alpha*-Amylase müssen erneut Referenzmaterialien (Mehl, Keks) mit kleinerer Konzentration produziert werden, da keine weitere Konzentration kleiner dieser BG gemessen werden konnte. Diese Bestimmungsgrenzen sind noch nicht abgesichert und können eventuell weiter nach unten korrigiert werden. Die erreichte Bestimmungsgrenze von 15,60 mg/kg (Endo-1,4-Xylanase, Mehl) ist nicht zufriedenstellend. Die Methode muss weiter optimiert werden um auch für den Nachweis der Endo-1,4-Xylanase in Mehl eine BG kleiner 10 mg/kg zu erhalten. Neben der Möglichkeit die Extraktion erneut zu optimieren und mit höheren Probeneinwaagen bzw. Injektionsvolumina bessere Sensitivitäten zu erhalten, wäre der Austausch des Verdauenzym Trypsin durch zum Beispiel Chymotrypsin zu prüfen. Eine verbundene Neuauswahl von Markerpeptiden mit höherer Sensitivität könnte das Sensitivitätsproblem beheben.

3.6.5 Spezifität und Selektivität der Messmethode

Für den Ausschluss von „Blindpeaks“ aus dem Lösungsmittel oder von Gerätespezifischen Hintergrundsignalen wurden sowohl Acetonitril als auch eine Nullprobe der Extraktion (komplette Extraktion von Matrix ohne technisches Enzym) 15-fach gemessen und die Flächen gemittelt. Die Spezifität wurde erreicht, wenn die berechneten Blankflächen (sowohl Lösungsmittel als auch Nullprobe) maximal 30 % der gemittelten Peakflächen an der Bestimmungsgrenze betragen. Die Messdaten sind im Anhang Tabelle A 40 hinterlegt. Die Ergebnisse wurden in Tabelle 44 zusammengefasst.

Tabelle 44: Vergleich der Peakflächen zur Prüfung der Spezifität der Messmethode

N=15; LM: Lösungsmittel; BG: Bestimmungsgrenze; dargestellt sind die Mittelwerte

| | | Peakfläche [cps] BG | Peakfläche [cps] LM Blank | Peakfläche [cps] Matrix Blank | Anteil Fläche LM Blank zu Fläche BG [%] | Anteil Fläche Matrix Blank zu Fläche BG [%] |
|----------------------------------|------|------------------------|---------------------------------|-------------------------------------|---|--|
| Endo-1,4- Xylanase | Mehl | 14723,33 | 22,80 | 202,25 | 0,15 | 1,47 |
| | Brot | 22686,67 | 22,80 | 484,53 | 0,10 | 2,16 |
| | Keks | 19880,00 | 22,80 | 750,70 | 0,11 | 2,77 |
| <i>alpha</i>- Amylase | Mehl | 17866,67 | 38,25 | 2079,53 | 0,11 | 11,35 |
| | Brot | 11710,00 | 38,25 | 1393,93 | 0,32 | 12,13 |
| | Keks | 7002,00 | 38,25 | 936,07 | 0,56 | 13,72 |
| Lipase | Mehl | 53746,67 | 20,59 | 1969,29 | 0,04 | 3,69 |
| | Brot | 5318,00 | 20,59 | 732,93 | 0,34 | 13,69 |
| | Keks | 19233,33 | 20,59 | 2809,07 | 0,12 | 14,42 |

Die Flächen im Lösungsmittelblank betragen weniger als 1 % der jeweiligen Peakflächen an der BG. Da die Flächen der Matrix Nullprobe weniger als 15 % der Peakflächen an der jeweiligen BG betragen, wurde die Spezifität nachgewiesen. Falsch positive Ergebnisse der analysierten technischen Enzyme sind in den drei Matrices Mehl, Brot und Keks ausgeschlossen.

Die quantitative Auswertung von Proben erfolgte durch die Erstellung eines Quantifizierungsfiles in Analyst 1.6.1 (SCIEX Germany GmbH, Darmstadt, Germany). Abbildung 56 zeigt einen Quantifizierungsfile mit ausgewählten Kalibrierpunkten des eingesetzten und geprüften Kalibrierbereiches (3.6.1) der *alpha*-Amylase (Peptid NWPIYK) sowie eine Positivprobe (Brot Probe 3: 19,22 mg/kg *alpha*-Amylase) und einem Blank (Wasser). Am Beispiel ist ersichtlich, dass die qualitative Begutachtung einer Probe klar und eindeutig ist, da keine Signale mit einem Signal-Rauschverhältnis größer 10 in Blank-Proben sichtbar sind.

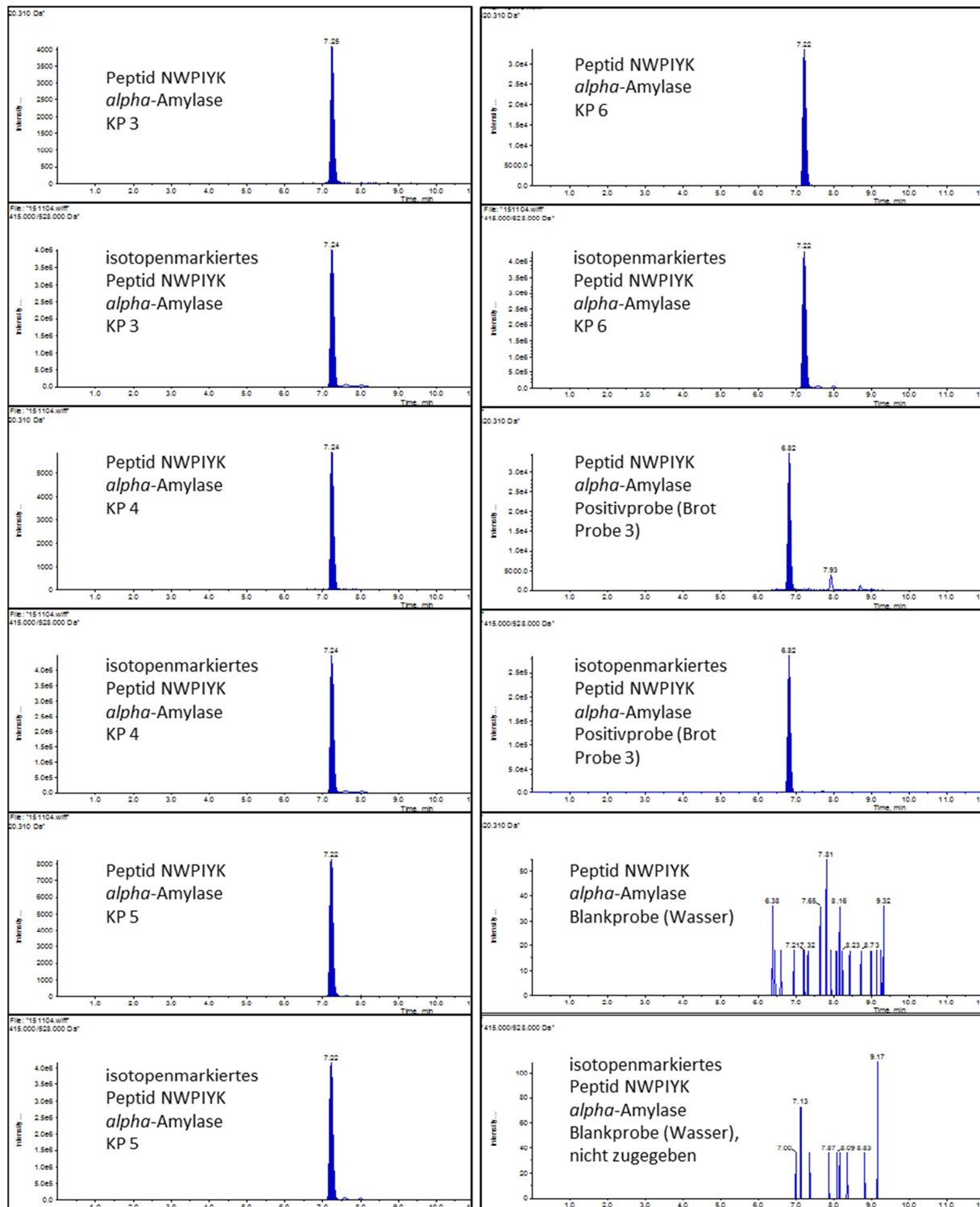


Abbildung 56: Quantifizierungsfile der α -Amylase (Markerpeptid NWPIYK) in Analyst 1.6.1

y-Achse: Intensität in cps; x-Achse: Retentionszeit in Minuten; von oben: Kalibrierpunkt (KP) 3-6 (Konzentrationen wie in 2.2.5.3 beschrieben), Positivprobe (Brot Probe 3: 19,22 mg/kg α -Amylase), Blankprobe (Wasser)

3.6.6 Ermittlung der Messunsicherheit der Methode

Es wurde die erweiterte Messunsicherheit der Methode mit Hilfe der in der Validierung berechneten Mittelwerte und Standardabweichungen der Konzentrationen der unterschiedlichen Matrices und Konzentrationsbereiche je Enzym ermittelt („Bottom up“-Prinzip; Daten der Wiederholpräzision 2.2.6.2). Messergebnisse sind nach Empfehlung des Ständigen Ausschusses der EU,

SANCO/0064/2003-rev4 (EG, 2003) in folgender Form anzugeben: Ergebnis = Messwert \pm U [156]. Eine Interpretation des Ergebnisses unter Einbezug der Messunsicherheit ist vor allem nötig, wenn gesetzliche Grenzwerte hinterlegt sind. Da beim Nachweis technischer Enzyme keine Grenzwerte berücksichtigt werden müssen, kann die ermittelte Messunsicherheit je Enzym vor allem dazu genutzt werden das Ergebnis mit den beschriebenen Schwankungen richtig einzuschätzen. Maximal mögliche prozentuale Messunsicherheiten sind nicht definiert. Exemplarisch kann eine festgelegte Messunsicherheit von 50 % bei der Pestizidanalytik erwähnt werden, welche im SANCO Dokument festgehalten ist [139].

Tabelle 45: Ermittelte Messunsicherheiten je Matrix und Konzentrationslevel (Wiederholanalyse)

N=3; U: erweiterte Messunsicherheit; KL: Konzentrationslevel, wie in 2.2.4 beschrieben; es wurden nur die Konzentrationslevel dargestellt, die \geq Bestimmungsgrenze sind

| U [%] | Endo-1,4-Xylanase | | | | <i>alpha</i> -Amylase | | | | Lipase | | | |
|-------------|-------------------|------|------|------|-----------------------|------|------|------|--------|------|------|------|
| | KL 1 | KL 2 | KL 3 | KL 4 | KL 1 | KL 2 | KL 3 | KL 4 | KL 1 | KL 2 | KL 3 | KL 4 |
| Mehl | | | | 11,7 | 5,8 | 1,3 | 1,0 | 1,4 | | 0,8 | 1,9 | 2,6 |
| Brot | | | 2,5 | 2,7 | | 1,0 | 0,5 | 3,0 | | | 10,7 | 0,6 |
| Keks | | | 3,4 | 3,1 | 14,6 | 2,8 | 2,0 | 2,1 | | 4,8 | 0,9 | 3,7 |

Es wurden die erweiterten Messunsicherheiten im Konzentrationsbereich \geq Bestimmungsgrenze (Tabelle 45) ermittelt und betrachtet, da erst oberhalb der BG quantitative Werte angegeben werden. Die Messunsicherheit des jeweiligen Enzyms schwankt über den gesamten Konzentrationsbereich zwischen 2,5 % und 11,7 % (Endo-1,4-Xylanase), 0,5 % und 14,6 % (*alpha*-Amylase) bzw. 0,6 % und 10,7 % (Lipase). Da alle ermittelten Messunsicherheiten maximal 14,6 % betragen, wurde dieser Wert als Pauschalwert für die entwickelte Methode angenommen und verwendet. Es wird daher sicher gestellt, dass auch der maximale Unsicherheitsbereich der *alpha*-Amylase im niedrigsten Konzentrationslevel KL1 mit 14,6 % für die Sicherheit des Analysenergebnisses verwendet wird. Die ermittelte Messunsicherheit ist deutlich geringer als die laut SANCO festgelegten 50 %. Dies bestätigt die geringen zufälligen Schwankungen (systematische Schwankungen (z.B. Verluste durch die Probenvorbereitung wurden nicht betrachtet) der Methode, ist jedoch auch auf die niedrige Stichprobenzahl sowie auf den niedrigen Variationsgrad (Analyse unter gleichen Bedingungen am gleichen Tag) zurück zu führen. Da mit Messwerten der Wiederholstreuung gerechnet wurde, sind nicht alle Streubeiträge beinhaltet, die bei der Anwendung der Methode in der Laborroutine durch Wechsel von Gerät und Personal zu erwarten sind [131]. Um Schwankungen über einen größeren Zeitraum (z.B. verschiedene Bearbeiter, Analysetage, Temperaturen, Gerätealterung, usw.) zu erfassen wird eine weitere Aufnahme von Messwerten empfohlen. Dies wäre z.B. durch das Mitführen ausgewählter Referenzmaterialien am Analysentag als Laborstandard umsetzbar. Die ermittelten Werte könnten dann für die erneute Berechnung der Messunsicherheit genutzt werden, um praxisnahe Unsicherheitswerte zu erhalten. Als Beispiel wurden für die *alpha*-Amylase die Messwerte der Laborpräzision ebenfalls mit in die Berechnung der Messunsicherheit einbezogen. Hier wurden somit nicht nur Unsicherheiten bei Wiederholanalysen sondern auch Unsicherheiten des Laboralltags mit einberechnet (2.2.6.2).

Tabelle 46: Ermittelte Messunsicherheiten je Matrix und Konzentrationslevel (Vergleich Wiederhol- und tagesverschiedene Analyse)

U: erweiterte Messunsicherheit; KL: Konzentrationslevel, wie in 2.2.4 beschrieben; es wurden nur die Konzentrationslevel dargestellt, die \geq Bestimmungsgrenze sind

| U [%] | <i>alpha</i> -Amylase (N=3) (Schwankungen der Analysen unter Wiederholbedingungen) | | | | <i>alpha</i> -Amylase (N=6) (Schwankungen der Analysen unter Wiederhol- und tagesverschiedenen Bedingungen) | | | |
|-------------|---|------|------|------|--|------|------|------|
| | KL 1 | KL 2 | KL 3 | KL 4 | KL 1 | KL 2 | KL 3 | KL 4 |
| Mehl | 5,8 | 1,3 | 1,0 | 1,4 | | | | |
| Brot | | 1,0 | 0,5 | 3,0 | | 29,3 | 36,1 | 23,4 |
| Keks | 14,6 | 2,8 | 2,0 | 2,1 | 26,5 | 5,5 | 6,4 | 2,1 |

Die ermittelten kombinierten Messunsicherheiten sind für alle Matrizes und Konzentrationsbereiche mit der Erweiterung der Messwerte gestiegen. Die maximale Messunsicherheit der geprüften Werte für die *alpha*-Amylase liegt bei 36,1 % im Vergleich zu 14,6 % bei Wiederholbedingungen. Dies bestätigt die Vermutung, dass praxisnahe und damit genauere Messunsicherheiten eines Analysenverfahrens erst nach einem langwierigen Messprozess mit einer großen Zahl an Daten ermittelt werden können. Als erster Orientierungswert ist die ermittelte Messunsicherheit von 14,6 % vorerst verwendbar, sollte aber regelmäßig mit dazu gewonnen Messwerten aktualisiert werden.

4 Schlussfolgerungen

4.1 Technologische Wirkung von Fungamyl und Lipase FE-01

Die positive technologische Wirkung durch den Einsatz technischer Enzyme während der Backwarenproduktion ist seit langem bekannt. Da eine Vielzahl möglicher zum Einsatz kommender technischer Enzyme vorhanden ist, müssen die jeweils spezifischen Wirkprozesse bekannt sein. Ebenso von Bedeutung ist die Anwendung technischer Enzyme in einem geeigneten Konzentrationsbereich, sodass ein optimales Enzym-Substrat-Verhältnis vorliegt. Ein Hauptziel der Arbeit war es die technologische Wirkung der betrachteten technischen Enzyme Fungamyl, Amylase TXL und Lipase FE-01 zu prüfen. Hierfür wurden im Rahmen eines Backversuchs Brote mit je 2 verschiedenen Konzentrationen Fungamyl (*alpha*-Amylase, Endo-1,4-Xylanase) sowie Lipase FE-01 gebacken. Nach einer bestimmten Lagerzeit (1, 3 und 7 Tage) erfolgte der Vergleich verschiedener Parameter unter Berücksichtigung einer Nullprobe. Vor allem der Einfluss eines aus Capryl /Caprinsäure bestehenden Öls als Fettquelle des Brotteiges auf die Wirkung der Lipase wurde intensiv betrachtet. Eine durch die Aktivität von Mikroorganismen bedingte Veränderung der Zusammensetzung der Brote während der Lagerung wurde durch eine mikrobiologische Prüfung ausgeschlossen.

Frische, Volumenausbeute, Haltbarkeit

Anhand der Feuchtemessung, Volumenbestimmung, Porenanalyse sowie Textur-Profilanalyse wurden die Effekte von Fungamyl bzw. Lipase FE-01 auf die Qualitätskriterien Frische, Volumenausbeute und Haltbarkeit überprüft. Die Zugabe von Fungamyl führte zu einer konzentrationsabhängigen Verbesserung der Broteigenschaften, was sich in einem erhöhten Brotvolumen, einer optimalen Brotweichheit und Porenverteilung sowie einer lang anhaltenden Frische zeigte. Alterungserscheinungen traten erst nach längerer Lagerdauer als bei nicht mit Fungamyl behandelten Broten auf. Zurückzuführen sind die beschriebenen Effekte zum einen auf die durch die *alpha*-Amylase katalysierte vermehrte Freisetzung von Zuckern und Oligosacchariden aus Stärke und die damit verbundene gesteigerte Bildung von Kohlenstoffdioxid im Rahmen des Gärprozesses durch die Hefe, zum anderen auf die durch die Endo-1,4-Xylanase-abhängige verbesserte Wasserbindungskapazität. Bei den Broten mit Zusatz von Lipase FE-01 wurden ein höherer Härtegrad, ein geringes Brotvolumen und ein untypisches Porenmuster festgestellt. Ursache dafür ist vermutlich die Kombination von Spezialöl und Lipase FE-01 in der Rezeptur und die damit einhergehende vermehrte Bildung freier Fettsäuren. Ein so entstehendes Überangebot an freien Fettsäuren könnte zu einer atypischen Aktivität des endogenen Enzyms Lipoxygenase führen, welches unter Verbrauch von Sauerstoff arbeitet. Der entstehende Sauerstoffmangel im Teig würde den Gärprozess und damit die Bildung von Kohlenstoffdioxid behindern, wodurch die Teiglockerung gestört ist. Da bei diesen Broten bereits an Tag 1 mangelhafte Qualitätseigenschaften aufgenommen wurden, konnte der Einfluss auf die Haltbarkeit nicht bewertet werden.

Fettsäure- und Zuckerspektrum

Durch Analyse der Fettsäure- und Zuckerspektren wurden die Effekte der betrachteten technischen Enzyme weiter untersucht.

Das Vorliegen fettspaltender Enzyme in Fungamyl ist nicht bekannt, sodass die Dotierung erwartungsgemäß keinen Einfluss auf das Fettsäurespektrum der Brote nahm.

Die lipasedotierten Brote (Tag 1) zeigten bei der höheren Konzentration (1,80 mg/kg) eine Umwandlung der gesättigten (Capryl-/Caprinsäure) in einfach ungesättigte Fettsäuren (v.a. Ölsäure). Vermutet wird, dass eine im technischen Enzym Lipase FE-01 ebenfalls vorhandene Fettsäuresaturase (Syntheseprodukt von Pilzen) zu der Umwandlung der Fettsäuren führte. Eine vergleichende Untersuchung eines Brotes auf Basis von Erdnussöl zeigte, dass nur ein sehr geringer Anteil gesättigter Fettsäuren vorliegt und diese durch die vermutete Desaturaseaktivität nicht umgewandelt wurden. Ursächlich dafür könnte eine Substratzugänglichkeit oder die hohe Präsenz an Ölsäure sein.

Im Verlauf der Lagerung kam es sowohl zum Anstieg des Capryl-/Caprinsäureanteils als auch zum Abfall des Spiegels der restlichen gemessenen Fettsäuren. Diese sind vermutlich zum einen über die β -Oxidation abgebaut worden, zum anderen wurden ungesättigte freie Fettsäuren möglicherweise dem Lipoxygenaseweg zugeführt sodass der relative Anteil (% in der Fettphase) an Capryl-/Caprinsäure stieg. Die Aufnahme und Berechnung des Zuckerspektrums zeigte bei den Fungamyldotierten Proben im Vergleich zur Nullprobe einen leichten Anstieg des Fruktosegehaltes sowie einen starken Anstieg des Maltosegehaltes. Der Gesamtzuckergehalt war im Vergleich zur Nullprobe um etwa das Doppelte gestiegen, sodass der relative Maltoseanteil in der Nullprobe wie auch den Fungamyldotierten Proben gleich war. Bei den Lipasedotierten Broten konnte ein konzentrationsabhängiger Anstieg der Glukose- und Fruktosespiegel ermittelt werden, wo hingegen der Maltosegehalt etwa gleich blieb. Der deutliche Anstieg des Maltose- sowie Gesamtzuckergehaltes ist begründet, da das Hauptabbauprodukt der durch die technisch eingesetzte *alpha*-Amylase (Fungamyl) bei Anwesenheit von *beta*-Amylase (in Mehl natürlich vorhanden) katalysierten Stärkeumsetzung Maltose ist. Dieser Prozess des Stärkeabbaus führte zu einer erhöhten Zuckerfreisetzung, jedoch nicht zur Verschiebung des Zuckerspektrums. Der gemessene Anstieg des Glukose- und Fruktosegehaltes in den Lipasedotierten Broten deutet darauf hin, dass zusätzlich zur Lipase im technischen Enzym Lipase FE-01 auch stärkespaltende Enzyme vorhanden sind.

Sensorik

Im Zuge einer sensorischen Prüfung der gebackenen Produkte an drei verschiedenen Tagen wurde die Qualität der Brote im Bezug zur Haltbarkeit beobachtet und geprüft. Die sensorische Prüfung bestätigte die Erwartungen einer Verbesserung aller untersuchten Kriterien (Geruch, Geschmack, Form, Aussehen usw.) mit ansteigendem Fungamylgehalt. Das Brotvolumen wurde sowohl durch die katalytische Aktivität der *alpha*-Amylase und der Endo-1,4-Xylanase im Fungamyl stark verbessert und auch die Braunfärbung der Kruste durch die *alpha*-Amylase intensiviert, was letztlich zu einer deutlich besseren sensorischen Bewertung im Vergleich zum Nullbrot führte. Die konzentrationsabhängige positive sensorische Bewertung (erhöhtes Brotvolumen, geringe Härte, guter Frischeeindruck, usw.) der fungamyldotierten Brote belegt die Notwendigkeit technische Enzyme für eine gute und gleichbleibende Qualität einzusetzen. Die lipasedotierten Testmaterialien zeigten mangelhafte Ergebnisse und wurden als „nicht verzehrfähig“ eingestuft. Als Ursache dafür wird das verwendete Öl aus Capryl-/Caprinsäure als Backfett gesehen, was in Kombination mit der Lipase zur extremen Freisetzung freier Fettsäuren führte. Die im Zuge der β -Oxidation entstehenden kurzkettigen freien Fettsäuren sind häufig übelriechend und schlechtschmeckend (Ranzigkeit) und reduzieren die Qualität des Brotes maßgeblich. Ihre Reaktion mit Amylose zu Amylose-Lipid-Komplexen depletiert den Pool freier Fettsäuren jedoch. Bei der Umsetzung der Capryl-/Caprinsäure kam es weiterhin zu einem Überschuss ungesättigter freier Fettsäuren (Substrat für das endogen

vorkommende Enzym Lipoxygenase) und damit zur Bildung von Fettperoxiden, die für einen ranzigen Geschmack verantwortlich sind. Lipasen werden als Emulgator-Ersatz verwendet und gewinnen mehr und mehr an Bedeutung. Negative Auswirkungen einer Lipasedotierung sind aus der Literatur nicht bekannt. Wie gezeigt wurde, ist eine fachgerechte Verwendung der Lipase mit ausgewählten Fetten nötig, um gleichbleibend optimale Backprodukte zu erhalten. Weiterhin wäre ein Einfluss auf die Menge des Fettes denkbar, da die Lipase durch die Katalyse der Spaltung von zugesetztem Fett möglicherweise nicht mehr verfügbar ist um endogene Lipide im Mehl zu spalten. Für weiterführende Arbeiten wird empfohlen den Einfluss weiterer Fette, Fettgehalte, technischer Lipasen sowie Konzentrationsbereiche auf die Effektivität der technologischen Wirkung des Enzyms im Backprodukt zu testen.

Die Anwendungsspielräume technischer Enzyme im Rahmen des Bäckerhandwerkes wurden im Rahmen des durchgeführten Backversuchs belegt. Durch die Zuhilfenahme quantitativer Verfahren kann der Einsatz technischer Enzyme (z.B. schon während der Teigbereitung) begleitend kontrolliert und so Backprodukte konstant guter Qualität generiert werden. Weiterhin ist festzuhalten, dass der nachgewiesene Einfluss der Enzyme auf die Lagerdauer eine Restaktivität der Enzyme im gebackenen Produkt zeigt und damit ein Widerspruch zur gesetzlich festgeschriebenen Deklaration besteht.

4.2 Identifikation und Quantifizierung der technischen Enzyme Fungamyl, Lipase FE-01 und Amylase TXL

Wie unter 1.1.1 beschrieben, haben die Züchtungsstrategien der letzten Jahrzehnte den Fokus auf eine verbesserte Weizenqualität gerichtet. Dies führte genetisch bedingt zu einem Mangel an natürlichen endogenen Enzymen (z.B. Nebenwirkung der gezielten Verringerung der Vorerntekeimung). Durch den Einsatz technischer Enzyme in der Backindustrie konnten die züchtungsbedingten negativen Backeigenschaften ausgeglichen werden und konstante gute Backqualitäten für den Konsumenten geschaffen werden.

Am meisten betroffen ist hierbei die *alpha*-Amylase, die entscheidende Aufgaben während des Backprozesses hinsichtlich der Brotqualität erfüllt. Durch die späte Zugabe der technischen Enzyme während des Backprozesses ist es wahrscheinlich, dass Restbestandteile dieser im Endprodukt vorhanden sind. Dies wird vor allem dadurch bestätigt, dass die technologische Wirkung in Form von verlängerter Frischhaltung und Haltbarkeit noch nach dem Backen vorhanden ist. Das Ergebnis eines mittlerweile standardisierten Verfahrens ist eine bessere Haltbarkeit der Backwaren in Kombination mit einer reproduzierbaren Qualität. Die Backwaren können technologisch überwacht werden, um die gleiche Größe, Krustenbräunung und Haltbarkeit in jedem Erzeugnis zu erlangen. Der Einsatz technischer Enzyme im Backwarenereich wird stetig steigen. Die Notwendigkeit einer quantitativen Messmethodik, die technische Enzyme in gebackenen Produkten analysiert und Verbraucherschutz ermöglicht, ist gegeben und die Entwicklung einer solchen Methode stellte das zweite Hauptziel dieser Arbeit dar. Weiterhin kann ein quantitatives Verfahren genutzt werden um ein optimales Einsatz-Nutzen Verhältnis technischer Enzyme zu entwickeln und maximale Effekte mit minimalen Zusätzen möglich zu machen. Die in dieser Arbeit betrachteten technischen Enzymgemische Fungamyl, Amylase TXL und Lipase FE-01 wurden mit Hilfe von SDS-PAGE, In-Gel Verdau und MALDI-TOF-MS Messung analysiert und die enthaltenen Enzyme identifiziert. Es wurde gezeigt, dass Fungamyl aus 9,8 % *alpha*-Amylase (*Aspergillus oryzae*) und 5,2 % Endo-1,4-Xylanase (*Thermomyces lanuginosus*) sowie Lipase FE-01 aus der Lipase (*Thermomyces lanuginosus*) besteht. Die Amylase TXL

konnte ebenso als *alpha*-Amylase (*Aspergillus oryzae*) mittels LC-MS/MS und dem Nachweis von drei spezifischen Peptiden identifiziert werden.

Es wurde ein sensitives LC-MS/MS-Verfahren etabliert, welches die Analyse technischer Enzyme in Backwaren (Mehl, Brot, Kekse) in Konzentrationen im Spurenbereich (kleiner 10 mg/kg) in etwa 20 Minuten Messzeit erlaubt. Das entwickelte Verfahren des quantitativen Nachweises technischer Enzyme beinhaltet die chromatographische Trennung der Peptidgemische vor Eintritt in das Massenspektrometer und stellt eine Alternative zum bereits beschriebenen quantitativen DiGE-Verfahren dar. Mit den zuvor identifizierten Proteinsequenzen können Markerpeptide ausgewählt werden, deren MRM-Fragmente sensitiv mit MS/MS gemessen werden können. LC-basierte Methoden liefern eine große Komplexität was die Auswahl von Fließmittel und Säulen angeht und ermöglichen eine Anpassung an jegliche Komplexität biologischer Proben in Bezug auf die Löslichkeit der gesuchten Proteine bzw. Peptide. Unter Verwendung interner Standardproteine, welche den Verdau der Proteine kontrollieren und Matrixeffekte ausgleichen, sowie isotoopenmarkierter Peptidstandards für die einwandfreie Identifikation, wurde eine quantitative Bestimmung der genannten Proteine möglich. Die für die lineare Kalibrierung nötigen Peptidstandards wurden synthetisiert und in ansteigender Konzentration als Kalibrierreihe gemessen. Die Methode ist kosten- und zeiteffektiv.

Das quantitative Verfahren wurde im Zuge eines Validierungsverfahrens geprüft und ließ für die beiden Matrices Brot und Kekse keine analytischen Zweifel. Mit Standardabweichungen kleiner 10 % konnte die Genauigkeit und Reproduzierbarkeit der Methode bestätigt werden. Die Matrix Mehl zeigte für das Protein *alpha*-Amylase Wiederfindungsraten von mehr als 200 %. Die Werte wurden mit Hilfe weiterer Quantifizierungsverfahren (Matrix-Kalibrierung und Standardaddition) geprüft und bestätigt. Es wird von einer Matrixstörung ausgegangen, die explizit die Quantifizierung der *alpha*-Amylase in Mehl betrifft. Vermutet wird, dass Faktoren wie Phytinsäure, Trypsin-Inhibitoren, phenolische Verbindungen sowie sterische Hinderungen in der Matrix Mehl den tryptischen Verdau als Hauptschritt der Extraktion beeinflussen. Auch die Anwendung isotoopenmarkierter Peptidstandards für die Quantifizierung wurde geprüft, brachte jedoch geringere Wiederfindungsraten als mit der Quantifizierung über das Interne-Standard-Protein.

Der kritischste Faktor der entwickelten Methode scheint die Zuverlässigkeit des Trypsin-Verdau zu sein. Ein automatisierter Trypsinverdau wird empfohlen, um standardisierte Bedingungen zu schaffen. Verschiedene Publikationen empfehlen den Einsatz eines PCR-Thermocyclers um schrittweise durch Hitzeeinwirkung die Protein-Schnittstellen freizulegen und mit dem gleichzeitigen automatisierten Verdau zu verbinden [179]. Die Anwendung von Trypsin bzw. Chymotrypsin während des Proteinverdau wird durch *alpha*-Amylase-Trypsin-Inhibitoren beeinträchtigt, welche mit einem Anteil von etwa 4 % im Mehlprotein vorkommen [189, 171]. Zusätzlich können Lysine und Arginine während der Maillard-Reaktion eingebunden werden, sodass diese für den Verdau nicht mehr zur Verfügung stehen. Es muss beachtet werden, dass die genannten Inhibitoren im Mehl während des Backprozesses inaktiviert werden. Alternativ könnten andere Enzyme bzw. Zusätze (chemische Spaltung) für die proteolytische Spaltung eingesetzt werden. Insofern der In-Gel-Verdau eine Alternative für reproduzierbare Ergebnisse darstellt, sollte die direkte Kopplung der In-Gel-Verdau Extrakte mit LC-MS/MS in Betracht gezogen werden. Vorversuche dazu wurden bereits publiziert, zeigten aber Probleme vor allem in der Aufreinigung der entstehenden Proteinfragmente [192].

Eine weitere Schwierigkeit in der aufgestellten Analytik ist es, geeignete und ausreichend spezifische Peptide für die Quantifizierung der analysierten Enzyme zu finden, die sich im messbaren Bereich des Massenspektrometers befinden. Unter der Berücksichtigung eines solchen Ansatzes ist die Verwendung von mikrobiellen Proteasen, welche resistent gegen die endogenen Weizeninhibitoren sind, eine vielversprechende Alternative und muss geprüft werden. Weiterhin liegt die Hoffnung in der Bereitstellung reiner rekombinanter Proteasen, die im Zuge der Verdauung Peptide ausreichender Spezifität bilden. Als Beispiel wurde in ersten Versuchen der Einsatz von Lysarginase anstelle von Trypsin empfohlen, da u.a. eine bessere Sequenzspezifität sowie geringere missed-cleavage Raten zu verzeichnen sind [193].

Abschließend kann zusammengefasst werden, dass im Rahmen der Arbeit ein Zusammenhang zwischen Einsatz bzw. Nutzen technischer Enzyme und deren quantitativem Nachweis im Ausgangsmaterial (Mehl, Backmittel) sowie im gebackenen Produkt (Brot, Keks) hergestellt wurde. Es ist ein Konzept entwickelt worden, das für die Entwicklung neuer technischer Enzyme nutzbar ist, da der Hersteller sowohl die technologische Wirkung als auch die Reaktion dessen mit typischen Verarbeitungsmaterialien prüfen kann. Durch die quantitative Analyse können Teilschritte im Prozessablauf beobachtet und etwaige Verluste und verbundene Qualitätsmängel gezielt identifiziert werden. Die Entwicklung sowie der Einsatz technischer Enzyme kann optimiert werden um bestmögliche technologische Effekte zu erzielen und gleichzeitig verbrauchergerecht mit minimalen Zusatzmengen zu arbeiten. Als Anwendungsbeispiel ist die Zusammenarbeit mit einer Firma für Backentwicklung zu erwähnen. Diese hat die IGV GmbH beauftragt ein technisches Enzym in einem Backmittel zu identifizieren und in Mehl sowie gebackenen Produkten zu quantifizieren. Erfolgreich wurde eine maltogene Amylase (*Bacillus stearothermophilus*) identifiziert und das quantitative LC-MS/MS-Verfahren aufgebaut. Es wurden je zwei Mehle und Brote quantitativ analysiert und die Ergebnisse mit $\pm 50\%$ korrekt ermittelt. Die größere Abweichung wird vor allem auf die Herstellerangabe bezogen, die mit 2 % Anteil im Backmittel (Ursprungsmaterial) wahrscheinlich nicht genau genug war. Das Backmittel für die Testproben wurde nicht mit einer Feinwaage eingewogen, sodass sich der Fehler eventuell vervielfältigt hat. Zudem kann das Verfahren im Zuge eines Validierungsverfahrens weiter optimiert und eine Messunsicherheit kleiner 50 % angestrebt werden. Der Kunde konnte mit den Daten die Zubereitung der gebackenen Produkte verbessern und ein optimales Konzentration-Nutzen Verhältnis ermitteln.

Literaturverzeichnis

1. Ruttloff H. Industrielle Enzyme. Hamburg: Behr's Verlag, 1994
2. Kula M. Enzyme in der Technik. *Chemie in unserer Zeit* 1980; 61–70
3. Faltermaier A, Waters D, Becker T, Arendt E, Gastl M. Common wheat (*Triticum aestivum* L.) and its use as a brewing cereal - a review. *Journal of the Institute of Brewing* 2014; 120: 1–15
4. Backmittelinstitut e.V. Enzyme - Kleine Helfer für großartige Backergebnisse. www.wissensforum-backwaren.de/files/enzyme.pdf (letzter Zugriff am: 01.03.2016)
5. Tester RF, Karkalas J. The Effects of Environmental Conditions on the Structural Features and Physico-chemical Properties of Starches. *Starch/Stärke* 2001; 53: 513–519
6. Savin R, Nicolas ME. Effects of Short Periods of Drought and High Temperature on Grain Growth and Starch Accumulation of Two Malting Barley Cultivars. *Australian Journal of Plant Physiology* 1996; 23: 201–210
7. Belitz H, Grosch W, Schieberle P. *Lehrbuch der Lebensmittelchemie*. Berlin: Springer, 2001
8. Delcour JA, van Win H, Grobet PJ. Distribution and structural variation of arabinoxylans in common wheat mill streams. *Journal of agricultural and food chemistry* 1999; 47: 271–275
9. Mares DJ, Mrva K. Wheat grain preharvest sprouting and late maturity alpha-amylase. *Planta* 2014; 240: 1167–1178
10. Reybolds MP, BORLAUG NE. Impacts of breeding on international collaborative wheat improvement. *The Journal of Agricultural Science* 2006; 144: 3–17
11. Evers AD, Flintham J, Kotecha K. Alpha-amylase and grain-size in wheat. *Jornal of Cereal Science* 1995; 21: 1–3
12. Every D, Simmons L, Al-Hakkak J, Hawkins S, Ross M. Amylase, falling number, polysaccharide, protein and ash relationships in wheat millstreams. *Euphytica* 2002; 126: 135–142
13. Bae W, Lee SH, Yoo S, Lee S. Utilization of a maltotetraose-producing amylase as a whole wheat bread improver: dough rheology and baking performance. *Journal of food science* 2014; 79: 1535–1540
14. Durán E, León A, Barber B, Benedito de Barber C. Effect of low molecular weight dextrans on gelatinization and retrogradation of starch. *European Food Research and Technology* 2001; 212: 203–207
15. Leman P, Goesaert H, Delcour JA. Residual amylopectin structures of amylase-treated wheat starch slurries reflect amylase mode of action. *Food Hydrocolloids* 2009; 23: 153–164
16. Hulber R. *White Biotechnology*. Berlin: Springer, 2007
17. Lösche K. *Enzyme in der Lebensmitteltechnologie*. Hamburg: Behr's Verlag, 2000
18. Schaffarczyk M, Østdal H, Koehler P. Lipases in wheat breadmaking: analysis and functional effects of lipid reaction products. *Journal of agricultural and food chemistry* 2014; 62: 8229–8237
19. Schäfer T, Kirk O, Borchert T, et al. *Enzymes for Technical Applications*. Berlin: Wiley-VCH, 2005
20. Sahn H, Antranikian G, Stahmann K, Takors R. *Industrielle Mikrobiologie*. Berlin: Springer, 2013
21. Svensson B, Fukuda K, Nielsen PK, Bønsager BC. Proteinaceous alpha-amylase inhibitors. *Biochimica et biophysica acta* 2004; 1696: 145–156
22. Prandi B, Faccini A, Tedeschi T, Galaverna G, Sforza S. LC/MS analysis of proteolytic peptides in wheat extracts for determining the content of the allergen amylase/trypsin inhibitor CM3: influence of growing area and variety. *Food chemistry* 2013; 140: 141–146
23. Tatham AS, Shewry PR. Allergens to wheat and related cereals. *Clinical and experimental allergy: journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 2008; 38: 1712–1726
24. Pastorello EA, Farioli L, Conti A, et al. Wheat IgE-mediated food allergy in European patients: alpha-amylase inhibitors, lipid transfer proteins and low-molecular-weight glutenins. *Allergenic molecules recognized by double-blind, placebo-controlled food challenge. International archives of allergy and immunology* 2007; 144: 10–22
25. Narziss L, Back W. *Die Bierbrauerei*. Hoboken: Wiley-VCH, 2009

26. Hardie D. Control of carbohydrase formation by gibberellic acid in barley endosperm. *Phytochemistry* 1975; 14: 1719–1722
27. Grime KH, Briggs DE. The release of bound beta-amylase by macromolecules. *Journal of the Institute of Brewing* 1996; 102: 261–270
28. Schmitt MR, Marinac L. Beta-amylase degradation by serine endoproteinasen from green barley malt. *Journal of Cereal Science* 2008; 47: 480–488
29. Ziegler P. Cereal Beta-Amylases. *Journal of Cereal Science* 1999; 29: 195–204
30. Hara-Nishimura I, Nishimura M, Daussant J. Conversion of free alpha-amylase to bound beta-amylase on starch granules in the barley endosperm during desiccation phase of seed development. *Protoplasma* 1986; 134: 149–153
31. Sopanen T, Laurière C. Release and Activity of Bound beta-Amylase in a Germinating Barley Grain. *Plant physiology* 1989; 89: 244–249
32. Kim JH, Maeda T, Morita N. Effect of fungal α -amylase on the dough properties and bread quality of wheat flour substituted with polished flours. *Food Research International* 2006; 39: 117–126
33. Cauvain, Sp., Young, LS. *Technology of Breadmaking*. Berlin: Springer, 2007
34. A Caballero P, Gómez M, Rosell CM. Improvement of dough rheology, bread quality and bread shelf-life by enzymes combination. *Journal of food engineering* 2007; 81: 42–53
35. Hemalatha MS, Prasada Rao U, Leelavathi K, Salimath PV. Influence of amylases and xylanase on chemical, sensory, amylograph properties and microstructure of chapati. *LWT - Food Science and Technology* 2010; 43: 1394–1402
36. Stoica A, Hossu A, Barascu E, Iordan M, Maria M. Influence of the fungal alpha-amylase and glucose oxidase combinations on the physical properties of bread made from Weak White flours. *Revistadechimie* 2010; 61: 724–727
37. Han X, Gao J, Shang N, et al. Structural and functional analyses of catalytic domain of GH10 xylanase from *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* JW/SL-YS485. *Proteins* 2013; 81: 1256–1265
38. Paës G, Berrin J, Beaugrand J. GH11 xylanases: Structure/function/properties relationships and applications. *Biotechnology advances* 2012; 30: 564–592
39. Uhlig H, Linsmaier-Bednar EM. *Industrial enzymes and their applications*. New York: Wiley-VCH, 1998
40. Butt MS, Tahir-Nadeem M, Ahmad Z, Sultan MT. Xylanases and Their Applications in Baking Industry. *Food Technology and Biotechnology* 2008; 46: 22–31
41. Mannie E. Active enzymes. *Prepared Foods* 2000; 169: 63–68
42. Hilhorst R, Dunnewind B, Orsel R, et al. Baking Performance, Rheology, and Chemical Composition of Wheat Dough and Gluten Affected by Xylanase and Oxidative Enzymes. *Journal of food science* 1999; 64: 808–813
43. Jiang Z, Li X, Yang S, Li L, Tan S. Improvement of the breadmaking quality of wheat flour by the hyperthermophilic xylanase B from *Thermotoga maritima*. *Food Research International* 2005; 38: 37–43
44. Lindhauer, MG. Grundlagen der Weizen- und Roggenbackfähigkeit. www.agfdt.de/loads/ds10/lindback.pdf (letzter Zugriff am: 01.03.2016)
45. Si J. Synergistic effects of enzymes for breadmaking. *Cereal Foods World* 1997; 42: 802–803
46. Rittig F. *Lipopan F BG - unlocking the natural strengthening potential in dough*. Cambridge: Woodhead Publishing Limited, 2005
47. Gerits LR, Pareyt B, Decamps K, Delcour JA. Lipases and Their Functionality in the Production of Wheat-Based Food Systems. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 2014; 13: 978–989
48. Gerits LR, Pareyt B, Delcour JA. A lipase based approach for studying the role of wheat lipids in bread making. *Food chemistry* 2014; 156: 190–196
49. Enzyme - magische Proteine. *Brot und Backwaren* 2008; 57: 32–34
50. Verordnung (EG) Nr. 1332/2008, 16. Dezember/2008

51. Guidance Document on Criteria for Categorisation of Food Enzymes. www.ec.europa.eu/food/safety/docs/fs-improv-enzymes-guidance_doc_categorisation-decision_en.pdf (letzter Zugriff am: 01.03.2016)
52. Verordnung (EU) Nr. 1169/2011, 25. Oktober/2011
53. EUROPEAN COMMISSION. Food enzyme applications submitted to the Commission within the legal deadline (from 11 September 2011 to 11 March 2015). www.ec.europa.eu/food/safety/docs/fs_food-improvement-agents_enzymes-applications.pdf (letzter Zugriff am: 01.03.2016)
54. Grube, M. Rechtliche Einschätzung neuer Verfahren zur Dekontamination von Fleisch. www.bfr.bund.de/cm/343/rechtliche-einschaetzung-neuer-verfahren-zur-dekontamination-von-fleisch.pdf (letzter Zugriff am: 01.03.2016)
55. Sander I, Raulf-Heimsoth M, van Kampen V, Baur X. Is fungal alpha-amylase in bread an allergen? *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 2000; 30: 560–565
56. Smith TA. Preventing baker's asthma. *Occupational Medicine* 2004; 54: 21–27
57. Smith TA, Lumley KPS, Hui EHK. Allergy to flour and fungal amylase in bakery workers. *Occupational Medicine* 1997; 47: 21–24
58. Masthoff LJ, Hoff R, Verhoeckx KCM, et al. A systematic review of the effect of thermal processing on the allergenicity of tree nuts. *Allergy* 2013; 68: 983–993
59. Shefcheck KJ, Musser SM. Confirmation of the allergenic peanut protein, Ara h 1, in a model food matrix using liquid chromatography/tandem mass spectrometry (LC/MS/MS). *Journal of agricultural and food chemistry* 2004; 52: 2785–2790
60. Shefcheck KJ, Callahan JH, Musser SM. Confirmation of peanut protein using peptide markers in dark chocolate using liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). *Journal of agricultural and food chemistry* 2006; 54: 7953–7959
61. Kamath SD, Rahman AMA, Voskamp A, et al. Effect of heat processing on antibody reactivity to allergen variants and fragments of black tiger prawn: A comprehensive allergenomic approach. *Molecular nutrition & food research* 2014; 58: 1144–1155
62. Bu G, Luo Y, Chen F, Liu K, Zhu T. Milk processing as a tool to reduce cow's milk allergenicity: a mini-review. *Dairy science & technology* 2013; 93: 211–223
63. Cuadrado C, Cabanillas B, Pedrosa MM, et al. Influence of thermal processing on IgE reactivity to lentil and chickpea proteins. *Molecular nutrition & food research* 2009; 53: 1462–1468
64. Nowak-Wegrzyn A, Fiocchi A. Rare, medium, or well done? The effect of heating and food matrix on food protein allergenicity. *Current opinion in allergy and clinical immunology* 2009; 9: 234–237
65. Beyer K, Grishina G, Bardina L, Sampson HA. Identification of 2 new sesame seed allergens: Ses i 6 and Ses i 7. *The Journal of allergy and clinical immunology* 2007; 119: 1554–1556
66. Scharf A, Kasel U, Wichmann G, Besler M. Performance of ELISA and PCR methods for the determination of allergens in food: an evaluation of six years of proficiency testing for soy (*Glycine max* L.) and wheat gluten (*Triticum aestivum* L.). *Journal of agricultural and food chemistry* 2013; 61: 10261–10272
67. Röder M, Kleiner K, Sachs A, Keil N, Holzhauser T. Detectability of lupine seeds by ELISA and PCR may be strongly influenced by potential differences between cultivars. *Journal of agricultural and food chemistry* 2013; 61: 5936–5945
68. López-Calleja IM, La Cruz S de, Pegels N, González I, García T, Martín R. High resolution TaqMan real-time PCR approach to detect hazelnut DNA encoding for ITS rDNA in foods. *Food chemistry* 2013; 141: 1872–1880
69. Costa J, Mafra I, Kuchta T, Oliveira MBP. Single-tube nested real-time PCR as a new highly sensitive approach to trace hazelnut. *Journal of agricultural and food chemistry* 2012; 60: 8103–8110
70. Platteau C, Loose M de, Meulenaer B de, Taverniers I. Detection of allergenic ingredients using real-time PCR: a case study on hazelnut (*Corylus avellana*) and soy (*Glycine max*). *Journal of agricultural and food chemistry* 2011; 59: 10803–10814

71. Tasleem-Tahir A, Nadaud I, Chambon C, Branlard G. Expression profiling of starchy endosperm metabolic proteins at 21 stages of wheat grain development. *Journal of proteome research* 2012; 11: 2754–2773
72. Bonnot T, Bancel E, Chambon C, Boudet J, Branlard G, Martre P. Changes in the nuclear proteome of developing wheat (*Triticum aestivum* L.) grain. *Frontiers in plant science* 2015; 6: 905
73. Bancel E, Bonnot T, Davanture M, Branlard G, Zivy M, Martre P. Proteomic Approach to Identify Nuclear Proteins in Wheat Grain. *Journal of proteome research* 2015; 14: 4432–4439
74. Vensel WH, Tanaka CK, Cai N, Wong JH, Buchanan BB, Hurkman WJ. Developmental changes in the metabolic protein profiles of wheat endosperm. *Proteomics* 2005; 5: 1594–1611
75. Nadaud I, Girousse C, Debiton C, et al. Proteomic and morphological analysis of early stages of wheat grain development. *Proteomics* 2010; 10: 2901–2910
76. Lillienberg L, Baur X, Doekes G, et al. Comparison of four methods to assess fungal alpha-amylase in flour dust. *The Annals of occupational hygiene* 2000; 44: 427–433
77. Koets M, Sander I, Bogdanovic J, Doekes G, van Amerongen A. A rapid lateral flow immunoassay for the detection of fungal alpha-amylase at the workplace. *Journal of environmental monitoring* 2006; 8: 942–946
78. Uhr L, Buchholz T, Homann T, Huschek G, Rawel HM. Targeted proteomics-based analysis of technical enzymes from fungal origin in baked products. *Journal of Cereal Science* 2014; 60: 440–447
79. Oeljeklaus S, Meyer HE, Warscheid B. Advancements in plant proteomics using quantitative mass spectrometry. *Journal of proteomics* 2009; 72: 545–554
80. Aebersold R, Mann M. Mass spectrometry-based proteomics. *Nature* 2003; 422: 198–207
81. Ewles M, Goodwin L. Bioanalytical approaches to analyzing peptides and proteins by LC-MS/MS. *Bioanalysis* 2011; 3: 1379–1397
82. Higdon R, Hogan JM, van Belle G, Kolker E. Randomized sequence databases for tandem mass spectrometry peptide and protein identification. *Omics: a journal of integrative biology* 2005; 9: 364–379
83. Lock S. Gluten Detection and Speciation by Liquid Chromatography Mass Spectrometry (LC-MS/MS). *Foods* 2014; 3: 13–29
84. Heick J, Fischer M, Kerbach S, Tamm U, Popping B. Application of a liquid chromatography tandem mass spectrometry method for the simultaneous detection of seven allergenic foods in flour and bread and comparison of the method with commercially available ELISA test kits. *Journal of AOAC International* 2011; 94: 1060–1068
85. Hopfgartner G, Varesio E, Tschäppät V, Grivet C, Bourgoigne E, Leuthold LA. Triple quadrupole linear ion trap mass spectrometer for the analysis of small molecules and macromolecules. *Journal of mass spectrometry* 2004; 39: 845–855
86. Johnson PE, Baumgartner S, Aldick T, et al. Current perspectives and recommendations for the development of mass spectrometry methods for the determination of allergens in foods. *Journal of AOAC International* 2011; 94: 1026–1033
87. Crimmins DL, Mische SM, Denslow ND. Chemical cleavage of proteins in solution. *Current protocols in protein science* 2005; 41:11.4: 1–11
88. Swaney DL, Wenger CD, Coon JJ. Value of using multiple proteases for large-scale mass spectrometry-based proteomics. *Journal of proteome research* 2010; 9: 1323–1329
89. Olsen JV, Ong S, Mann M. Trypsin cleaves exclusively C-terminal to arginine and lysine residues. *Molecular & cellular proteomics* 2004; 3: 608–614
90. Rehm H, Letzel T. *Der Experimentator: Proteinbiochemie/Proteomics*. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag, 2010
91. Shevchenko A, Wilm M, Vorm O, Mann M. Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Analytical chemistry* 1996; 68: 850–858

92. Moravcová D, Kahle V, Rehulková H, Chmelík J, Rehulka P. Short monolithic columns for purification and fractionation of peptide samples for matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight/time-of-flight mass spectrometry analysis in proteomics. *Journal of chromatography A* 2009; 1216: 3629–3636
93. Takach, EJ, Wang, R, Zhu, Q, Hsieh, F, Campbell, JM, Vestal, ML. Drug characterization and metabolite identification using MALDI-TOF/TOF for accurate mass MS/MS analysis. www.biotech.iastate.edu/facilities/protein/seminars/ABI_ASMS_2002/thursday/295_thursday_takach.pdf (letzter Zugriff am: 01.03.2016)
94. Shapiro AL, Viñuela E, Maizel JV. Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels. *Biochemical and biophysical research communications* 1967; 28: 815–820
95. Schröder S. Dissertation: Präzision in der Gelelektrophorese für die Pharmazeutische Qualitätskontrolle: Technischen Universität Carolo-Wilhelmina Braunschweig, 2009
96. Lodish H. *Molecular cell biology*. New York: Freeman, 2002
97. Green MR, Sambrook J. *Molecular cloning*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2012
98. Gallagher S, Wiley E. *Current Protocols Essential Laboratory Techniques*. Hoboken: John Wiley & Sons, 2008
99. Rosenfeld J, Capdevielle J, Guillemot JC, Ferrara P. In-gel digestion of proteins for internal sequence analysis after one- or two-dimensional gel electrophoresis. *Analytical biochemistry* 1992; 203: 173–179
100. Jenö P, Mini T, Moes S, Hintermann E, Horst M. Internal sequences from proteins digested in polyacrylamide gels. *Analytical biochemistry* 1995; 224: 75–82
101. Granvogl, B. Entwicklung neuer Methoden zur massenspektrometrischen Charakterisierung von Membranproteinen. www.edoc.ub.uni-muenchen.de/8701/1/granvogl_bernhard.pdf (letzter Zugriff am: 01.03.2016)
102. Schmelzer C. Dissertation: Massenspektrometrische Charakterisierung von Proteinhydrolysaten: Verdaustudien an β -Casein und Strukturuntersuchungen an Elastin: Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, 2007
103. Lottspeich F, Engels JW. *Bioanalytik*. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag, 2009
104. Cotter RJ. Time-of-flight mass spectrometry for the structural analysis of biological molecules. *Analytical chemistry* 1992; 64: 1027–1039
105. Hoffmann E de, Stroobant V. *Mass spectrometry*. Chichester: Wiley-VCH, 2011
106. Hillenkamp F, Karas M, Beavis RC, Chait BT. Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of biopolymers. *Analytical chemistry* 1991; 63: 1193–1203
107. Kratzer RG. Dissertation: Entwicklung einer High-Throughput-Sequenzierungsmethode für die Proteomanalytik: Ludwig-Maximilians-Universität München, 2001
108. Mamyrin BA, Karataev VI, Shmikk DV, Zagulin VA. The mass-reflectron, a new nonmagnetic time-of-flight mass spectrometer with high resolution. *Pis'ma v Zhurnal Eksperimentalnoi i Teoreticheskoi Fiziki* 1973; 64: 82–89
109. Wiley W, McLaren IH. Time-of-Flight Mass Spectrometer with Improved Resolution. *The Review of Scientific Instruments* 1955; 26: 1150–1157
110. Brown RS, Lennon JJ. Mass Resolution Improvement by Incorporation of Pulsed Ion Extraction in a Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Linear Time-of-Flight Mass Spectrometer. *Analytical chemistry* 1995; 67: 1998–2003
111. Vestal ML, Juhasz P, Martin SA. Delayed extraction matrix-assisted laser desorption time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 1995; 9: 1044–1050
112. Wong JWH, Sullivan MJ, Cagney G. Computational methods for the comparative quantification of proteins in label-free LCn-MS experiments. *Briefings in bioinformatics* 2008; 9: 156–165
113. Yates JR. Mass spectrometry and the age of the proteome. *Journal of mass spectrometry* 1998; 33: 1–19
114. Heick J, Fischer M, Popping B. Influence of sample extraction solutions on the detection of wheat proteins by mass spectrometry. *Journal of AOAC International* 2012; 95: 388–393

115. Medzihradzky KF. In-solution digestion of proteins for mass spectrometry. *Methods in enzymology* 2005; 405: 50–65
116. Lock, S, Lane, C, Jackson, P, Serna, A. The Detection of Allergens in Bread and Pasta by Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. www.sciex.com/Documents/brochures/Allergens-QTRAP4k_1830610.pdf (letzter Zugriff am: 01.03.2016)
117. Gey MH. *Instrumentelle Analytik und Bioanalytik*. Berlin: Springer, 2015
118. Mørtz E, O'Connor PB, Roepstorff P, et al. Sequence tag identification of intact proteins by matching tandem mass spectral data against sequence data bases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1996; 93: 8264–8267
119. Kelleher NL, Lin HY, Valaskovic GA, Aaserud DJ, Fridriksson EK, McLafferty FW. Top Down versus Bottom Up Protein Characterization by Tandem High-Resolution Mass Spectrometry. *Journal of the American Chemical Society* 1999; 121: 806–812
120. Whitelegge J, Halgand F, Souda P, Zabrouskov V. Top-down mass spectrometry of integral membrane proteins. *Expert review of proteomics* 2006; 3: 585–596
121. Roepstorff P, Fohlman J. Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides. *Biomedical mass spectrometry* 1984; 11: 601
122. Biemann K. Mass spectrometry of peptides and proteins. *Annual review of biochemistry* 1992; 61: 977–1010
123. Mann M, Hendrickson RC, Pandey A. Analysis of proteins and proteomes by mass spectrometry. *Annual review of biochemistry* 2001; 70: 437–473
124. Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung. Leitfaden für die Entwicklung von BAM-Referenzmaterialien. www.bam.de/de/fachthemen/referenzmaterialien/referenzmaterialien_medien/bam_rm_leitfaden.pdf (letzter Zugriff am: 01.03.2016)
125. Bunkenborg, J, Stewart, I, Figeys, D, et al. Q Trap – a New Tool for Proteomic Research. www.protein.iastate.edu/seminars/ABI_ASMS_2002/thursday/031_thursday_bunkenborg.pdf (letzter Zugriff am: 01.03.2016)
126. Perkins DN, Pappin DJ, Creasy DM, Cottrell JS. Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis* 1999; 20: 3551–3567
127. Pappin D, Hojrup P, Bleasby AJ. Rapid identification of proteins by peptide-mass fingerprinting. *Current Biology* 1993; 3: 327–332
128. Trafkowski J. Dissertation: Anwendungen der HPLC-Triple Quadrupol Massenspektrometrie in der forensischen und klinischen Toxikologie bei der Analytik von Opioiden.: Rheinische Friedrich-Wilhelm-Universität Bonn, 2008
129. Schulze WX, Usadel B. Quantitation in mass-spectrometry-based proteomics. *Annual review of plant biology* 2010; 61: 491–516
130. Murad AM, Rech EL. NanoUPLC-MSE proteomic data assessment of soybean seeds using the Uniprot database. *BMC biotechnology* 2012; 12: 82
131. Kromidas S. *Handbuch Validierung in der Analytik*. Weinheim: Wiley-VCH, 2011
132. Peters FT, Drummer OH, Musshoff F. Validation of new methods. *Forensic science international* 2007; 165: 216–224
133. DAkKS. Validierung und Verifizierung von Prüfverfahren nach den Anforderungen der DIN EN ISO/IEC 17025 für Prüflaboratorien auf dem Gebiet der chemischen und chemisch-physikalischen Analytik im Bereich der Abteilung 4. www.dakks.de/sites/default/files/71_sd_4_019_validierung_20150114_v1.1_0.pdf (letzter Zugriff am: 01.03.2016)
134. Dr. Kromidas, S. *Methodenvalidierung in der Analytik*. www.kromidas.de/Uploads/Dokumente/ValidierunginderAnalytik.pdf (letzter Zugriff am: 01.03.2016)

135. International conference on harmonisation. Text on Validation of Analytical Procedures. ICH Q2A. www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1_Guideline.pdf (letzter Zugriff am: 02.03.2016)
136. International conference on harmonisation. Validation of Analytical Procedures: Methodology, ICH Q2B. www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidances/ucm073384.pdf (letzter Zugriff am: 02.03.2016)
137. International conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use. Validation of analytical procedures: Text and Methodology. www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1_Guideline.pdf (letzter Zugriff am: 01.03.2016)
138. Hack T. Dissertation: Entwicklung und Validierung von Analysenmethoden zur Gehalts- und Reinheitsprüfung von 17 β -Estradiol und Progesteron in Hormonemulsionen sowie Identifizierung und Strukturaufklärung der Verunreinigungen: Universität Ulm, 2013
139. DAkKS. Document No. SANCO/12495/2011: Method validation and quality control procedures for pesticides residues analysis in food and feed (2011). www.eurl-pesticides.eu/library/docs/allcrl/AqcGuidance_Sanco_2011_12495.pdf (letzter Zugriff am: 01.03.2016)
140. Eurachem. The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics: Second Edition (2014). www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/MV_guide_2nd_ed_EN.pdf (letzter Zugriff am: 01.03.2016)
141. Thompson M, Ellison SL, Wood R. Harmonized Guidelines For Single Laboratory Validation of Methods of Analyses (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry* 2002; 74: 835–855
142. Wellmitz, J, Gluschke, M. Leitlinie zur Methodvalidierung. www.umweltbundesamt.de/sites/default/files/medien/publikation/long/2832.pdf (letzter Zugriff am: 01.03.2016)
143. Ellison, SL, Rosslein, M, Williams, A. Eurachem/Citac Guide Ermittlung der Messunsicherheit bei analytischen Messungen. www.iswa.uni-stuttgart.de/ch/aqs/pdf/quam2000de_v2.pdf (letzter Zugriff am: 01.03.2016)
144. Barwick, VJ, Ellison, SL. VAM Project 3.2.1 Development and Harmonisation of Measurement Uncertainty Principles. www.blpd.dss.go.th/knowledge_el/VAM_uncertainty-0452.pdf (letzter Zugriff am: 01.03.2016)
145. Magnusson, B, Hovind, H, Krysell, M, Näykki, T. Nordtest handbook for calculation of measurement uncertainty based on quality control and method validation. www.prev.pt-conf.org/proceeding/05_Magnusson_UM_O_P0109.pdf (letzter Zugriff am: 01.03.2016)
146. Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung. BAM-Leitfaden zur Ermittlung von Messunsicherheiten bei quantitativen Prüfergebnissen. www.bam.de/de/service/publikationen/publikationen_medien/leitfaden_messunsicherheit.pdf (letzter Zugriff am: 01.03.2016)
147. Ali M, Homann T, Kreisel J, et al. Characterization and modeling of the interactions between coffee storage proteins and phenolic compounds. *Journal of agricultural and food chemistry* 2012; 60: 11601–11608
148. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227: 680–685
149. Ali M, Homann T, Khalil M, Kruse H, Rawel H. Milk whey protein modification by coffee-specific phenolics: effect on structural and functional properties. *Journal of agricultural and food chemistry* 2013; 61: 6911–6920
150. ISO Guide 34. General requirements for the competence of reference material producers. www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso:guide:34:ed-3:v1:en (letzter Zugriff am: 01.03.2016)
151. ISO Guide 35. Reference materials – General and statistical principles for certification. www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso:guide:35:ed-3:v1:en (letzter Zugriff am: 01.03.2016)
152. Cottrell JS. Protein identification using MS/MS data. *Journal of proteomics* 2011; 74: 1842–1851
153. Wilkins MR, Appel RD, Williams KL, Hochstrasser DF. *Proteome Research*. Berlin: Springer, 2007

154. Uhr L, Wieland P, Homann T, Huschek G, Rawel HM. Identification and LC-MS/MS-based analyses of technical enzymes in wheat flour and baked products. *European Food Research and Technology* 2016; 242: 247–257
155. Peters F, Hartung M, Herbold M, Schmitt G, Daldrup T, Musshoff F. Anlage zu den Richtlinien der GTFCh zur Qualitätssicherung bei forensisch-toxikologischen Untersuchungen, Anhang B: Anforderungen an die Validierung von Analysemethoden. *Toxichem Krimtech* 2009; 76: 185–208
156. Kromidas S, Kuss H. Chromatogramme richtig integrieren und bewerten. Weinheim: Wiley-VCH, 2008
157. Wilker H. Leitfaden zur Zuverlässigkeitsermittlung technischer Komponenten. Norderstedt: Books on Demand, 2010
158. D'Agostino RB. Goodness-of-fit techniques. New York: Dekker, 1986
159. Hartung J, Elpelt B, Klösener K. Statistik. München: R. Oldenbourg, 2005
160. Bortz J, Schuster C. Statistik für Human- und Sozialwissenschaftler. Berlin/Heidelberg: Springer, 2010
161. Heiss R. Lebensmitteltechnologie. Berlin: Springer, 2004
162. Mack, H. Grundlagen der Mikrobiologie und mikrobieller Verderb. www.agfdt.de/loads/ds10/mack.pdf (letzter Zugriff am: 01.03.2016)
163. Castello P, Jollet S, Potus J, Baret J, Nicolas J. Effect of Exogenous Lipase on Dough Lipids During Mixing of Wheat Flours. *Cereal Chemistry* 1998; 75: 595–601
164. Leenhardt F, Lyan B, Rock E, et al. Wheat lipoxygenase activity induces greater loss of carotenoids than vitamin E during breadmaking. *Journal of agricultural and food chemistry* 2006; 54: 1710–1715
165. Davidoff F, Korn ED. The Conversion of Long Chain Saturated Fatty Acids to Their α,β -Unsaturated, β,γ -Unsaturated, and β -Hydroxy Derivatives by Enzymes from the Cellular Slime Mold, *Dictyostelium discoideum*. *The Journal of Biological Chemistry* 1964; 239: 2496–2506
166. Maheshwari R, Bharadwaj G, Bhat MK. Thermophilic fungi: their physiology and enzymes. *Microbiology and molecular biology reviews* 2000; 64: 461–488
167. Büchner S. Dissertation: Bestimmung mikrobieller und gewebeeigener Lipasen mit dem Reflectoquant® Lipase – Test (Merck KGaA): Universität Leipzig, 2007
168. Montel MC, Masson F, Talon R. Bacterial role in flavour development. *Meat science* 1998; 49S1: 111–123
169. Delcour JA, Hosney RC. Principles of cereal science and technology. St. Paul: AACC International-Verlag, 2010
170. Ferranti P, Mamone G, Picariello G, Addeo F. Mass spectrometry analysis of gliadins in celiac disease. *Journal of mass spectrometry* 2007; 42: 1531–1548
171. Dupont FM, Vensel WH, Tanaka CK, Hurkman WJ, Altenbach SB. Deciphering the complexities of the wheat flour proteome using quantitative two-dimensional electrophoresis, three proteases and tandem mass spectrometry. *Proteome science* 2011; 9: 10
172. McNamara LE, Dalby MJ, Riehle MO, Burchmore R. Fluorescence two-dimensional difference gel electrophoresis for biomaterial applications. *Journal of the Royal Society* 2010; 7 Suppl 1: 107–118
173. Zdražnik T, Hollung K, Egge-Jacobsen W, Meglič V, Šuštar-Vozlič J. Differential proteomic analysis of drought stress response in leaves of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of proteomics* 2013; 78: 254–272
174. Becker JO, Hoofnagle AN. Replacing immunoassays with tryptic digestion-peptide immunoaffinity enrichment and LC-MS/MS. *Bioanalysis* 2012; 4: 281–290
175. Trauger SA, Webb W, Siuzdak G. Peptide and protein analysis with mass spectrometry. *Spectroscopy* 2002; 16: 15–28
176. Prasain J. Tandem Mass Spectrometry - Applications and Principles. Rijeka: InTech, 2012
177. European Commission Health & Consumer Protection Directorate-General. Guidance document on analytical quality control and validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed. www.ec.europa.eu/food/plant/pesticides/guidance_documents/docs/qualcontrol_en.pdf (letzter Zugriff am: 01.03.2016)

178. Monigatti F, Berndt P. Algorithm for accurate similarity measurements of peptide mass fingerprints and its application. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 2005; 16: 13–21
179. Turapov OA, Mukamolova GV, Bottrill AR, Pangburn MK. Digestion of native proteins for proteomics using a thermocycler. *Analytical chemistry* 2008; 80: 6093–6099
180. Taylor PJ. Matrix effects: the Achilles heel of quantitative high-performance liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry. *Clinical biochemistry* 2005; 38: 328–334
181. W. Brodacz. Elektrospray-Ionisation. Die „sprühende“ Verbindung zwischen LC und MS. *Chemiereport.at* Juni 2009; 4: 44–45
182. Stahnke H, Reemtsma T, Alder L. Compensation of matrix effects by postcolumn infusion of a monitor substance in multiresidue analysis with LC-MS/MS. *Analytical chemistry* 2009; 81: 2185–2192
183. Stüber M, Reemtsma T. Evaluation of three calibration methods to compensate matrix effects in environmental analysis with LC-ESI-MS. *Analytical and bioanalytical chemistry* 2004; 378: 910–916
184. Wu WW, Wang G, Baek SJ, Shen R. Comparative study of three proteomic quantitative methods, DIGE, cICAT, and iTRAQ, using 2D gel- or LC-MALDI TOF/TOF. *Journal of proteome research* 2006; 5: 651–658
185. Mirza SP, Olivier M. Methods and approaches for the comprehensive characterization and quantification of cellular proteomes using mass spectrometry. *Physiological genomics* 2008; 33: 3–11
186. Schmandke H. Dietary phytic acid lowers blood-glucose and serum-lipid levels. *Ernährungs-Umschau* 2007; 54: 254–257
187. Ertaş N, Türker S. Bulgur processes increase nutrition value: possible role in in-vitro protein digestability, phytic acid, trypsin inhibitor activity and mineral bioavailability. *Journal of food science and technology* 2014; 51: 1401–1405
188. Rohn S, Rawel HM, Kroll J. Inhibitory effects of plant phenols on the activity of selected enzymes. *Journal of agricultural and food chemistry* 2002; 50: 3566–3571
189. Altenbach SB, Vensel WH, Dupont FM. The spectrum of low molecular weight alpha-amylase/protease inhibitor genes expressed in the US bread wheat cultivar Butte 86. *BMC research notes* 2011; 4: 242
190. Mikola J, Kirsi M. Differences between Endospermal and Embryonal Trypsin Inhibitors in Barley, Wheat, and Rye. *Acta Chemica Scandinavica* 1972: 787–795
191. Odani S, Koide T, Ono T. Wheat germ trypsin inhibitors. Isolation and structural characterization of single-headed and double-headed inhibitors of the Bowman-Birk type. *Journal of biochemistry* 1986; 100: 975–983
192. Timperman AT, Aebersold R. Peptide electroextraction for direct coupling of in-gel digests with capillary LC-MS/MS for protein identification and sequencing. *Analytical chemistry* 2000; 72: 4115–4121
193. Huesgen PF, Lange PF, Rogers LD, et al. LysargiNase mirrors trypsin for protein C-terminal and methylation-site identification. *Nature methods* 2015; 12: 55–58

Abbildungsverzeichnis

| | |
|---|-----|
| Abbildung 1: Angriffspunkte der Stärke-abbauenden Enzyme | 16 |
| Abbildung 2: Angriffspunkt der Endo-1,4-Xylanase | 17 |
| Abbildung 3: Katalysierte Hydrolyse der Bindung zwischen Fettsäureestern und Glycerol | 18 |
| Abbildung 4: Hilfsschema zur Einteilung der technischen Enzyme im Lebensmittelrecht | 20 |
| Abbildung 5: Entstehung der Protein- und Peptidionen im MALDI-TOF-MS | 26 |
| Abbildung 6: Ionisationsprinzip der ESI..... | 29 |
| Abbildung 7: Elektrodenanordnung in einem Quadrupol-Massenanalysator | 29 |
| Abbildung 8: Schema der Bildung von Fragmentionen bei Peptiden | 31 |
| Abbildung 9: Enhanced resolution eines Molekülionenpeaks | 32 |
| Abbildung 10: Möglichkeiten der Massenaufnahme mit MS/MS [128] | 33 |
| Abbildung 11: Zusammenfassung der geforderten Parameter bei der Methodvalidierung | 34 |
| Abbildung 12: Übersicht der Extraktion mit Trypsin-Verdau über Nacht | 52 |
| Abbildung 13: Schema der eingesetzten Standards für die Quantifizierung | 54 |
| Abbildung 14: Peptid-Eingangskontrolle..... | 55 |
| Abbildung 15: Feuchteverlust der Testmaterialien in Bezug zu Tag 1 und Tag 3..... | 65 |
| Abbildung 16: Gemessene Härten während der TPA..... | 67 |
| Abbildung 17: Kraft-Kurven aus der TPA..... | 68 |
| Abbildung 18: Brotvolumen ermittelt nach der Raps-Verdrängungsmethode..... | 70 |
| Abbildung 19: Veränderung der Summe aus Capryl-/Caprinsäure mit Dotierung und Lagerdauer | 75 |
| Abbildung 20: Fettsäurespektrum der Brote abzüglich der Werte der Capryl-/Caprinsäure | 76 |
| Abbildung 21: Fettsäurespektrum der Brote, gebacken mit Erdnussöl | 77 |
| Abbildung 22: Zuckerspektrum an Tag 1..... | 78 |
| Abbildung 23: Gel-Abbildung der SDS-PAGE des technischen Enzyms Fungamyl | 81 |
| Abbildung 24: Massenspektrum von Fungamyl-Überstand (51,3 kDa) | 81 |
| Abbildung 25: Massenspektrum von Fungamyl-Überstand (24,8 kDa) | 82 |
| Abbildung 26: Proteinsequenz <i>alpha</i> -Amylase (<i>Aspergillus oryzae</i>)..... | 82 |
| Abbildung 27: Proteinsequenz Xylanase (<i>Thermomyces lanuginosus</i>) | 83 |
| Abbildung 28: Gel-Abbildung der SDS-PAGE des technischen Enzyms Lipase FE-01 | 84 |
| Abbildung 29: Massenspektrum von Lipase FE-01 (Probe 1)..... | 84 |
| Abbildung 30: Proteinsequenz Lipase (<i>Thermomyces lanuginosus</i>) | 85 |
| Abbildung 31: LC-MS/MS-Chromatogramm der <i>alpha</i> -Amylase in Amylase TXL | 86 |
| Abbildung 32: Querschnitte der gebackenen Brote..... | 88 |
| Abbildung 33: Ermittelte Konzentrationen Lipase FE-01 zur Homogenitätsprüfung..... | 89 |
| Abbildung 34: Identifikationsschema des qualitativen Nachweises technischer Enzyme in unbekanntem Proben..... | 90 |
| Abbildung 35: Theoretisch ermittelte Peptide des Enzyms <i>alpha</i> -Amylase | 91 |
| Abbildung 36: Darstellung der MRM-Übergänge von Lipase im Chromatogramm der LC-MS/MS-Messung | 92 |
| Abbildung 37: Chromatogramm der Fragmentionen der Markerpeptide | 94 |
| Abbildung 38: Darstellung der Retentionszeiten von Peptid und isotopenmarkiertem Peptid | 96 |
| Abbildung 39: Markerpeptide des Enzyms <i>alpha</i> -Amylase an der Bestimmungsgrenze..... | 97 |
| Abbildung 40: Markerpeptide des Enzyms Endo-1,4-Xylanase an der Bestimmungsgrenze..... | 98 |
| Abbildung 41: Markerpeptide des Enzyms Lipase an der Bestimmungsgrenze | 99 |
| Abbildung 42: Abgleich der Sequenz des Enzyms Lipase (<i>Thermomyces lanuginosus</i>) mit RSMH_CHLL7 | 102 |
| Abbildung 43: Abgleich der Sequenz der technischen <i>alpha</i> -Amylase (<i>Aspergillus oryzae</i>) mit der <i>alpha</i> -Amylase (<i>Triticum aestivum</i>) | 103 |
| Abbildung 44: Vergleich der linearen und quadratischen Regression im Fisher-Test | 107 |
| Abbildung 45: WFR der Endo-1,4-Xylanase nach Verdau über Nacht | 110 |

| | |
|---|-----|
| Abbildung 46: WFR der <i>alpha</i> -Amylase nach Verdau über Nacht | 110 |
| Abbildung 47: WFR der Lipase nach Verdau über Nacht | 111 |
| Abbildung 48: WFR der Endo-1,4-Xylanase nach Verdau mit Temperaturprogramm..... | 112 |
| Abbildung 49: WFR der <i>alpha</i> -Amylase nach Verdau mit Temperaturprogramm..... | 113 |
| Abbildung 50: WFR der Lipase nach Verdau mit Temperaturprogramm..... | 113 |
| Abbildung 51: WFR der Endo-1,4-Xylanase und <i>alpha</i> -Amylase in Mehl nach Quantifizierung mit Matrix-Kalibrierung | 115 |
| Abbildung 52: Kalibrierreihe für die Quantifizierung von <i>alpha</i> -Amylase in Mehl mit Standard-addition..... | 116 |
| Abbildung 53: WFR der Endo-1,4-Xylanase nach Quantifizierung mit isotopenmarkierten Peptidstandards.... | 117 |
| Abbildung 54: WFR der <i>alpha</i> -Amylase nach Quantifizierung mit isotopenmarkierten Peptidstandards | 118 |
| Abbildung 55: WFR der Lipase nach Quantifizierung mit isotopenmarkierten Peptidstandards | 118 |
| Abbildung 56: Quantifizierungsfile der <i>alpha</i> -Amylase | 122 |

Tabellenverzeichnis

| | |
|---|-----|
| Tabelle 1: Einsatzgebiete technischer Enzyme in der Industrie..... | 12 |
| Tabelle 2: Anwendung und Wirksamkeit technischer Enzyme in der Backwarenindustrie..... | 15 |
| Tabelle 3: Übersicht über Spaltungsmöglichkeiten beim Proteinverdau..... | 23 |
| Tabelle 4: Übersicht über Matrixsubstanzen für MALDI-TOF-MS..... | 25 |
| Tabelle 5: Zugefügte Standards zu Referenzmaterialien..... | 38 |
| Tabelle 6: Einwaage der Enzyme in Weizenmehl (Vormischung)..... | 39 |
| Tabelle 7: Rezeptur für Backware Brot..... | 39 |
| Tabelle 8: Verwendete Methoden für die Prüfung des mikrobiellen Status..... | 39 |
| Tabelle 9: Einstellungen der TPA-Messung..... | 40 |
| Tabelle 10: Einstellungen des MALDI-TOF-MS..... | 43 |
| Tabelle 11: Zugefügte Standards zu Referenzmaterialien..... | 44 |
| Tabelle 12: Berechnung der Ist-Konzentration aller Enzyme im Referenzmaterial Mehl..... | 46 |
| Tabelle 13: Ermittelte Endkonzentrationen der jeweiligen Enzyme im Referenzmaterial Mehl..... | 46 |
| Tabelle 14: Ermittelte Endkonzentrationen der jeweiligen Enzyme in Level 0-4 (Mehl)..... | 47 |
| Tabelle 15: Einwaage der Enzyme in Weizenmehl (Vormischung) für Referenzmaterial Brot..... | 47 |
| Tabelle 16: Rezeptur für Referenzmaterial Brot..... | 47 |
| Tabelle 17: Berechnung der Ist-Konzentration aller Enzyme im Referenzmaterial Brot..... | 48 |
| Tabelle 18: Ermittelte Endkonzentrationen der jeweiligen Enzyme in Probe 0-4 (Brot)..... | 48 |
| Tabelle 19: Berechnung der Ist-Konzentration aller Enzyme im Referenzmaterial Kekse..... | 49 |
| Tabelle 20: Ermittelte Endkonzentrationen der jeweiligen Enzyme im Referenzmaterial Kekse..... | 49 |
| Tabelle 21: Ermittelte Endkonzentrationen der jeweiligen Enzyme in Level 0-4 (Kekse)..... | 49 |
| Tabelle 22: Skyline - <i>Transition settings</i> | 50 |
| Tabelle 23: Gradientenprogramm der HPLC-Messung..... | 51 |
| Tabelle 24: Einstellungen für EPI Experiment..... | 51 |
| Tabelle 25: Mascot Einstellungen vor Spektren-Abgleich..... | 53 |
| Tabelle 26: Endkonzentrationen der jeweiligen technischen Enzyme in der Kalibrierreihe..... | 54 |
| Tabelle 27: Synthetische Peptidstandards (Markerpeptide)..... | 55 |
| Tabelle 28: Prüfung, Durchführung und zuvor festgelegte Kriterien der Validierung..... | 57 |
| Tabelle 29: Pipettierschema für die Kalibrierreihe..... | 58 |
| Tabelle 30: Ergebnisse der mikrobiellen Überprüfung aller Testmaterialien..... | 64 |
| Tabelle 31: a_w -Werte (Feuchtegehalte) der Testmaterialien..... | 65 |
| Tabelle 32: Darstellung der Porengröße einer mittleren Scheibe der Testmaterialien (Fungamyl)..... | 72 |
| Tabelle 33: Darstellung der Porengröße einer mittleren Scheibe der Testmaterialien (Lipase)..... | 73 |
| Tabelle 34: Ermittelte Gehalte der <i>alpha</i> -Amylase und Endo-1,4-Xylanase in Fungamyl..... | 87 |
| Tabelle 35: Ausgewählte Markerpeptide der Enzyme durch Messung positiver Testmaterialien..... | 93 |
| Tabelle 36: Übersicht der festgelegten Ionenverhältnisse der MRM-Massenübergänge..... | 100 |
| Tabelle 37: Ermittelte Schwankungen der Ionenverhältnisse der MRM-Massenübergänge..... | 100 |
| Tabelle 38: Übersicht der Ergebnisse des Datenbankabgleichs der Markerpeptide..... | 102 |
| Tabelle 39: Relative Standardabweichungen der Kalibrierreihe der Enzyme..... | 105 |
| Tabelle 40: Ergebnisse der Prüfung des Bestimmtheitsmaßes..... | 106 |
| Tabelle 41: Wiederholpräzision der Messmethode..... | 108 |
| Tabelle 42: Tagesverschiedene Laborpräzision der Messmethode (<i>alpha</i> -Amylase)..... | 108 |
| Tabelle 43: Nachweis- und Bestimmungsgrenzen der Enzyme..... | 120 |
| Tabelle 44: Vergleich der Peakflächen zur Prüfung der Spezifität der Messmethode..... | 121 |
| Tabelle 45: Ermittelte Messunsicherheiten je Matrix und Konzentrationslevel (Wiederholanalyse)..... | 123 |
| Tabelle 46: Ermittelte Messunsicherheiten je Matrix und Konzentrationslevel..... | 124 |

Anlage**A1 Lebenslauf**

Die Seite 142 (Lebenslauf) enthält persönliche Daten. Sie sind deshalb nicht Bestandteil der Online-Veröffentlichung.

A2 Veröffentlichungen der Dissertation

Publikationen

Uhr, L.; Buchholz, T.; Homann, T.; Huschek, G.; Rawel H. M.: Targeted proteomics-based analysis of technical enzymes from fungal origin in baked products. *Journal of Cereal Science*. 2014, 1-8

Uhr, L.; Wieland, P.: Den technischen Enzymen auf der Spur. *Food-Lab*. 2015, März 5-7.

Uhr, L.; Wieland, P.; Homann, T.; Huschek, G.; Rawel H. M.: Identification and LC-MS/MS based analyses of technical enzymes in wheat flour and baked products. *European Food Research and Technology*. 2015, September, 1-11

Tagungsbeiträge

Löwenstein, Y.; Uhr, L.; Bönick, J.; Wieland, P.: Multiparameter analysis for detection and quantification of proteins in cereal products via LC/MS/MS. 2015

Betreuung wissenschaftlicher Abschlussarbeiten

Teilaspekte der genannten Abschlussarbeiten wurden gemeinsam erarbeitet und für die vorliegende Dissertation verwendet.

Buchholz, T.: In-Gel-Verdau von ausgewählten Proteinen – Peptidanalyse mittels MALDI-TOF-MS und Proteinidentifikation. Institut für Ernährungswissenschaft der Universität Potsdam. 2011

Buchholz, T.: Entwicklung eines LC-MS/MS-Verfahrens zum Nachweis von Amylase und Xylanase in Fungamyl®. Institut für Ernährungswissenschaft der Universität Potsdam. 2013

Wieland, P.: Nachweis technischer Enzyme in Lebensmitteln mittels LC-MS/MS. Institut für Lebensmitteltechnologie und Lebensmittelchemie der Technischen Universität Berlin. 2014

Bönick, J.: Quantitative Bestimmung von Allergenen in Backwaren mittels HPLC-MS/MS. Institut für Ernährungswissenschaft der Universität Potsdam. 2014

A3 Auflistung verwendeter Chemikalien, Puffer, Lösungen sowie Geräte und Software

Tabelle A 1: Verwendete Chemikalien

| Chemikalie | Hersteller und Anschrift |
|---|--|
| 1,4-Dithiothreitol | Carl Roth GmbH, 76185 Karlsruhe, Germany |
| Acetonitril | Merck KGaA, 64293 Darmstadt, Germany |
| Acetonitril LC-MS grade | Avantor Performance Materials, Center Valley, PA 18034, U.S.A. |
| Acetonitril mit 0,1 % Ameisensäure, LC-MS/MS grade | Th. Geyer GmbH & Co. KG, 71272 Renningen, Germany |
| Acrylamid (2 x kristallisiert) | Serva Feinbiochemika GmbH u. Co, 6900 Heidelberg, Germany |
| Ameisensäure, konzentriert | Carl Roth GmbH, 76185 Karlsruhe, Germany |
| Ammoniumbicarbonat | Carl Roth GmbH, 76185 Karlsruhe, Germany |
| Ammoniumperoxodisulfat | Serva Feinbiochemika GmbH u. Co, 6900 Heidelberg, Germany |
| Ammoniumsulfat | Carl Roth GmbH, 76185 Karlsruhe, Germany |
| Coomassie brilliant blue G 250 | Serva Feinbiochemika GmbH u. Co, 6900 Heidelberg, Germany |
| Coomassie brilliant blue R 250 | Serva Feinbiochemika GmbH u. Co, 6900 Heidelberg, Germany |
| dest. Wasser mit 0,1 % Ameisensäure, LC-MS/MS grade | Th. Geyer GmbH & Co. KG, 71272 Renningen, Germany |
| Essigsäure, konzentriert | VWR Internation GmbH, 64295 Darmstadt, Germany |
| Glycerol | Carl Roth GmbH, 76185 Karlsruhe, Germany |
| Glycin | Carl Roth GmbH, 76185 Karlsruhe, Germany |
| Harnstoff | Carl Roth GmbH, 76185 Karlsruhe, Germany |
| Iodacetamid | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, 89555 Steinheim, Germany, |
| Isopropanol | Th. Geyer GmbH & Co. KG, 71272 Renningen, Germany |
| β -Mercaptoethanol | Carl Roth GmbH, 76185 Karlsruhe, Germany |
| Methanol | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, 89555 Steinheim, Germany |
| N, N'-Methylenbisacrylamid | Carl Roth GmbH, 76185 Karlsruhe, Germany |
| N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin | Serva Feinbiochemika GmbH u. Co, 6900 Heidelberg, Germany |
| Natriumdodecylsulfat | Serva Feinbiochemika GmbH u. Co, 6900 Heidelberg, Germany |
| o-Phosphorsäure, 85 % | Merck KGaA, 64293 Darmstadt, Germany |
| Salzsäure | Carl Roth GmbH, 76185 Karlsruhe, Germany |
| Trifluoressigsäure (TFA), 99 % extra pure | Acros Organics (Thermo Fisher Scientific), 2440 Geel, Belgium |
| Tris(hydroxymethyl)aminomethan | Fluka Chemie AG, 4002 Basel, Switzerland |
| Trypsin | Sigma-Aldrich, St. Louis, U.S.A |

Tabelle A 2: Verwendete Puffer und Lösungen

| Bezeichnung | Zusammensetzung |
|--|--|
| α -cyano-4-Hydroxycimtsäure-Lösung (HCCA) | 2 mg HCCA 30 μ l Acetonitril 70 μ l 1% TFA |
| Alkylation Buffer Arbeitslösung | 7 μ l Alkylation Buffer Stocklösung 28 μ l Digestion Buffer |
| Alkylation Buffer Stocklösung [5-fach] | 7 mg Iodacetamid (IAA) 70 μ l HPLC-Wasser |
| Ameisensäure [10 %] | 1 ml Ameisensäure 9 ml dest. Wasser |
| Anodenpuffer | 3,03 g Tris(hydroxymethyl)aminomethan mit 1 N HCl auf pH 8,9 einstellen in 1000 ml dest. Wasser |
| Destaining Solution | 80 mg Ammoniumbicarbonat 20 ml Acetonitril 20 ml HPLC-Wasser |
| Digestion Buffer | 10 mg Ammoniumbicarbonat 5 ml HPLC-Wasser |
| Entfärbelösung | 200 ml konzentrierte Essigsäure 1800 ml dest. Wasser |
| Essigsäure in dest. Wasser [10 % (v/v)] | 250 ml konzentrierte Essigsäure 2250 ml dest. Wasser |
| Extraktionspuffer [In-Lösung-Verdau] | 7,9 g Ammoniumbicarbonat 240 g Harnstoff 0,78 g DTT 1000 ml dest. Wasser |
| Färbelösung | 2 l 10 % (v/v) Essigsäure in dest. Wasser 1 PhastGel Tablette (Coomassie brilliant blue als Farbstoff) |
| Färbelösung (colloidal) | Lösung 1: 8 g Ammoniumsulfat, 76,8 ml dest. Wasser und 1,6 ml Phosphorsäure |
| | Lösung 2: 0,5 g Coomassie brilliant blue G 250 und 9,5 ml dest. Wasser |
| | Lösung 1 + 1,6 ml Lösung 2 mischen (24 Stunden vorher ansetzen) 20 ml Methanol frisch zugeben |
| Iodacetamid [0,5 M] | 23,1 mg Iodacetamid 250 μ l dest. Wasser |
| Kathodenpuffer | 3,03 g Tris(hydroxymethyl)aminomethan 14,4 g Glycin 1,0 g Natriumdodecylsulfat in 1000 ml dest. Wasser |
| Kolbenspülung [HPLC] | 50 ml Isopropanol 950 ml dest. Wasser |
| Lösung A [Gelelektrophorese] | 30 g Acrylamid 0,8 g N, N'-Methylenbisacrylamid in 100 ml dest. Wasser |
| Lösung B [Gelelektrophorese] | 18,15 g Tris(hydroxymethyl)aminomethan mit 6 N HCl auf pH 8,8 einstellen in 100 ml dest. Wasser |
| Lösung C [Gelelektrophorese] | 10 g Natriumdodecylsulfat in 100 ml dest. Wasser |

| Bezeichnung | Zusammensetzung | |
|---|--|------|
| Lösung D [Gelelektrophorese] | 10 % (v/v) N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamine (TEMED) in dest. Wasser | |
| Lösung E [Gelelektrophorese] | 10 % (w/v) Ammoniumperoxodisulfat in dest. Wasser | |
| Lösung F [Gelelektrophorese] | 6,06 g Tris(hydroxymethyl)aminomethan 0,4 g Natriumdodecylsulfat mit 6 N HCl auf pH 6,8 einstellen in 100 ml dest. Wasser | |
| Polyacrylamid-Gel | | |
| Trenngel (T = 12 %) | Lösung A | 6,00 |
| Angaben in ml | Lösung B | 3,75 |
| | Dest. Wasser | 5,00 |
| | Lösung C | 0,08 |
| | Lösung D | 0,08 |
| | Lösung E | 0,08 |
| Sammelgel (T = 5 %) | Lösung A | 1,25 |
| Angaben in ml | Dest. Wasser | 2,90 |
| | Lösung D | 0,85 |
| | Lösung E | 0,05 |
| | Lösung F | 0,05 |
| Probenpuffer | 4,0 g Natriumdodecylsulfat 12,0 g Glycerol 0,61 g Tris(hydroxymethyl)aminomethan 5,0 g β -Mercaptoethanol 0,01 g Coomassie brilliant blue R 250 in 100 ml dest. Wasser | |
| Puffer A (SPE) | 100 ml dest. Wasser 100 ml Acetonitril 200 μ l Ameisensäure | |
| Puffer B (SPE) | 200 ml dest. Wasser 200 μ l Ameisensäure | |
| Reducing Buffer | 7,15 mg Tris-(2-carboxyethyl)phosphine, Hydrochloride (TCEP) 500 μ l Digestion Buffer | |
| TFA 0,1 % (v/v) | 10 μ l Trifluoressigsäure (TFA), 99 % extra pure 9990 μ l dest. Wasser | |
| Trypsin, aktiviert [In-Gel Verdau] | 1 μ l Trypsin Working Solution 9 μ l Digestion Buffer | |
| Trypsin, aktiviert [In-Lösung-Verdau] | 2 mg Trypsin 2 ml dest. Wasser | |
| Trypsin Stocklösung [In-Gel Verdau] | 10 μ g modifiziertes Trypsin 10 μ l Trypsin Storage Solution | |
| Trypsin Storage Solution [In-Gel Verdau] | 85 μ l 37 % (v/v) HCl 915 μ l HPLC-Wasser | |
| Trypsin Working Solution [In-Gel Verdau] | 5 μ l Trypsin Stocklösung 45 μ l HPLC-Wasser | |
| Verdaupuffer [In-Lösung-Verdau] | 65 g Ammoniumbicarbonat 3 ml ACN | |

Tabelle A 3: Verwendete Geräte

| Methoden | Bezeichnung | Hersteller und Anschrift |
|-----------------------------------|--|---|
| Technologische Wirkung | Oberschalenwaage | Mettler-Toledo GmbH, Germany |
| | Feinwaage | Mettler-Toledo GmbH, Germany |
| | Teigknetter | Oase GmbH, Germany |
| | Backofen | Wachtel GmbH, Germany |
| | Trockenschrank | Thermo Fisher Scientific, USA |
| | Thermomix | Vorwerk Deutschland Stiftung & Co. KG, Germany |
| | Volumenmessgerät | Ing. Stefan Kastenmüller GmbH Martinsried, Germany |
| | Texturanalyser TA-XT2i | Stable Micro Systems Ltd., Godalming, Surrey, UK |
| | Sartorius MA30, Moisture Analyzer | Sartorius Weighing Technology GmbH, Göttingen |
| | Gaschromatograph-Flammenionisationsdetektor GC-FID | Hp Hewlett Packard, Palo Alto, USA |
| DIONEX-Ionenchromatograph ICS5000 | Dionex Corporation, Sunnyvale, USA | |
| Identifikation | Zentrifuge | Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany |
| | Vortexer | |
| | Pipetten | |
| | MALDI-TOF-MS: AUTOFLEX-III | |
| | LRF200-CID mit Smartbeam-Laser 200 | |
| Quantifizierung über BSA | Zentrifuge Galaxy mini | VWR, Darmstadt, Germany |
| | Vortexer | NeoLab, Heidelberg, Germany |
| | Bio-RAD Scanner | Bio-RAD Laboratories GmbH, München, Germany |
| Herstellung von Referenzmaterial | Oberschalenwaage | Mettler-Toledo GmbH, Germany |
| | Feinwaage | Mettler-Toledo GmbH, Germany |
| | Teigknetter | Oase GmbH, Germany |
| | Backofen | Wachtel GmbH, Germany |
| | Trockenschrank | Thermo Fisher Scientific, USA |
| | Thermomix | Vorwerk Deutschland Stiftung & Co. KG, Germany |
| Quantifizierung mit LC-MS/MS | Mikrozentrifuge 5430 | Eppendorf AG, Hamburg, Germany |
| | Multi-Rotator RS-60 | Bio San, Riga, Latvia |
| | Thermoshaker TS-100 | Bio San, Riga, Latvia |
| | Vakuumpumpe Laboport | KNF Neuberger GmbH, Freiburg, Germany |
| | Stickstoffgenerator | cmc® instruments, Eschborn, Germany |
| | Kolbenhubpipette 2-10 µl | Eppendorf AG, Hamburg, Germany |
| | Kolbenhubpipette 10-100 µl | Eppendorf AG, Hamburg, Germany |
| | Kolbenhubpipette 100-1000 µl | Eppendorf AG, Hamburg, Germany |
| | UltiMate 3000 BioRS System | ThermoFisher Scientific, Geel, Belgium |
| | QTRAP® 5500 System | SCIEX Germany GmbH, Darmstadt, Germany |
| | Sonorex TK30 | BANDELIN electronic GmbH & Co. KG, Berlin, Germany |

Tabelle A 4: Verwendete Software

| Methode | Bezeichnung | Hersteller |
|------------------------------|-------------------------------------|---|
| Identifikation | BrukerDaltonicsBioTools Version 3.2 | BrukerDaltonik GmbH, Bremen, Germany |
| | Bruker DaltonicsFlexAnalysis | BrukerDaltonik GmbH, Bremen, Germany |
| | Mascot 1.6b27 | Matrix Science, London, UK |
| Quantifizierung über BSA | ImageLab (Vers. 3.0) | Bio-RAD Laboratories GmbH, München, Germany |
| Quantifizierung mit LC-MS/MS | Analyst 1.6.1 | SCIEX Germany GmbH, Darmstadt, Germany |
| | Skyline 2.1.0.4936 | University of Washington |
| | Mascot 1.6b27 | Matrix Science, London, UK |

A4 Daten zur technologischen Wirkung technischer Enzyme

Tabelle A 5: Detailliertes Arbeitsschema zur Fettsäureanalytik

Die Fettsäureanalytik wurde in 3 Schritte unterteilt: 1. Fettgewinnung aus der Backware, 2. Extraktion der Fettsäuren aus dem gewonnenen Fett, 3. Messung der Fettsäuren im Extrakt mittels GC-FID

| | |
|----------------------------------|---|
| Fettgewinnung | <ul style="list-style-type: none"> • Einwaage von 5-30 g Lebensmittel (je nach Fettgehalt) • Zugabe von 100 ml Wasser • Zugabe von 60 ml 37 % Salzsäure • Erhitzen der Probe nach Zugabe des Siedesteinchen für 35 min • Verdünnung der Probe mit 100 ml heißem Wasser • Filtration der heißen Aufschlussflüssigkeit durch Faltenfilter • Waschen des Filtrerrückstand mit heißem Wasser bis zur Säurefreiheit • Trocknung des gefalteten Filters für 4-6 h bei 103 ± 2 °C • Soxhlet-Extraktion des Filterpapiers mit Petrolether |
| Extraktion der Fettsäuren | <ul style="list-style-type: none"> • Lösen von 3-4 Tropfen des gewonnenen Fettes in 10 ml Heptan • Verseifung mit 500 µl methanolischer Kaliumhydroxid-Lösung (KOH) • Zugabe von Natriumsulfat zum glycerinfreien Überstand • Verdünnung von 500 µl des Überstandes mit 1 ml Heptan |
| GC-FID-Messung | <ul style="list-style-type: none"> • Kapillarsäule DB-WAX • Temperaturprogramm: 100°C, 5°C / 190°C / 14min, 5°C / 250°C / 20min • Detektor: 250°C • Injektor: 250 °C • Trägergas: 0,95 ml/min • Wasserstoff: 30,0 ml/min • Luft: 300 ml/min • Make up: 28,6 ml/min • Split: 24,0 ml/min • Purge: 1,3 ml/min • Inj. Vol: 1 µl |

Tabelle A 6: Detailliertes Arbeitsschema zur Zuckeranalytik

Die Zuckeranalytik wurde in 3 Schritte unterteilt: 1. Extraktion der Zucker aus der Backware, 2. Messung der Zucker mit HPLC, 3. Qualitative und quantitative Auswertung der Chromatogramme

| | |
|---|---|
| Extraktion der Zucker | <ul style="list-style-type: none"> • Einwaage von 1 g Lebensmittel in 100 ml-Weithalskolben • Zugabe von 70-80 ml demineralisiertem Wasser • Proben für 30 min im Ultraschallbad erhitzen (60 °C) • Filtration der Proben • Verdünnung der Proben mit demineralisiertem Wasser (1:250) |
| HPLC-Messung | <ul style="list-style-type: none"> • Ionenaustauschsäule CarboPac PA20 (3x150 mm) • HPLC-Programm: isokratisch (32,5 % 200 mM Natronlauge und 67,5 % bidestilliertes Wasser) • Fluss: 0,4 ml/min • Inj. Vol: 25 µl • Säulentemperatur: 30 °C • Autosampler-Temperatur: 4 °C • Detektion: integrierte gepulste Amperometrie, Goldelektrode • Wafeform: Gold standard PAD • Ref. Elektrode: AgCl |
| Zucker-Identifikation und -Quantifizierung | <ul style="list-style-type: none"> • Elutionsreihenfolge der Zucker: Glukose, Fruktose, Saccharose, Laktose, Maltose • Kalibrierung Mischstandard der 5 Zucker: 5 Konzentrationslevel (1 / 2,5 / 5 / 7,5 / 10 µg/ml) |

Tabelle A 7: Einzelwerte der Schnellfeuchtebestimmung sowie berechneter Feuchteverlust [%]

Die Messwerte der Schnellfeuchtebestimmung wurden genutzt um den Feuchteverlust [%] zu berechnen. Hierbei wurde sowohl der Feuchteverlust von Tag 3 und Tag 7 in Bezug zu Tag 1 als auch der Feuchteverlust von Tag 7 zu Tag 3 ermittelt; N=2; MW: Mittelwert; FV: Feuchteverlust

| Feuchte bzw. FV [%] | Nullprobe | 3,92 mg/kg Fungamyl | 9,80 mg/kg Fungamyl | 0,72 mg/kg Lipase FE-01 | 1,80 mg/kg Lipase FE-01 |
|-----------------------------------|------------|------------------------|------------------------|----------------------------|----------------------------|
| Tag 1.1 | 41,8 | 41,8 | 40,6 | 40,4 | 40,6 |
| Tag 1.2 | 42,4 | 41,9 | 40,9 | 41,0 | 41,5 |
| MW Tag 1 | 42,1 | 41,9 | 40,8 | 40,7 | 41,1 |
| Tag 3.1 | 42,2 | 41,5 | 40,9 | 40,8 | 39,4 |
| Tag 3.2 | 42,2 | 41,8 | 40,2 | 40,3 | 39,8 |
| MW Tag 3 | 42,2 | 41,7 | 40,6 | 40,6 | 39,6 |
| FV Tag 3 in Bezug zu Tag 1 | 0,0 | 0,5 | 0,5 | 0,4 | 3,5 |
| Tag 7.1 | 40,6 | 41,0 | 39,4 | 39,5 | 38,4 |
| Tag 7.2 | 40,8 | 38,7 | 39,3 | 40,2 | 37,9 |
| MW Tag 7 | 40,7 | 39,9 | 39,4 | 39,9 | 38,2 |
| FV Tag 7 in Bezug zu Tag 1 | 3,3 | 4,8 | 3,4 | 2,1 | 7,1 |
| FV Tag 7 in Bezug zu Tag 3 | 3,6 | 4,3 | 3,0 | 1,7 | 3,7 |

Tabelle A 8: Einzelwerte der TPA-Messung ausgedrückt als Härte [g]

N=8, je 4 Scheiben à Vorder- und Rückseite

| Nullprobe | | | | | | | | |
|---------------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| Tag 1 | 1481,45 | 1660,46 | 1722,40 | 1781,05 | 1354,69 | 1327,79 | 1285,80 | 1354,14 |
| Tag 3 | 2593,86 | 2398,65 | 2369,33 | 2013,95 | 2065,21 | 2548,56 | 2660,22 | 2537,64 |
| Tag 7 | 2001,06 | 2109,74 | 2022,33 | 2248,74 | 1845,53 | 2043,61 | 1934,59 | 1785,23 |
| Fungamyl 3,92 mg/kg | | | | | | | | |
| Tag 1 | 652,10 | 708,54 | 731,58 | 763,21 | 783,16 | 825,05 | 829,24 | 839,38 |
| Tag 3 | 652,10 | 708,54 | 731,58 | 763,21 | 783,16 | 825,05 | 829,24 | 839,38 |
| Tag 7 | 1081,88 | 1046,60 | 1046,38 | 938,03 | 1023,79 | 1051,56 | 1086,51 | 1014,64 |
| Fungamyl 9,80 mg/kg | | | | | | | | |
| Tag 1 | 713,06 | 683,96 | 607,02 | 595,89 | 651,99 | 710,19 | 698,84 | 621,68 |
| Tag 3 | 794,52 | 892,18 | 916,54 | 967,79 | 837,39 | 882,81 | 905,18 | 951,04 |
| Tag 7 | 1152,64 | 1147,24 | 1128,50 | 1201,91 | 1232,45 | 1099,40 | 1005,27 | 1060,49 |
| Lipase 0,72 mg/kg | | | | | | | | |
| Tag 1 | 5578,25 | 5677,01 | 5578,47 | 5484,01 | 6331,32 | 7229,78 | 6133,02 | 5830,45 |
| Tag 3 | 4303,70 | 4188,62 | 3978,42 | 3830,71 | 4065,94 | 4364,98 | 4795,31 | 4250,57 |
| Tag 7 | 3068,61 | 3581,71 | 3533,76 | 4151,69 | 3350,12 | 3772,84 | 3436,32 | 3866,87 |

Tabelle A 9: Ergebnisse der Volumenbestimmung [ml]

N=2

| Volumen [ml] | Nullprobe | 3,92 mg/kg Fungamyl | 9,80 mg/kg Fungamyl | 0,72 mg/kg Lipase FE-01 | 1,80 mg/kg Lipase FE-01 |
|----------------|-----------|------------------------|------------------------|----------------------------|----------------------------|
| Brot 1 | 1600 | 1900 | 1980 | 1400 | 660 |
| Brot 2 | 1400 | 1980 | 2000 | 1340 | |
| MW Brot | 1500 | 1940 | 1990 | 1370 | 660 |

Tabelle A 10: Ergebnisse der Fettsäureanalytik an Tag 1, Tag 3 und Tag 7

N=3; MW: Mittelwert; SD: Standardabweichung; es wurden keine Ausreißer ermittelt (Dean & Dixon-Test)

| Tag 1 | Nullprobe | 3,92 mg/kg Fungamyl | 9,80 mg/kg Fungamyl | 0,72 mg/kg Lipase FE-01 | 1,80 mg/kg Lipase FE-01 |
|-------------------------------------|-----------|------------------------|------------------------|----------------------------|----------------------------|
| gesättigte FS [%] | 91,05 | 92,91 | 95,05 | 91,12 | 71,89 |
| | 91,43 | 91,48 | 94,41 | 90,17 | 69,82 |
| | 91,62 | 91,52 | 94,56 | 90,30 | 70,56 |
| MW | 91,37 | 91,97 | 94,67 | 90,53 | 70,76 |
| SD | 0,29 | 0,81 | 0,33 | 0,52 | 1,05 |
| einfach ungesättigte FS [%] | 3,84 | 3,64 | 3,54 | 4,96 | 13,16 |
| | 3,74 | 4,16 | 3,80 | 5,34 | 13,80 |
| | 3,67 | 4,18 | 3,72 | 5,29 | 13,43 |
| MW | 3,75 | 3,99 | 3,69 | 5,20 | 13,46 |
| SD | 0,09 | 0,31 | 0,13 | 0,21 | 0,32 |
| mehrfach ungesättigte FS [%] | 5,10 | 3,45 | 1,40 | 3,92 | 14,95 |
| | 4,82 | 4,35 | 1,79 | 4,50 | 16,38 |
| | 4,70 | 4,31 | 1,72 | 4,41 | 16,01 |
| MW | 4,87 | 4,04 | 1,64 | 4,28 | 15,78 |
| SD | 0,21 | 0,51 | 0,21 | 0,31 | 0,74 |

| Tag 3 | | | | | |
|-------------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | 92,93 | 91,09 | 92,03 | 89,92 | 83,71 |
| gesättigte FS [%] | 92,16 | 90,20 | 91,43 | 89,44 | 82,38 |
| | 93,34 | 90,39 | 91,54 | 89,65 | 81,94 |
| MW | 92,81 | 90,56 | 91,67 | 89,67 | 82,68 |
| SD | 0,60 | 0,47 | 0,32 | 0,24 | 0,92 |
| | 3,68 | 3,36 | 3,96 | 6,68 | 7,07 |
| einfach ungesättigte FS [%] | 3,93 | 3,86 | 4,22 | 6,82 | 7,75 |
| | 3,45 | 3,77 | 4,28 | 6,71 | 7,96 |
| MW | 3,69 | 3,66 | 4,15 | 6,74 | 7,59 |
| SD | 0,24 | 0,27 | 0,17 | 0,07 | 0,47 |
| | 3,39 | 5,54 | 4,00 | 3,40 | 9,21 |
| mehrfach ungesättigte FS [%] | 3,90 | 5,93 | 4,34 | 3,75 | 9,88 |
| | 3,22 | 5,87 | 4,71 | 3,58 | 10,10 |
| MW | 3,50 | 5,78 | 4,35 | 3,58 | 9,73 |
| SD | 0,35 | 0,21 | 0,36 | 0,18 | 0,46 |
| Tag 7 | | | | | |
| | 92,27 | 95,61 | 91,88 | 92,57 | 90,38 |
| gesättigte FS [%] | 92,13 | 95,14 | 91,25 | 92,22 | 90,49 |
| | 93,24 | 95,79 | 92,30 | 93,11 | 91,43 |
| MW | 92,55 | 95,51 | 91,81 | 92,63 | 90,77 |
| SD | 0,60 | 0,34 | 0,53 | 0,45 | 0,58 |
| | 4,15 | 3,31 | 5,11 | 5,06 | 8,30 |
| einfach ungesättigte FS [%] | 4,21 | 3,64 | 5,46 | 5,28 | 8,41 |
| | 3,71 | 3,22 | 4,86 | 4,80 | 7,64 |
| MW | 4,02 | 3,39 | 5,14 | 5,05 | 8,12 |
| SD | 0,27 | 0,22 | 0,30 | 0,24 | 0,42 |
| | 3,57 | 1,06 | 3,00 | 2,38 | 1,32 |
| mehrfach ungesättigte FS [%] | 3,64 | 1,22 | 3,30 | 2,49 | 1,10 |
| | 3,05 | 0,99 | 2,84 | 2,10 | 0,93 |
| MW | 3,42 | 1,09 | 3,05 | 2,32 | 1,12 |
| SD | 0,32 | 0,12 | 0,23 | 0,20 | 0,20 |

Tabelle A 11: Ergebnisse der Fettsäureanalytik der Brote mit Erdnussöl

N=3; MW: Mittelwert; SD: Standardabweichung; es wurden keine Ausreißer ermittelt (Dean & Dixon-Test)

| | Nullprobe | 3,92 mg/kg Fungamyl | 9,80 mg/kg Fungamyl | 0,72 mg/kg Lipase FE-01 | 1,80 mg/kg Lipase FE-01 |
|-------------------------------------|-----------|------------------------|------------------------|----------------------------|----------------------------|
| Brote mit Erdnussöl | | | | | |
| gesättigte FS [%] | 19,71 | 19,93 | 20,02 | 19,84 | 22,36 |
| | 20,79 | 21,23 | 20,27 | 19,92 | 22,57 |
| | 19,92 | 20,31 | 20,16 | 19,90 | 22,50 |
| MW | 20,14 | 20,49 | 20,15 | 19,89 | 22,48 |
| SD | 0,57 | 0,67 | 0,13 | 0,04 | 0,11 |
| einfach ungesättigte FS [%] | 71,65 | 71,46 | 71,46 | 71,67 | 72,99 |
| | 70,34 | 70,10 | 71,20 | 71,41 | 72,72 |
| | 71,54 | 71,25 | 71,48 | 71,72 | 72,74 |
| MW | 71,18 | 70,94 | 71,38 | 71,60 | 72,82 |
| SD | 0,73 | 0,73 | 0,16 | 0,17 | 0,15 |
| mehrfach ungesättigte FS [%] | 8,64 | 8,60 | 8,53 | 8,48 | 4,65 |
| | 8,87 | 8,68 | 8,55 | 8,66 | 4,71 |
| | 8,54 | 8,43 | 8,35 | 8,40 | 4,77 |
| MW | 8,68 | 8,57 | 8,48 | 8,51 | 4,71 |
| SD | 0,17 | 0,13 | 0,11 | 0,13 | 0,06 |

Tabelle A 12: Zur Verfügung gestellte Daten zur Fettsäureanalytik von Toastbrot

N=10, MW: Mittelwert, RSD: relative Standardabweichung [%]

| Toastbrote IGV GmbH | | | | | | | | | | |
|-------------------------------------|-----------|------|------|------|------|----------------|------|------|------|------|
| Fett [g/100g] | 3,1 | 3,1 | 3,0 | 2,8 | 4,1 | 4,2 | 4,0 | 4,4 | 4,7 | 4,4 |
| gesättigte FS [g/100 g] | 0,4 | 0,4 | 0,4 | 0,4 | 0,4 | 0,4 | 0,4 | 0,5 | 0,5 | 0,5 |
| gesättigte FS [%] | 12,9 | 12,9 | 13,3 | 14,3 | 9,8 | 9,5 | 10,0 | 11,4 | 10,6 | 11,4 |
| einfach ungesättigte FS [g/100 g] | 1,9 | 2,0 | 1,8 | 1,6 | 2,4 | 2,7 | 2,3 | 2,7 | 2,8 | 2,8 |
| einfach ungesättigte FS [%] | 61,3 | 64,5 | 60,0 | 57,1 | 58,5 | 64,3 | 57,5 | 61,4 | 59,6 | 63,6 |
| mehrfach unges. FS [g/100 g] | 0,8 | 0,7 | 0,8 | 0,8 | 1,3 | 1,1 | 1,3 | 1,2 | 1,4 | 1,1 |
| mehrfach unges. FS [%] | 25,8 | 22,6 | 26,7 | 28,6 | 31,7 | 26,2 | 32,5 | 27,3 | 29,8 | 25,0 |
| | MW | | | | | RSD [%] | | | | |
| gesättigte FS [%] | 11,6 | | | | | 14,3 | | | | |
| einfach ungesättigte FS [%] | 60,8 | | | | | 4,5 | | | | |
| mehrfach ungesättigte FS [%] | 27,6 | | | | | 11,1 | | | | |

Tabelle A 13: Ergebnisse der Zuckeranalytik

| | Null- Probe | 3,92 mg/kg Fungamyl | 9,80 mg/kg Fungamyl | 0,72 mg/kg Lipase FE-01 | 1,80 mg/kg Lipase FE-01 |
|----------------------|----------------|------------------------|------------------------|----------------------------|----------------------------|
| Glukose | | | | | |
| Tag 1 | 0,07 | 0,11 | 0,11 | 0,32 | 0,81 |
| Tag 3 | 0,06 | 0,09 | 0,11 | 0,22 | 0,77 |
| Tag 7 | 0,06 | 0,09 | 0,12 | 0,21 | 0,79 |
| Fructose | | | | | |
| Tag 1 | 0,15 | 0,33 | 0,31 | 0,65 | 1,37 |
| Tag 3 | 0,25 | 0,28 | 0,36 | 0,67 | 1,31 |
| Tag 7 | 0,27 | 0,34 | 0,34 | 0,66 | 1,32 |
| Saccharose | | | | | |
| Tag 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Tag 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Tag 7 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Laktose | | | | | |
| Tag 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Tag 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Tag 7 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Maltose | | | | | |
| Tag 1 | 2,53 | 4,95 | 5,13 | 2,84 | 2,86 |
| Tag 3 | 2,61 | 4,46 | 5,30 | 2,98 | 2,75 |
| Tag 7 | 2,56 | 4,83 | 5,40 | 2,87 | 2,74 |
| Zucker gesamt | | | | | |
| Tag 1 | 2,75 | 5,39 | 5,55 | 3,81 | 5,04 |
| Tag 3 | 2,92 | 4,83 | 5,77 | 3,87 | 4,83 |
| Tag 7 | 2,89 | 5,26 | 5,86 | 3,74 | 4,85 |

Tabelle A 14: Ergebnisse der sensorischen Prüfung der Testmaterialien – Teil 1

| Sensorik | Null-Probe | 3,92 mg/kg Fungamyl | 9,80 mg/kg Fungamyl | 0,72 mg/kg Lipase FE-01 | 1,80 mg/kg Lipase FE-01 |
|----------------------------------|--|---|---|--|--|
| Form/ Aussehen | glatt, gerade, Volumen noch "gut" | Volumen sehr gut, glatt, gerade | Volumen sehr gut, glatt, gerade | Volumen befriedigend bis ausreichend; glatt; gerade; feine Narbung an den Rändern; Hohlraum unter der OF | Volumen mangelhaft, Seiten und Form nicht bewertbar da zu geringes Volumen |
| - Kruste | Blasenbildung an der OF, mittelbraun bis braun, große Krustenabsplitterungen, feine Zuckerblasen, feine Fensterung | minimale Blasen an der OF; braun bis dunkelbraun; mittlere Zuckerblaschen; größere Fensterung | mittelbraun bis braun; mittlere Zuckerblaschen; größere Fensterung | braun bis dunkelbraun; deutliche Zuckerblasen; feine Fensterung | hell bis mittelbraun, an den Seiten dunkel; grobe Zuckerblaschen |
| - Krume | minimale Krumenverdichtung im Randbereich | Krumenverdichtung im Randbereich; mittlere Porung in der Mitte | Krumenverdichtung im Randbereich; mittlere bis offene Porung in der Mitte | deutliche Krumenverdichtung im unteren Bereich | starke Porenverdichtung im gesamten Bereich |
| Frischeeindruck Tag 1 | normal | gut | weich, soft, sehr guter Frischeeindruck | weniger frisch, etwas zäh | zäh, ledrig, kompakt |
| Frischeeindruck Tag 3 | Kruste ledrig, insgesamt straff, im Krumenkern noch weich, Rand straff/fest | etwas straff ledrige Kruste; sonst weich; im Krumenkern frisch, weich elastisch | etwas straffe ledrige Kruste; Krume zart; weich; guter Frischeeindruck | mangelhaft; sehr fest; straff; altbacken; zäh; trocken | ohne Bewertung, nicht verzehrsfähig |
| Frischeeindruck Tag 7 | altbacken, straff, trocken | etwas straff ledrige Kruste; sonst weich; im Krumenkern frisch | etwas straffe ledrige Kruste; Krume zart; weich; guter Frischeeindruck | mangelhaft; sehr fest; straff; altbacken; zäh; trocken | ohne Bewertung, nicht verzehrsfähig |
| Geruch Tag 1 | normal, arteigen, produkttypisch | normal, arteigen, produkttypisch | normal, arteigen, produkttypisch | nicht arteigen; ranzig | nicht arteigen, stark ranzig |
| Geruch Tag 3 | nicht mehr frisch, etwas altbacken | normal, arteigen, produkttypisch | normal, arteigen, produkttypisch | stark ranzig; stechend | ohne Bewertung, nicht verzehrsfähig |
| Geruch Tag 7 | altbacken | nicht mehr frisch, etwas altbacken | normal, arteigen, produkttypisch | stark ranzig; stechend | ohne Bewertung, nicht verzehrsfähig |

Tabelle A 15: Ergebnisse der sensorischen Prüfung der Testmaterialien – Teil 2

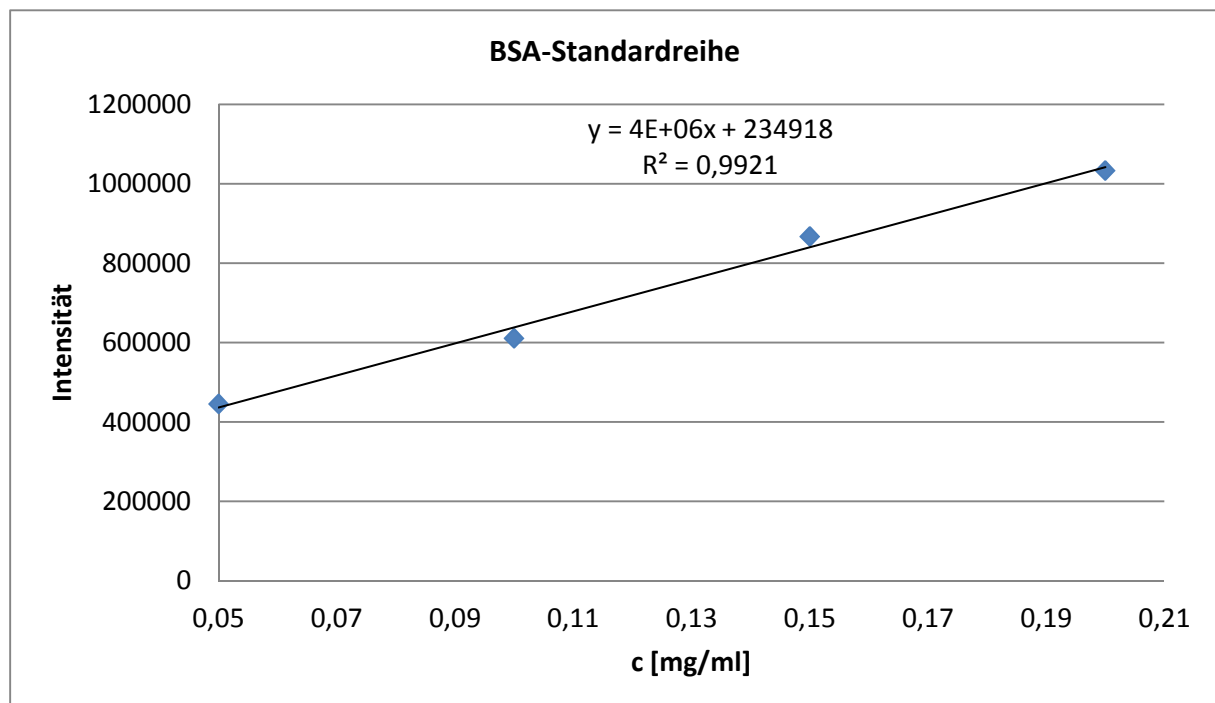
| Sensorik | Null-Probe | 3,92 mg/kg Fungamyl | 9,80 mg/kg Fungamyl | 0,72 mg/kg Lipase FE-01 | 1,80 mg/kg Lipase FE-01 |
|--|---|---|---|--|--|
| Biss/Kaueindruck/ Löslichkeit Tag 1 | kurzer Biss, etwas schwer löslich | sehr kurzer Biss; etwas schwer löslich | sehr kurzer Biss; sehr gut; wattig weich; löslich | schwer löslich; zäh | ohne Bewertung, nicht verzehrsfähig |
| Biss/Kaueindruck/ Löslichkeit Tag 3 | Krume krümelig; trocken; gut löslich | sehr kurzer Biss; etwas schwer löslich | noch gut löslich; kurzer Biss; zusammenziehend beim Kauen | ohne Bewertung, nicht verzehrsfähig | ohne Bewertung, nicht verzehrsfähig |
| Biss/Kaueindruck/ Löslichkeit Tag 7 | trocken, krümelig, mangelhafter Zusammenhalt | sehr kurzer Biss; etwas schwer löslich | noch gut löslich; kurzer Biss; zusammenziehend beim Kauen | ohne Bewertung, nicht verzehrsfähig | ohne Bewertung, nicht verzehrsfähig |
| Geschmack Tag 1 | normal, arteigen, etwas "spitz" leicht "brenzlich" | normal, arteigen; etwas spitz/leicht brenzlich | normal, arteigen; produkttypisch | stark ranzig; nicht produkttypisch | ohne Bewertung, nicht verzehrsfähig |
| Geschmack Tag 3 | geschmackseindruck gleichbleibend | normal, arteigen; etwas spitz/leicht brenzlich | normal, arteigen; etwas spitz/leicht brenzlich | ohne Bewertung, nicht verzehrsfähig | ohne Bewertung, nicht verzehrsfähig |
| Geschmack Tag 7 | geschmackseindruck gleichbleibend | normal, arteigen; etwas spitz/leicht brenzlich | normal, arteigen; etwas spitz/leicht brenzlich | ohne Bewertung, nicht verzehrsfähig | ohne Bewertung, nicht verzehrsfähig |

A5 Daten zur Identifikation technischer Enzyme

Tabelle A 16: Pharmacia Peptid Standard

| Pharmacia | Protein | Molekulargewicht [Da] | |
|---------------------------------|-------------------------------------|----------------------------------|----------------------------|
| GE Healthcare Europe GmbH | Lysozym | 14400 | |
| 79111 Freiburg, Germany | Trypsininhibitor aus Soja | 20100 | |
| | Carboanhydrase | 31000 | |
| | Ovalbumin | 43000 | |
| | Rinder Serum Albumin | 67000 | |
| | Muskel Phosphorylase (Kaninchen) | 94000 | |
| | | | |
| Peptide calibration standard II | Peptid | [M+H] ⁺ Mono isotopic | [M+H] ⁺ Average |
| Bruker Daltonik GmbH | Bradikinin 1-7 | 757,3992 | 757,86 |
| 28195 Bremen, Germany | Angiotensin II | 1046,5418 | 1047,19 |
| Massenbereich 700 bis 3500 Da | Angiotensin I | 1296,6848 | 1297,49 |
| | Substance P | 1347,7354 | 1348,64 |
| | Bombesin | 1619,8223 | 1620,86 |
| | Renin Substrate | 1758,9326 | 1760,03 |
| | ACTH clip 1-17 | 2093,0862 | 2094,43 |
| | ACTH clip 18-39 | 2465,1983 | 2466,68 |
| | Somatostatin 28 | 3147,4710 | 3149,57 |

A6 Daten zur Quantifizierung des Proteingehaltes über eine BSA-Standardreihe

Abbildung A 1: BSA Standard-Kalibrierreihe für die Quantifizierung des Proteingehaltes (*alpha*-Amylase, Endo-1,4-Xylanase)

Y-Achse: Intensität der Farbdichte; x-Achse: Konzentration in mg/ml

Tabelle A 17: Gehaltsbestimmung von *alpha*-Amylase sowie Endo-1,4-Xylanase in Fungamyl über BSA-Standard

N=4, MW: Mittelwert, SD: Standardabweichung

| | Fungamyl [mg/ml] | Messung 1 | Messung 2 | Messung 3 | Messung 4 |
|-----------------------------|------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| Endo-1,4-Xylanase | 5 | 0,412 | 0,392 | 0,202 | - |
| | 10 | 0,310 | 0,393 | 0,232 | - |
| | 15 | 0,265 | 0,242 | 0,192 | 0,151 |
| | 20 | 0,201 | 0,253 | - | 0,124 |
| | SD | 0,089 | 0,084 | 0,021 | 0,019 |
| | MW | 0,297 | 0,320 | 0,209 | 0,138 |
| | SD | 0,089 | 0,084 | 0,021 | 0,019 |
| | MW (5 mg) | 0,059 | 0,064 | 0,042 | 0,042 |
| <i>alpha</i>-Amylase | 5 | 0,675 | 0,642 | 0,511 | 0,328 |
| | 10 | 0,463 | 0,569 | 0,517 | 0,387 |
| | 15 | 0,395 | 0,425 | 0,445 | 0,308 |
| | 20 | 0,338 | 0,38 | - | 0,319 |
| | SD | 0,147 | 0,122 | 0,04 | 0,035 |
| | MW | 0,468 | 0,504 | 0,491 | 0,336 |
| | SD | 0,147 | 0,122 | 0,040 | 0,035 |
| | MW (5 mg) | 0,094 | 0,101 | 0,098 | 0,098 |

A7 Daten zu Referenzmaterialien



Sympatec GmbH
System-Partikel-Technik

HELOS-Partikelgrößenanalyse
WINDOX 5

HELOS (H0737) & RODOS, R6: 0.5/9.0...1750µm 2013-12-20, EFLMJS-BrotVT-200_40_21.11.13

Sonstiges

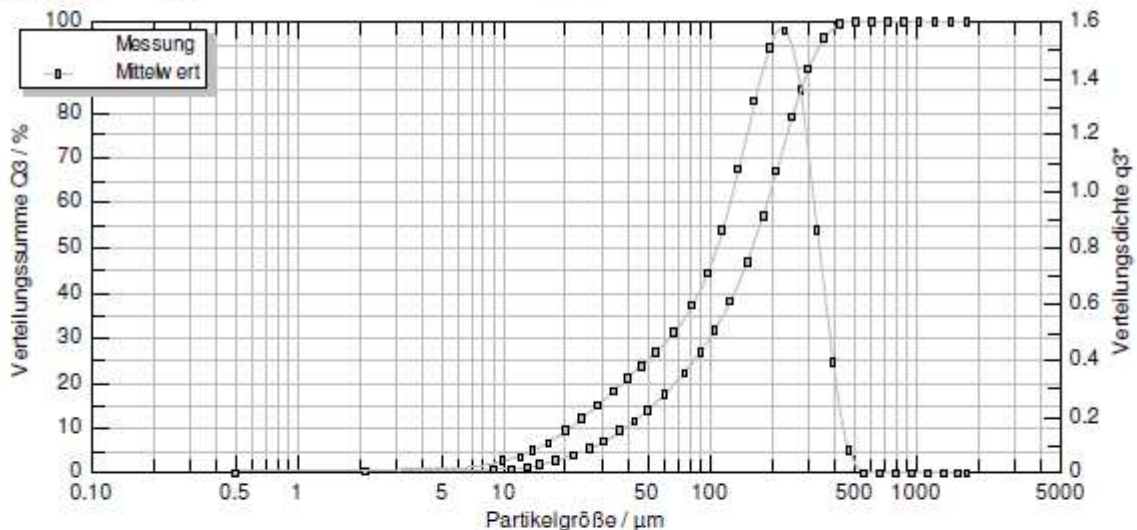
| | | |
|---------------------------------------|--|---|
| $x_{10} = 39,27 \pm 0,08 \mu\text{m}$ | $x_{50} = 160,18 \pm 1,79 \mu\text{m}$ | $x_{90} = 304,79 \pm 11,29 \mu\text{m}$ |
| $x_{16} = 56,34 \pm 0,04 \mu\text{m}$ | $x_{84} = 274,02 \pm 7,05 \mu\text{m}$ | $x_{95} = 422,74 \pm 25,14 \mu\text{m}$ |
| VMD = 167,78 µm | $S_V = 0,07 \text{ m}^2/\text{cm}^3$ | $C_{opt} = 1,53 \pm 0,05 \% [2,99 \%]$ |

Konditionen:

Produkt: Sonstiges
Auswertung: HRLD (5.1.2.0)
Trigger: 1%copt
Disp.Meth.: 2Bar

Benutzerparameter:

Bediener:
Herst. Besd.:
Nr.: EFLMJS-BrotVT-200_40_21.11.13



Verteilungssumme mit Standardabweichung

| $x_0/\mu\text{m}$ | $Q_3/\%$ | $SQ_3/\% \text{ abs.}$ | $x_0/\mu\text{m}$ | $Q_3/\%$ | $SQ_3/\% \text{ abs.}$ | $x_0/\mu\text{m}$ | $Q_3/\%$ | $SQ_3/\% \text{ abs.}$ |
|-------------------|----------|------------------------|-------------------|----------|------------------------|-------------------|----------|------------------------|
| 9,00 | 0,42 | 0,09 | 60,00 | 17,25 | 0,00 | 430,00 | 99,42 | 0,81 |
| 11,00 | 0,75 | 0,10 | 75,00 | 22,06 | 0,04 | 510,00 | 100,00 | 0,00 |
| 13,00 | 1,17 | 0,10 | 90,00 | 26,74 | 0,10 | 610,00 | 100,00 | 0,00 |
| 15,00 | 1,66 | 0,10 | 105,00 | 31,46 | 0,18 | 730,00 | 100,00 | 0,00 |
| 18,00 | 2,50 | 0,08 | 125,00 | 37,97 | 0,31 | 870,00 | 100,00 | 0,00 |
| 22,00 | 3,78 | 0,05 | 150,00 | 46,47 | 0,52 | 1030,00 | 100,00 | 0,00 |
| 26,00 | 5,17 | 0,02 | 180,00 | 56,90 | 0,81 | 1230,00 | 100,00 | 0,00 |
| 31,00 | 6,97 | 0,01 | 210,00 | 66,98 | 1,11 | 1470,00 | 100,00 | 0,00 |
| 37,00 | 9,17 | 0,03 | 250,00 | 78,85 | 1,47 | 1750,00 | 100,00 | 0,00 |
| 43,00 | 11,36 | 0,03 | 300,00 | 89,59 | 1,56 | | | |
| 50,00 | 13,85 | 0,03 | 360,00 | 96,41 | 1,13 | | | |

gemittelt wurde über die folgenden Messungen:

| Datum, Uhrzeit und Gerät | Bediener | Herst. Besd. |
|---------------------------------|----------|--------------|
| 2013-12-20 09:53:22.2650 0737 H | | |
| 2013-12-20 09:55:07.5150 0737 H | | |

Abbildung A 2: HELOS-Partikelgrößenanalyse für Testmaterialien Matrix Brot



Sympatec GmbH
System-Partikel-Technik

HELOS-Partikelgrößenanalyse WINDÖX 5

HELOS (H0737) & RODOS, R4: 0.5/1.8...350µm
Sonstiges

2013-11-15, Maismehlteig 28.8.13

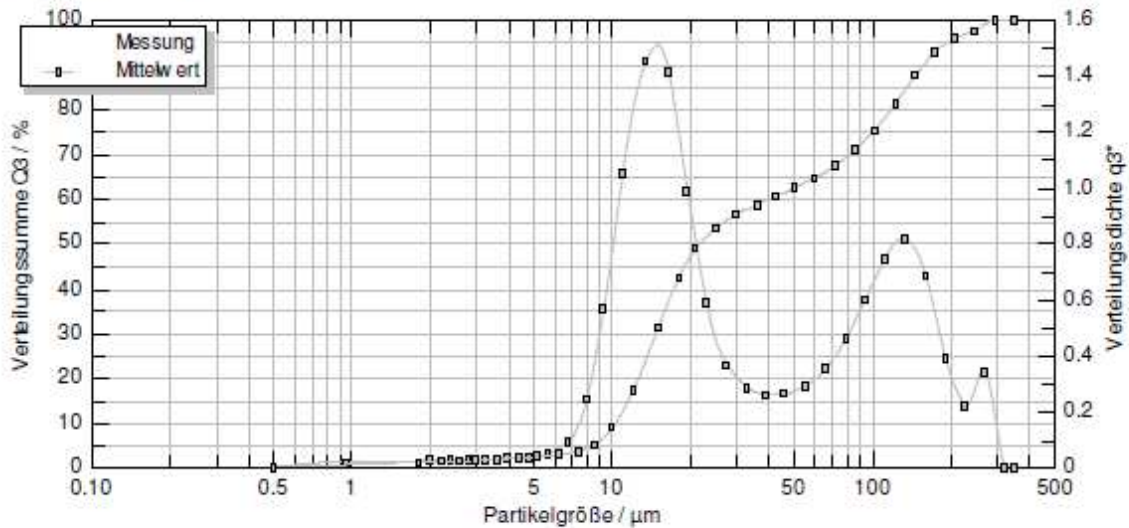
| | | |
|---------------------------------------|--|---|
| $x_{10} = 10,28 \pm 0,03 \mu\text{m}$ | $x_{50} = 21,92 \pm 0,77 \mu\text{m}$ | $x_{90} = 159,24 \pm 10,31 \mu\text{m}$ |
| $x_{15} = 11,72 \pm 0,05 \mu\text{m}$ | $x_{84} = 132,73 \pm 6,58 \mu\text{m}$ | $x_{95} = 273,81 \pm 7,09 \mu\text{m}$ |
| VMD = 60,61 µm | $S_V = 0,34 \text{ m}^2/\text{cm}^3$ | $C_{opt} = 4,60 \pm 0,57 \% [12,51 \%]$ |

Konditionen:

Produkt: Sonstiges
Auswertung: HRLD (5.1.2.0)
Trigger: 1%copt
Disp.Meth.: 1,5 Bar

Benutzerparameter:

Bediener:
Herst. Besd.:
Nr.: Maismehlteig 28.8.13



Verteilungssumme mit Standardabweichung

| $x_{\alpha}/\mu\text{m}$ | $Q_{\alpha}/\%$ | $SQ_{\alpha}/\% \text{ abs}$ | $x_{\alpha}/\mu\text{m}$ | $Q_{\alpha}/\%$ | $SQ_{\alpha}/\% \text{ abs}$ | $x_{\alpha}/\mu\text{m}$ | $Q_{\alpha}/\%$ | $SQ_{\alpha}/\% \text{ abs}$ |
|--------------------------|-----------------|------------------------------|--------------------------|-----------------|------------------------------|--------------------------|-----------------|------------------------------|
| 1,90 | 1,02 | 0,02 | 12,00 | 17,15 | 0,24 | 86,00 | 70,94 | 1,28 |
| 2,20 | 1,25 | 0,02 | 15,00 | 31,20 | 0,50 | 102,00 | 75,38 | 1,41 |
| 2,60 | 1,45 | 0,02 | 18,00 | 42,38 | 0,71 | 122,00 | 81,20 | 1,62 |
| 3,00 | 1,63 | 0,03 | 21,00 | 48,99 | 0,83 | 146,00 | 87,56 | 1,84 |
| 3,60 | 1,88 | 0,03 | 25,00 | 53,45 | 0,91 | 174,00 | 92,77 | 1,93 |
| 4,40 | 2,16 | 0,03 | 30,00 | 56,36 | 0,97 | 206,00 | 95,65 | 1,73 |
| 5,20 | 2,43 | 0,03 | 36,00 | 58,61 | 1,01 | 246,00 | 97,35 | 1,15 |
| 6,20 | 2,80 | 0,03 | 42,00 | 60,35 | 1,05 | 294,00 | 100,00 | 0,00 |
| 7,40 | 3,52 | 0,03 | 50,00 | 62,33 | 1,09 | 350,00 | 100,00 | 0,00 |
| 8,60 | 5,10 | 0,05 | 60,00 | 64,62 | 1,14 | | | |
| 10,00 | 8,83 | 0,09 | 72,00 | 67,40 | 1,20 | | | |

gemittelt wurde über die folgenden Messungen:

| Datum, Uhrzeit und Gerät | Bediener | Herst. Besd. |
|---------------------------------|----------|--------------|
| 2013-11-15 11:40:38.6090 0737 H | | |
| 2013-11-15 11:43:28.0460 0737 H | | |
| 2013-11-15 11:47:10.4680 0737 H | | |

Abbildung A 3: HELOS-Partikelgrößenanalyse für Testmaterialien Matrix Mehl

Tabelle A 18: Ermittelte Konzentrationen Lipase FE-01 [mg/kg] zur Homogenitätsabschätzung zwischen den Kunststoffbechern (Becher 1-5), repräsentativ aus der Probe 4

N=3; MW: Mittelwert; SD: Standardabweichung; es wurden keine Ausreißer ermittelt (Dean & Dixon-Test)

| Lipase FE-01 [mg/kg] | Becher 1 | Becher 2 | Becher 3 | Becher 4 | Becher 5 |
|----------------------|----------|----------|----------|----------|----------|
| Mehl | 5,15 | 5,60 | 5,87 | 5,09 | 5,29 |
| | 5,03 | 4,90 | 5,64 | 5,06 | 5,43 |
| | 5,25 | 5,50 | 5,81 | 5,25 | 5,90 |
| MW | 5,14 | 5,34 | 5,77 | 5,13 | 5,54 |
| SD | 0,11 | 0,38 | 0,12 | 0,10 | 0,32 |
| Brot | 4,49 | 6,36 | 4,28 | 6,60 | 4,25 |
| | 5,01 | 6,87 | 5,04 | 6,60 | 3,87 |
| | 4,17 | 8,85 | 4,28 | 6,56 | 4,85 |
| MW | 4,56 | 7,36 | 4,53 | 6,59 | 4,32 |
| SD | 0,43 | 1,32 | 0,44 | 0,02 | 0,49 |
| Keks | 5,26 | 4,03 | 5,98 | 5,88 | 4,84 |
| | 5,37 | 3,87 | 5,71 | 5,20 | 4,75 |
| | 5,47 | 3,87 | 5,84 | 5,56 | 4,65 |
| MW | 5,37 | 3,92 | 5,84 | 5,55 | 4,75 |
| SD | 0,10 | 0,09 | 0,14 | 0,34 | 0,10 |

Tabelle A 19: Ermittelte Konzentrationen Lipase FE-01 [mg/kg] zur Homogenitätsabschätzung innerhalb eines Kunststoffbeckers (Becher 6), repräsentativ aus der Probe 4

N=6; MW: Mittelwert; SD: Standardabweichung; es wurden keine Ausreißer ermittelt (Dean & Dixon-Test)

| Lipase FE-01 [mg/kg] | Becher 6 | | | | | |
|----------------------|----------|------|------|------|------|------|
| Mehl | 5,10 | 5,60 | 4,95 | 6,02 | 5,82 | 5,65 |
| MW | 5,52 | | | | | |
| SD | 0,42 | | | | | |
| Brot | 4,36 | 4,25 | 4,78 | 6,43 | 6,25 | 6,49 |
| MW | 5,43 | | | | | |
| SD | 1,07 | | | | | |
| Keks | 4,96 | 4,20 | 4,88 | 5,47 | 5,37 | 5,33 |
| MW | 5,04 | | | | | |
| SD | 0,47 | | | | | |

A8 Daten zum qualitativen und quantitativen Nachweis technischer Enzyme mittels LC-MS/MS-QTRAP

Tabelle A 20: Lösungen der synthetischen Peptidstandard (Markerpeptide)

SL: Stammlösung, VL: Verdünnungslösung

| Bezeichnung | Zusammensetzung | Endkonzentration [mg/kg] |
|-----------------|---|--------------------------|
| ISTD-Peptid SL | 2,4 mg ISTD-Peptid 1,0 ml Puffer A | 2400 |
| Amylase 411 SL | 2,2 mg Amylase 411 0,5 ml Puffer A | 4400 |
| Xylanase 493 SL | 2,5 mg Xylanase 493 0,5 ml Puffer A | 5000 |
| Lipase 465 SL | 2 mg Lipase 465 0,5 ml Puffer A | 4000 |
| Peptidmix VL1 | 227,30 µl Amylase 411 SL | 100 |
| | 200,00 µl Xylanase 493 SL | 100 |
| | 250 µl Lipase 465 SL mit Puffer B auf 10 ml auffüllen | 100 |
| Peptidmix VL2 | 50 µl Peptidmix VL1 mit Puffer B auf 10 ml auffüllen | 0,5 |
| Peptidmix VL3 | 2 ml mit Puffer B auf 10 ml auffüllen | 0,1 |
| ISTD-Peptid VL1 | 416,7 µl ISTD-Peptid SL mit Puffer B auf 10 ml auffüllen | 100 |
| ISTD-Peptid VL2 | 2 ml ISTD-Peptid VL1 mit Puffer B auf 10 ml auffüllen | 20 |

Tabelle A 21: Synthetische Peptidstandards (isotopenmarkierte Markerpeptide)

SL: Stammlösung, VL: Verdünnungslösung

| Bezeichnung Protein | Bezeichnung Peptid | Aminosäure-Sequenz | Einwaage |
|-----------------------------|--------------------|--------------------|----------|
| Endo-1,4-Xylanase heavy | Xylanase 493 heavy | GWNPGLNAR | 2,8 mg |
| | Xylanase 599 heavy | TSGTVQTGCHFDAWAR | 2,3 mg |
| <i>alpha</i> -Amylase heavy | Amylase 411 heavy | NWPIYK | 2,7 mg |
| | Amylase 329 heavy | ALSSALHER | 3,9 mg |
| | Amylase 465 heavy | DTGFVTYK | 2,9 mg |
| Lipase heavy | Lipase 465 heavy | SGTLVPVTR | 2,0 mg |
| | Lipase 575 heavy | GHDGFTSSWR | 2,0 mg |
| | Lipase 583 heavy | ITHTNDIVPR | 3,1 mg |

Tabelle A 22: Lösungen der synthetischen Peptidstandard (isotopenmarkierte Markerpeptide)

SL: Stammlösung, VL: Verdünnungslösung

| Bezeichnung | Zusammensetzung | Endkonzentration [mg/kg] |
|------------------------------|--|--------------------------|
| Xylanase 493 heavy SL | 2,8 mg Xylanase 493 heavy 0,5 ml Puffer A | 5600 |
| Xylanase 599 heavy SL | 2,3 mg Xylanase 493 heavy 0,5 ml Puffer A | 4600 |
| Amylase 411 heavy SL | 272 mg Amylase 411 heavy 0,5 ml Puffer A | 5400 |
| Amylase329 heavy SL | 3,9 mg Amylase 411 heavy 0,5 ml Puffer A | 7800 |
| Amylase 465 heavy SL | 2,9 mg Amylase 411 heavy 0,5 ml Puffer A | 5800 |
| Lipase 465 heavy SL | 2,0 mg Lipase 465 heavy 0,5 ml Puffer A | 4000 |
| Lipase 575 heavy SL | 2,0 mg Lipase 465 heavy 0,5 ml Puffer A | 4000 |
| Lipase 483 heavy SL | 3,1 mg Lipase 465 heavy 0,5 ml Puffer A | 6200 |
| Peptidmix heavy VL1 | 185,20 µl Amylase 411 heavy SL 128,20 µl Amylase 329 heavy SL 172,40 µl Amylase 465 heavy SL 178,60 µl Xylanase 493 heavy SL 217,40 µl Xylanase 599 heavy SL 250,00 µl Lipase 465 heavy SL 250,00 µl Lipase 575 heavy SL 161,3 µl Lipase 583 heavy SL mit Puffer B auf 10 ml auffüllen | 100 |
| Peptidmix heavy VL2 | 50 µl Peptidmix heavy VL1 mit Puffer B auf 10 ml auffüllen | 5 |

Tabelle A 23: MRM-Tabelle der ausgewählten Markerpeptide

Q1: Mutter-Ion [m/z], Q3: Fragmention [m/z], RT: Retentionszeit, DP: Declustering Potential, CE: Collision Energy, F: Fragment, heavy: Fragmentübergang für Peptid mit Isotopenmarkierung

| Peptidsequenz | Bezeichnung | Q1 | Q3 | RT | DP | CE |
|-------------------------|-----------------------------|-------|-------|------|----|----|
| GWNPGLNAR | Xylanase 493 quant F1 | 493,2 | 627,4 | 6,2 | 90 | 23 |
| | Xylanase 493 quant F2 | 493,2 | 741,4 | 6,2 | 90 | 22 |
| | Xylanase 493 quant F3 | 493,2 | 484,3 | 6,2 | 90 | 21 |
| | Xylanase 493 quant heavy F1 | 497,8 | 751,4 | 6,2 | 67 | 27 |
| | Xylanase 493 quant heavy F2 | 497,8 | 637,4 | 6,2 | 67 | 27 |
| TSGTVQTGCHFDAWAR | Xylanase 599 qual F1 | 598,6 | 803,9 | 7,1 | 80 | 25 |
| | Xylanase 599 qual F2 | 598,6 | 724,8 | 7,1 | 80 | 25 |
| | Xylanase 599 qual F3 | 598,6 | 765,4 | 7,1 | 80 | 30 |
| | Xylanase 599 qual heavy F1 | 601,9 | 808,3 | 7,1 | 75 | 26 |
| | Xylanase 599 qual heavy F2 | 601,9 | 729,4 | 7,1 | 75 | 28 |
| NWPIYK | Amylase 411 quant F1 | 410,7 | 520,3 | 7,3 | 80 | 20 |
| | Amylase 411 quant F2 | 410,7 | 402,2 | 7,3 | 80 | 18 |
| | Amylase 411 quant F3 | 410,7 | 706,4 | 7,3 | 80 | 21 |
| | Amylase 411 quant heavy F1 | 415,0 | 528,0 | 7,3 | 40 | 20 |
| ALSSALHER | Amylase 329 qual F1 | 328,5 | 441,2 | 3,6 | 80 | 20 |
| | Amylase 329 qual F2 | 328,5 | 625,3 | 3,6 | 80 | 19 |
| | Amylase 329 qual F3 | 328,5 | 554,3 | 3,6 | 80 | 21 |
| | Amylase 329 qual heavy F1 | 332,1 | 564,0 | 3,6 | 40 | 20 |
| | Amylase 329 qual heavy F2 | 332,1 | 635,0 | 3,6 | 40 | 20 |
| DTGFVTYK | Amylase 466 qual F1 | 465,7 | 714,4 | 6 | 80 | 20 |
| | Amylase 466 qual F2 | 465,7 | 510,3 | 6 | 80 | 20 |
| | Amylase 466 qual F3 | 465,7 | 657,4 | 6 | 80 | 24 |
| | Amylase 466 qual heavy F1 | 469,9 | 722,0 | 6,0 | 40 | 25 |
| | Amylase 466 qual heavy F2 | 469,9 | 461,0 | 6,0 | 40 | 25 |
| SGTLVPVTR | Lipase 465 quant F1 | 465,3 | 472,3 | 5,6 | 60 | 26 |
| | Lipase 465 quant F2 | 465,3 | 571,4 | 5,6 | 60 | 26 |
| | Lipase 465 quant F3 | 465,3 | 684,4 | 5,6 | 60 | 26 |
| | Lipase 465 quant F4 | 465,3 | 785,5 | 5,6 | 60 | 26 |
| | Lipase 465 quant heavy F1 | 470,3 | 482,3 | 5,6 | 65 | 26 |
| | Lipase 465 quant heavy F2 | 470,3 | 581,4 | 5,6 | 65 | 26 |
| GHDGFTSSWR | Lipase 575 qual F1 | 575,3 | 955,4 | 5,4 | 70 | 32 |
| | Lipase 575 qual F2 | 575,3 | 840,4 | 5,4 | 70 | 32 |
| | Lipase 575 qual F3 | 575,3 | 636,3 | 5,4 | 70 | 32 |
| | Lipase 575 qual F4 | 575,3 | 783,4 | 5,4 | 70 | 32 |
| | Lipase 575 qual heavy F1 | 580,3 | 965,4 | 5,4 | 73 | 30 |
| | Lipase 575 qual heavy F2 | 580,3 | 850,4 | 5,4 | 73 | 30 |
| ITHTNDIVPR | Lipase 583 qual F1 | 583,3 | 814,4 | 4,2 | 69 | 36 |
| | Lipase 583 qual F2 | 583,3 | 713,4 | 4,2 | 69 | 36 |
| | Lipase 583 qual F3 | 583,3 | 599,4 | 4,2 | 69 | 36 |
| | Lipase 583 qual F4 | 583,3 | 951,5 | 4,2 | 69 | 36 |
| | Lipase 583 qual heavy F1 | 588,3 | 824,5 | 4,2 | 74 | 30 |
| | Lipase 583 qual heavy F2 | 588,3 | 723,4 | 4,2 | 74 | 30 |
| EGDSSVANSGLAALITDGPGGAK | Enzyme ISTD 496 F1 | 696,4 | 702,3 | 11,1 | 82 | 34 |
| | Enzyme ISTD 496 F2 | 696,4 | 815,4 | 11,1 | 82 | 36 |
| | Enzyme ISTD 496 F3 | 696,4 | 928,5 | 11,1 | 82 | 36 |

Tabelle A 24: Ermittelte Schwankungen der Ionenverhältnisse der MRM-Massenübergänge

N=3; es wurde beispielhaft das Enzym Lipase (Probe 3 und 4 der Matrix Mehl) betrachtet; IV: Ionenverhältnis; F: Fragment

| MRM-Massenübergang | IV Soll (definiert in 3.5.3) | Probe 3 | | Probe 4 | |
|---------------------|---------------------------------|---------|---------------|-----------------|---------------|
| | | IV | Schankung [%] | Ionenverhältnis | Schankung [%] |
| Lipase 465 quant F2 | 3,8 | 4,4 | 13,5 | 3,6 | 5,6 |
| Lipase 465 quant F2 | 3,8 | 3,6 | 5,7 | 3,8 | 0,2 |
| Lipase 465 quant F2 | 3,8 | 3,7 | 1,9 | 3,9 | 3,0 |
| Lipase 465 quant F3 | 5,9 | 6,5 | 9,1 | 7,4 | 21,2 |
| Lipase 465 quant F3 | 5,9 | 6,3 | 7,4 | 8,0 | 26,2 |
| Lipase 465 quant F3 | 5,9 | 8,2 | 28,6 | 6,8 | 14,2 |
| Lipase 465 quant F4 | 65,1 | 76,9 | 15,4 | 62,1 | 4,8 |
| Lipase 465 quant F4 | 65,1 | 70,3 | 7,4 | 58,7 | 10,9 |
| Lipase 465 quant F4 | 65,1 | 60,2 | 8,1 | 59,3 | 9,8 |
| Lipase 575 qual F2 | 1,6 | 1,5 | 6,0 | 1,3 | 25,7 |
| Lipase 575 qual F2 | 1,6 | 1,7 | 8,7 | 1,3 | 24,0 |
| Lipase 575 qual F2 | 1,6 | 1,4 | 16,0 | 1,6 | 0,8 |
| Lipase 575 qual F3 | 2,5 | 2,1 | 19,8 | 2,3 | 7,9 |
| Lipase 575 qual F3 | 2,5 | 2,0 | 25,1 | 2,0 | 22,2 |
| Lipase 575 qual F3 | 2,5 | 2,0 | 22,9 | 2,2 | 11,6 |
| Lipase 575 qual F4 | 7,0 | 6,4 | 8,9 | 5,9 | 19,1 |
| Lipase 575 qual F4 | 7,0 | 6,5 | 7,7 | 5,8 | 20,1 |
| Lipase 575 qual F4 | 7,0 | 7,5 | 6,2 | 5,5 | 26,8 |
| Lipase 583 qual F2 | 2,5 | 2,2 | 14,0 | 2,2 | 12,9 |
| Lipase 583 qual F2 | 2,5 | 2,2 | 9,7 | 2,1 | 16,6 |
| Lipase 583 qual F2 | 2,5 | 2,5 | 1,1 | 2,3 | 5,0 |
| Lipase 583 qual F3 | 9,1 | 7,5 | 21,1 | 8,0 | 13,4 |
| Lipase 583 qual F3 | 9,1 | 8,1 | 11,7 | 8,9 | 1,7 |
| Lipase 583 qual F3 | 9,1 | 8,5 | 6,7 | 7,1 | 27,4 |
| Lipase 583 qual F4 | 4,5 | 3,8 | 19,6 | 3,7 | 23,8 |
| Lipase 583 qual F4 | 4,5 | 4,0 | 14,2 | 4,2 | 8,3 |
| Lipase 583 qual F4 | 4,5 | 4,1 | 11,0 | 4,1 | 11,1 |

A9 Daten zur Validierung

Tabelle A 25: area ratios der einzelnen Konzentrationslevel der Kalibrierreihe

N=6; MW: Mittelwert; SD: Standardabweichung; RSD: relative Standardabweichung; Konzentrationslevel KP1-6 wie in 2.2.5.3 beschrieben; es wurden keine Ausreißer ermittelt (Dean & Dixon-Test)

| Endo-1,4-Xylanase | | | | | | |
|--------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| Konzentration [mg/kg] | KP1 | KP2 | KP3 | KP4 | KP5 | KP6 |
| 1 | 0,0081 | 0,0116 | 0,0226 | 0,1150 | 0,2310 | 0,4720 |
| 2 | 0,0077 | 0,0111 | 0,0225 | 0,1170 | 0,2410 | 0,4690 |
| 3 | 0,0080 | 0,0118 | 0,0225 | 0,1240 | 0,2330 | 0,4630 |
| 4 | 0,0068 | 0,0107 | 0,0205 | 0,1180 | 0,2410 | 0,4510 |
| 5 | 0,0073 | 0,0116 | 0,0254 | 0,1260 | 0,2450 | 0,4410 |
| 6 | 0,0068 | 0,0100 | 0,0225 | 0,1180 | 0,2240 | 0,4200 |
| MW | 0,0075 | 0,0111 | 0,0227 | 0,1197 | 0,2358 | 0,4527 |
| SD | 0,0006 | 0,0007 | 0,0016 | 0,0043 | 0,0079 | 0,0198 |
| RSD [%] | 7,9 | 6,2 | 6,9 | 3,6 | 3,3 | 4,4 |
| alpha-Amylase | | | | | | |
| Konzentration [mg/kg] | KP1 | KP2 | KP3 | KP4 | KP5 | KP6 |
| 1 | 0,0237 | 0,0319 | 0,0624 | 0,3200 | 0,6220 | 1,0900 |
| 2 | 0,0223 | 0,0304 | 0,0580 | 0,3120 | 0,6000 | 1,1100 |
| 3 | 0,0210 | 0,0307 | 0,0596 | 0,3180 | 0,6090 | 1,1200 |
| 4 | 0,0206 | 0,0312 | 0,0589 | 0,3210 | 0,5920 | 1,1500 |
| 5 | 0,0212 | 0,0316 | 0,0641 | 0,3410 | 0,6220 | 1,1600 |
| 6 | 0,0218 | 0,0320 | 0,0638 | 0,3190 | 0,6230 | 1,1000 |
| MW | 0,0218 | 0,0313 | 0,0611 | 0,0313 | 0,6113 | 1,1217 |
| SD | 0,0011 | 0,0007 | 0,0026 | 0,0007 | 0,0132 | 0,0279 |
| RSD [%] | 5,2 | 2,1 | 4,3 | 2,1 | 2,2 | 2,5 |
| Lipase | | | | | | |
| Konzentration [mg/kg] | KP1 | KP2 | KP3 | KP4 | KP5 | KP6 |
| 1 | 0,1800 | 0,2330 | 0,4790 | 2,3900 | 4,2800 | 8,1500 |
| 2 | 0,1700 | 0,2420 | 0,4760 | 2,3100 | 4,3300 | 7,7200 |
| 3 | 0,1650 | 0,2320 | 0,4690 | 2,3600 | 4,3700 | 8,0000 |
| 4 | 0,1510 | 0,2380 | 0,4550 | 2,2700 | 4,4800 | 7,7300 |
| 5 | 0,1450 | 0,2370 | 0,4780 | 2,3300 | 4,3100 | 7,9900 |
| 6 | 0,1460 | 0,2300 | 0,4530 | 2,1700 | 4,2900 | 7,6700 |
| MW | 0,1595 | 0,2353 | 0,4683 | 2,3050 | 4,3433 | 7,8767 |
| SD | 0,0143 | 0,0045 | 0,0117 | 0,0779 | 0,0742 | 0,1957 |
| RSD [%] | 9,0 | 1,9 | 2,5 | 3,4 | 1,7 | 2,5 |

Tabelle A 26: Ermittelte Konzentrationen der Endo-1,4-Xylanase in den Referenzmaterialien

N=3; MW: Mittelwert; SD: Standardabweichung; Konzentrationslevel wie in 2.2.4 beschrieben; * Ausreißer nach Dean & Dixon-Test

| Endo-1,4-Xylanase | | Konzentrationslevel | | | |
|--------------------------|----------|----------------------------|----------|----------|--|
| Mehl | 1 | 2 | 3 | 4 | |
| 1 | 0,43 | 1,06 | 1,63 | 3,07 | |
| 2 | 0,67 | 0,78 | 1,39 | 2,92 | |
| 3 | 0,55 | 1,08 | 1,69 | 2,72 | |
| MW | 0,55 | 1,07 | 1,57 | 2,91 | |
| SD | 0,12 | 0,01 | 0,16 | 0,18 | |
| Brot | 1 | 2 | 3 | 4 | |
| 1 | 0,70 | 2,65* | 24,17* | 10,20 | |
| 2 | 0,79 | 2,55 | 6,71 | 9,93 | |
| 3 | 0,73 | 2,55 | 6,83 | 10,08 | |
| MW | 0,74 | 2,55 | 6,77 | 10,07 | |
| SD | 0,05 | 0,00 | 0,08 | 0,14 | |
| Keks | 1 | 2 | 3 | 4 | |
| 1 | 0,86 | 1,88 | 4,23 | 7,97 | |
| 2 | 0,86 | 1,92 | 4,38 | 7,73 | |
| 3 | 0,85 | 1,94 | 4,31 | 7,82 | |
| MW | 0,86 | 1,91 | 4,31 | 7,84 | |
| SD | 0,01 | 0,03 | 0,08 | 0,12 | |

Tabelle A 27: Ermittelte Konzentrationen der α -Amylase in den Referenzmaterialien

N=3; MW: Mittelwert; SD: Standardabweichung; Konzentrationslevel wie in 2.2.4 beschrieben; * Ausreißer nach Dean & Dixon-Test

| α-Amylase | | Konzentrationslevel | | | |
|------------------------------------|----------|----------------------------|----------|----------|--|
| Mehl | 1 | 2 | 3 | 4 | |
| 1 | 6,09 | 20,28 | 41,03 | 92,74 | |
| 2 | 6,28 | 20,02 | 41,43 | 93,41 | |
| 3 | 5,92 | 20,15 | 41,30 | 94,08 | |
| MW | 6,10 | 20,15 | 41,26 | 93,41 | |
| SD | 0,18 | 0,13 | 0,20 | 0,67 | |
| Brot | 1 | 2 | 3 | 4 | |
| 1 | 2,14 | 5,76 | 112,76* | 31,16 | |
| 2 | 2,07 | 5,70 | 20,08 | 32,03 | |
| 3 | 2,17 | 5,74 | 20,15 | 31,22 | |
| MW | 2,12 | 5,74 | 20,12 | 31,47 | |
| SD | 0,05 | 0,03 | 0,05 | 0,49 | |
| Keks | 1 | 2 | 3 | 4 | |
| 1 | 2,25 | 4,92 | 9,87 | 18,48 | |
| 2 | 2,56 | 4,99 | 10,01 | 18,88 | |
| 3 | 2,57 | 4,85 | 9,81 | 18,61 | |
| MW | 2,57 | 4,92 | 9,90 | 18,66 | |
| SD | 0,01 | 0,07 | 0,10 | 0,20 | |

Tabelle A 28: Ermittelte Konzentrationen der Lipase FE-01 in den Referenzmaterialien

N=3; MW: Mittelwert; SD: Standardabweichung; Konzentrationslevel wie in 2.2.4 beschrieben; * Ausreißer nach Dean & Dixon-Test: aufgrund der kleinen Stichprobenzahl und der geringen Abweichung wurde der Wert nicht ausgeschlossen

| Lipase | Konzentrationslevel | | | |
|---------------|----------------------------|----------|----------|----------|
| Mehl | 1 | 2 | 3 | 4 |
| 1 | 0,55 | 1,29 | 2,65 | 5,47 |
| 2 | 0,54 | 1,28 | 2,67 | 5,37 |
| 3 | 0,56 | 1,29 | 2,70 | 5,33 |
| MW | 0,55 | 1,29 | 2,67 | 5,39 |
| SD | 0,01 | 0,01 | 0,03 | 0,07 |
| Brot | 1 | 2 | 3 | 4 |
| 1 | 0,37 | 0,59 | 2,92 | 6,60 |
| 2 | 0,37 | 0,58 | 3,15 | 6,60 |
| 3 | 0,37 | 0,54 | 3,25 | 6,56* |
| MW | 0,37 | 0,57 | 3,11 | 6,59 |
| SD | 0,00 | 0,03 | 0,17 | 0,02 |
| Keks | 1 | 2 | 3 | 4 |
| 1 | 0,66 | 1,42 | 2,80 | 5,26 |
| 2 | 0,62 | 1,37 | 2,79 | 5,37 |
| 3 | 0,66 | 1,43 | 2,78 | 5,47 |
| MW | 0,66 | 1,41 | 2,79 | 5,37 |
| SD | 0,00 | 0,03 | 0,01 | 0,11 |

Tabelle A 29: Ermittelte Konzentrationen der *alpha*-Amylase in den Referenzmaterialien

N=3 (Einfachbestimmung an 3 aufeinanderfolgenden Tagen); MW: Mittelwert; SD: Standardabweichung; Konzentrationslevel wie in 2.2.4 beschrieben; es wurden keine Ausreißer ermittelt (Dean & Dixon-Test)

| <i>alpha</i>-Amylase | Konzentrationslevel | | | |
|-----------------------------|----------------------------|----------|----------|----------|
| Brot | 1 | 2 | 3 | 4 |
| 1 | 2,26 | 3,94 | 13,01 | 19,75 |
| 2 | 2,33 | 4,60 | 15,08 | 18,55 |
| 3 | 2,34 | 5,72 | 18,75 | 22,42 |
| MW | 2,31 | 4,75 | 15,61 | 20,24 |
| SD | 0,04 | 0,90 | 2,91 | 1,98 |
| Keks | 1 | 2 | 3 | 4 |
| 1 | 0,87 | 2,34 | 5,77 | 8,47 |
| 2 | 1,04 | 2,37 | 4,70 | 10,01 |
| 3 | 0,95 | 2,77 | 6,10 | 12,34 |
| MW | 0,95 | 2,49 | 5,52 | 10,27 |
| SD | 0,09 | 0,24 | 0,73 | 1,95 |

Tabelle A 30: WFR Endo-1,4-Xylanase

N=3; MW: Mittelwert; SD: Standardabweichung; Konzentrationslevel wie in 2.2.4 beschrieben; * Ausreißer nach Dean & Dixon-Test; **aufgrund der kleinen Stichprobenzahl und der geringen Abweichung wurde der Wert nicht ausgeschlossen

| Endo-1,4-Xylanase | | Konzentrationslevel | | | |
|--------------------------|----------|----------------------------|----------|----------|--|
| Mehl | 1 | 2 | 3 | 4 | |
| 1 | 41,4 | 29,1 | 20,9 | 19,7 | |
| 2 | 64,3 | 21,4 | 17,8 | 18,7 | |
| 3 | 53,1 | 29,7 | 21,7 | 17,5 | |
| MW | 52,9 | 29,4 | 21,3 | 18,6 | |
| SD | 11,5 | 0,4 | 0,6 | 1,1 | |
| Brot | 1 | 2 | 3 | 4 | |
| 1 | 89,2 | 86,3** | 311,8* | 65,2 | |
| 2 | 101,3 | 83,1 | 86,6 | 63,4 | |
| 3 | 94,0 | 83,1 | 88,2 | 64,4 | |
| MW | 94,8 | 84,17 | 87,4 | 64,3 | |
| SD | 6,1 | 1,85 | 1,1 | 0,9 | |
| Keks | 1 | 2 | 3 | 4 | |
| 1 | 82,6 | 51,7 | 54,3 | 51,1 | |
| 2 | 83,1 | 52,7 | 56,2 | 49,5 | |
| 3 | 81,9 | 53,3 | 55,2 | 50,2 | |
| MW | 82,5 | 52,5 | 55,2 | 50,3 | |
| SD | 0,6 | 0,8 | 1,0 | 0,8 | |

Tabelle A 31: WFR *alpha*-Amylase

N=3; MW: Mittelwert; SD: Standardabweichung; Konzentrationslevel wie in 2.2.4 beschrieben; * Ausreißer nach Dean & Dixon-Test

| <i>alpha</i>-Amylase | | Konzentrationslevel | | | |
|-----------------------------|----------|----------------------------|----------|----------|--|
| Mehl | 1 | 2 | 3 | 4 | |
| 1 | 41,4 | 29,1 | 20,9 | 19,7 | |
| 2 | 64,3 | 21,4 | 17,8 | 18,7 | |
| 3 | 53,1 | 29,7 | 21,7 | 17,5 | |
| MW | 52,9 | 26,7 | 20,1 | 18,6 | |
| SD | 11,5 | 4,6 | 2,1 | 1,1 | |
| Brot | 1 | 2 | 3 | 4 | |
| 1 | 110,1 | 75,8 | 586,7* | 80,2 | |
| 2 | 106,6 | 75,0 | 104,5 | 82,5 | |
| 3 | 111,8 | 75,5 | 104,8 | 80,4 | |
| MW | 109,5 | 75,4 | 104,7 | 81,0 | |
| SD | 2,7 | 0,4 | 0,2 | 1,3 | |
| Keks | 1 | 2 | 3 | 4 | |
| 1 | 82,6 | 51,7 | 54,3 | 51,1 | |
| 2 | 83,1 | 52,7 | 56,2 | 49,5 | |
| 3 | 81,9 | 53,3 | 55,2 | 50,2 | |
| MW | 82,5 | 52,5 | 55,2 | 50,3 | |
| SD | 0,6 | 0,8 | 1,0 | 0,8 | |

Tabelle A 32: WFR Lipase

N=3; MW: Mittelwert; SD: Standardabweichung; Konzentrationslevel wie in 2.2.4 beschrieben; * Ausreißer nach Dean & Dixon-Test: aufgrund der kleinen Stichprobenzahl und der geringen Abweichung wurde der Wert nicht ausgeschlossen

| Lipase | Konzentrationslevel | | | |
|---------------|----------------------------|----------|----------|----------|
| Mehl | 1 | 2 | 3 | 4 |
| 1 | 152,9 | 102,0 | 98,0 | 101,3 |
| 2 | 150,0 | 101,5 | 99,0 | 99,4 |
| 3 | 156,7 | 102,3 | 99,9 | 98,7 |
| MW | 153,2 | 101,9 | 99,0 | 99,8 |
| SD | 2,2 | 0,4 | 1,0 | 1,3 |
| Brot | 1 | 2 | 3 | 4 |
| 1 | 136,7 | 56,1 | 108,9 | 121,7 |
| 2 | 136,7 | 54,5 | 117,6 | 121,7 |
| 3 | 136,7 | 51,3 | 121,3 | 121,1* |
| MW | 136,7 | 54,0 | 115,9 | 121,5 |
| SD | 0,0 | 4,6 | 5,5 | 0,3 |
| Keks | 1 | 2 | 3 | 4 |
| 1 | 184,2 | 112,6 | 103,8 | 97,5 |
| 2 | 172,8 | 108,5 | 103,2 | 99,4 |
| 3 | 183,2 | 113,7 | 102,9 | 101,3 |
| MW | 183,7 | 111,6 | 103,3 | 99,4 |
| SD | 0,4 | 2,4 | 0,4 | 1,9 |

Tabelle A 33: WFR nach Verdau mit TP

N=3; MW: Mittelwert; SD: Standardabweichung; TP: Temperaturprogramm; Konzentrationslevel wie in 2.2.4 beschrieben;

*Ausreißer nach Dean & Dixon-Test

| Endo-1,4-Xylanase | | Konzentrationslevel | | | |
|--------------------------|----------|----------------------------|----------|----------|--|
| Brot | 1 | 2 | 3 | 4 | |
| 1 | 96,8 | 80,3 | 87,2 | 85,8 | |
| 2 | 90,2 | 83,1 | 93,3 | 85,6 | |
| 3 | 93,6 | 83,9 | 89,8 | 85,1 | |
| MW | 93,5 | 82,4 | 90,1 | 85,5 | |
| SD | 3,3 | 1,9 | 3,0 | 0,3 | |
| Keks | 1 | 2 | 3 | 4 | |
| 1 | 101,4 | 76,9 | 77,1 | 79,5 | |
| 2 | 103,6 | 76,9 | 74,6 | 82,7 | |
| 3 | 96,9 | 206,1* | 72,4 | 84,8 | |
| MW | 100,6 | 76,9 | 74,7 | 82,3 | |
| SD | 3,4 | 0,0 | 2,4 | 2,6 | |
| alpha-Amylase | | Konzentrationslevel | | | |
| Brot | 1 | 2 | 3 | 4 | |
| 1 | 108,0 | 53,6 | 62,8 | 41,2 | |
| 2 | 104,6 | 54,2 | 62,8 | 42,6 | |
| 3 | 100,1 | 52,7 | 67,7 | 44,0 | |
| MW | 104,2 | 53,5 | 64,5 | 42,6 | |
| SD | 4,0 | 0,7 | 2,8 | 1,4 | |
| Keks | 1 | 2 | 3 | 4 | |
| 1 | 62,8 | 34,5 | 27,3 | 28,4 | |
| 2 | 68,5 | 35,1 | 28,1 | 30,3 | |
| 3 | 65,4 | 336,9* | 27,6 | 26,2 | |
| MW | 65,6 | 34,8 | 27,7 | 28,3 | |
| SD | 2,8 | 0,4 | 0,4 | 2,1 | |
| Lipase | | Konzentrationslevel | | | |
| Brot | 1 | 2 | 3 | 4 | |
| 1 | 116,1 | 64,8 | 105,3 | 118,6 | |
| 2 | 111,3 | 61,6 | 111,1 | 115,4 | |
| 3 | 117,0 | 60,9 | 118,7 | 119,8 | |
| MW | 114,8 | 62,4 | 111,7 | 117,9 | |
| SD | 3,1 | 2,1 | 6,7 | 2,3 | |
| Keks | 1 | 2 | 3 | 4 | |
| 1 | 149,1 | 115,8 | 111,1 | 110,8 | |
| 2 | 176,6 | 119,6 | 109,2 | 105,7 | |
| 3 | 163,3 | 118,3 | 112,9 | 108,2 | |
| MW | 163,0 | 117,9 | 111,1 | 108,2 | |
| SD | 13,8 | 1,9 | 1,8 | 2,5 | |

Tabelle A 34: WFR in Mehl nach Quantifizierung mit Matrix-Kalibrierung

N=3; MW: Mittelwert; SD: Standardabweichung; Konzentrationslevel wie in 2.2.4 beschrieben; es wurden keine Ausreißer ermittelt (Dean & Dixon-Test)

| | Konzentrationslevel | | | |
|--------------------------|---------------------|----------|----------|----------|
| Endo-1,4-Xylanase | 1 | 2 | 3 | 4 |
| 1 | 201,9 | 155,2 | 123,3 | 112,2 |
| 2 | 300,0 | 111,5 | 100,8 | 114,7 |
| 3 | 279,8 | 164,0 | 129,5 | 103,2 |
| MW | 260,6 | 143,6 | 117,9 | 110,0 |
| SD | 51,8 | 28,1 | 15,1 | 6,1 |
| alpha-Amylase | 1 | 2 | 3 | 4 |
| 1 | 193,4 | 202,7 | 201,6 | 214,0 |
| 2 | 203,9 | 202,7 | 206,7 | 220,4 |
| 3 | 196,9 | 201,6 | 204,1 | 222,7 |
| MW | 198,1 | 202,3 | 204,1 | 219,0 |
| SD | 5,3 | 0,6 | 2,6 | 4,6 |

Tabelle A 35: WFR alpha-Amylase (Probe 2 und 4) nach Quantifizierung mit Standardaddition

N=1

| Für die Quantifizierung mit Standardaddition verwendete Kalibrierung | | | |
|--|--------|---------|---------|
| | KP1 | KP2 | KP3 |
| zudotierte Analytmasse [mg] | 0 | 1,08 | 2,06 |
| Analyt Fläche | | | |
| Probe 2 | 23500 | 1550000 | 2920000 |
| Probe 4 | 119000 | 1870000 | 3460000 |
| Mit Standardaddition ermittelte Analytkonzentration [mg/kg] | | | |
| Probe 2 | 18,50 | | |
| Probe 4 | 73,26 | | |
| Berechnete WFR [%] | | | |
| Probe 2 (Sollkonzentration 9,03 mg/kg) | 204,90 | | |
| Probe 4 (Sollkonzentration 38,70 mg/kg) | 189,30 | | |

Tabelle A 36: WFR Endo-1,4-Xylanase nach Quantifizierung mit isotopenmarkierten Peptidstandards

N=3; MW: Mittelwert; SD: Standardabweichung; Konzentrationslevel wie in 2.2.4 beschrieben; es wurden keine Ausreißer ermittelt (Dean & Dixon-Test)

| Endo-1,4-Xylanase | | Konzentrationslevel | | | |
|-------------------|------|---------------------|------|------|--|
| Mehl | 1 | 2 | 3 | 4 | |
| 1 | - | - | 15,7 | 16,5 | |
| 2 | - | - | 16,2 | 17,9 | |
| 3 | - | - | 18,4 | 13,0 | |
| MW | - | - | 17,0 | 15,8 | |
| SD | - | - | 1,9 | 2,5 | |
| Brot | 1 | 2 | 3 | 4 | |
| 1 | 57,5 | 30,4 | 27,5 | 17,0 | |
| 2 | 61,1 | 31,1 | 24,6 | 17,1 | |
| 3 | 63,6 | 32,6 | 24,1 | 16,9 | |
| MW | 60,7 | 31,4 | 25,4 | 17,0 | |
| SD | 3,1 | 1,1 | 1,8 | 0,1 | |
| Keks | 1 | 2 | 3 | 4 | |
| 1 | 50,7 | 23,0 | 14,2 | 14,4 | |
| 2 | 46,8 | 20,9 | 16,3 | 13,2 | |
| 3 | 46,2 | 21,2 | 16,0 | 13,1 | |
| MW | 47,9 | 21,7 | 15,5 | 13,5 | |
| SD | 2,5 | 1,2 | 1,1 | 0,7 | |

Tabelle A 37: WFR *alpha*-Amylase nach Quantifizierung mit isotopenmarkierten Peptidstandards

N=3; MW: Mittelwert; SD: Standardabweichung; Konzentrationslevel wie in 2.2.4 beschrieben; * Ausreißer nach Dean & Dixon-Test

| <i>alpha</i> -Amylase | | Konzentrationslevel | | | |
|-----------------------|------|---------------------|--------|------|--|
| Mehl | 1 | 2 | 3 | 4 | |
| 1 | 84,4 | 46,6 | 44,1 | 32,5 | |
| 2 | 76,8 | 37,3 | 38,4 | 39,5 | |
| 3 | 70,9 | 41,0 | 37,6 | 29,4 | |
| MW | 77,4 | 41,6 | 40,1 | 33,8 | |
| SD | 6,8 | 4,6 | 3,6 | 5,2 | |
| Brot | 1 | 2 | 3 | 4 | |
| 1 | 60,5 | 28,5 | 236,1* | 29,5 | |
| 2 | 83,2 | 27,3 | 36,8 | 30,7 | |
| 3 | 70,8 | 28,4 | 38,4 | 30,0 | |
| MW | 71,5 | 28,1 | 37,6 | 30,0 | |
| SD | 11,4 | 0,6 | 1,1 | 0,6 | |
| Keks | 1 | 2 | 3 | 4 | |
| 1 | 46,3 | 26,0 | 24,8 | 20,4 | |
| 2 | 60,3 | 28,2 | 21,7 | 22,0 | |
| 3 | 64,1 | 25,8 | 21,9 | 20,5 | |
| MW | 56,9 | 26,7 | 22,8 | 21,0 | |
| SD | 9,4 | 1,3 | 1,7 | 0,9 | |

Tabelle A 38: WFR Lipase nach Quantifizierung mit isopenmarkierten Peptidstandards

N=3; MW: Mittelwert; SD: Standardabweichung; Konzentrationslevel wie in 2.2.4 beschrieben; es wurden keine Ausreißer ermittelt (Dean & Dixon-Test)

| Lipase | Konzentrationslevel | | | |
|--------|---------------------|------|------|------|
| Brot | 1 | 2 | 3 | 4 |
| 1 | 86,1 | 24,3 | 17,4 | 19,1 |
| 2 | 85,5 | 23,1 | 14,9 | 16,9 |
| 3 | 82,9 | 24,2 | 14,5 | 21,7 |
| MW | 84,8 | 23,9 | 15,6 | 19,2 |
| SD | 1,7 | 0,7 | 1,6 | 2,4 |
| Keks | 1 | 2 | 3 | 4 |
| 1 | 70,7 | 32,0 | 20,8 | 16,3 |
| 2 | 68,8 | 26,6 | 19,1 | 12,0 |
| 3 | 67,9 | 24,7 | 17,0 | 11,4 |
| MW | 69,2 | 27,8 | 19,0 | 13,2 |
| SD | 1,5 | 3,8 | 1,9 | 2,7 |

Tabelle A 39: Ermittelte Signal-Rausch-Verhältnisse an der Nachweis- bzw. Bestimmungsgrenze

N=3; S/N: Signal-Rausch-Verhältnis; NG: Nachweisgrenze; BG: Bestimmungsgrenze

| S/N | Endo-1,4-Xylanase | | <i>alpha</i> -Amylase | | Lipase | |
|------|-------------------|------|-----------------------|------|--------|------|
| | NG | BG | NG | BG | NG | BG |
| Mehl | 8,5 | 32,0 | 3,1 | 10,1 | 6,0 | 18,0 |
| | 6,0 | 18,0 | 3,5 | 15,4 | 5,8 | 19,1 |
| | 7,1 | 15,3 | 3,9 | 13,2 | 7,8 | 15,7 |
| Brot | 5,5 | 26,5 | 8,6 | 26,5 | 6,2 | 20,1 |
| | 3,0 | 10,5 | 7,5 | 15,3 | 5,8 | 13,2 |
| | 4,7 | 19,5 | 5,3 | 10,0 | 4,9 | 17,0 |
| Keks | 5,0 | 11,5 | - | 12,0 | 8,5 | 19,8 |
| | 6,0 | 13,0 | - | 12,5 | 8,9 | 12,5 |
| | 4,5 | 10,5 | - | 15,0 | 6,8 | 16,0 |

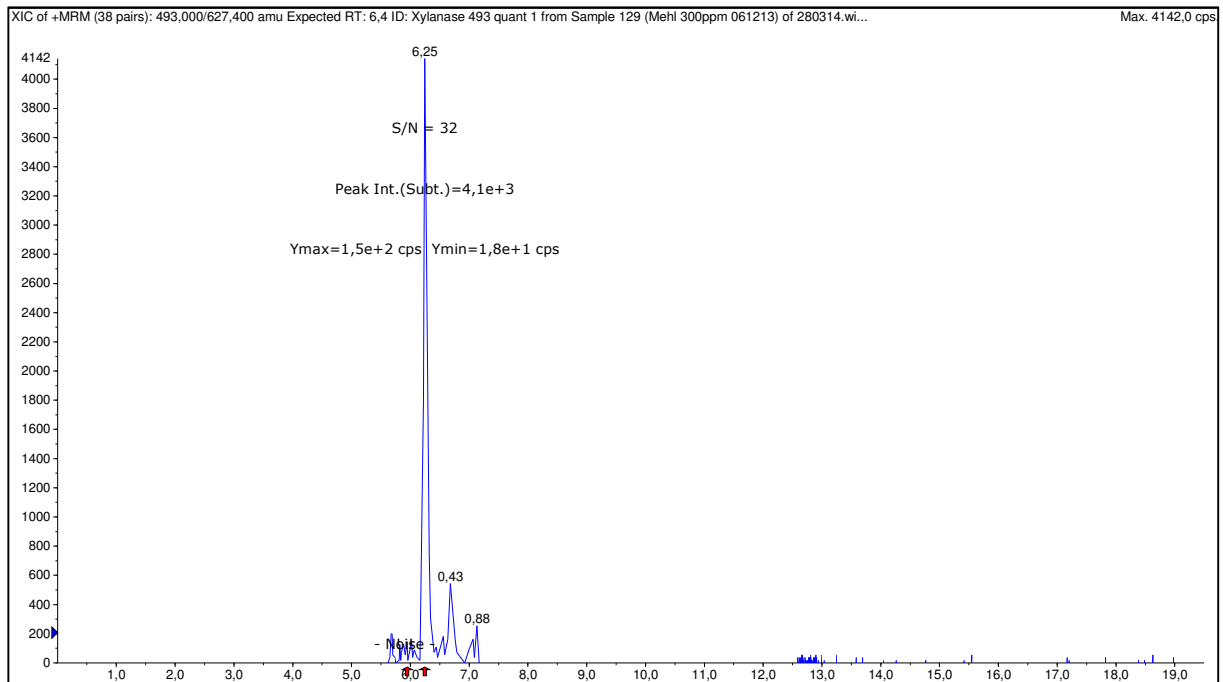


Abbildung A 4: Signal-Rausch-Verhältnis der Endo-1,4-Xylanase an der Bestimmungsgrenze

Y: Achse: Intensität in cps; x-Achse: Retentionszeit in Minuten; dargestellt wurde repräsentativ die Matrix Mehl (15,6 mg/kg) und das Quantifizierungs-Massenfragment 493,0 → 627,4

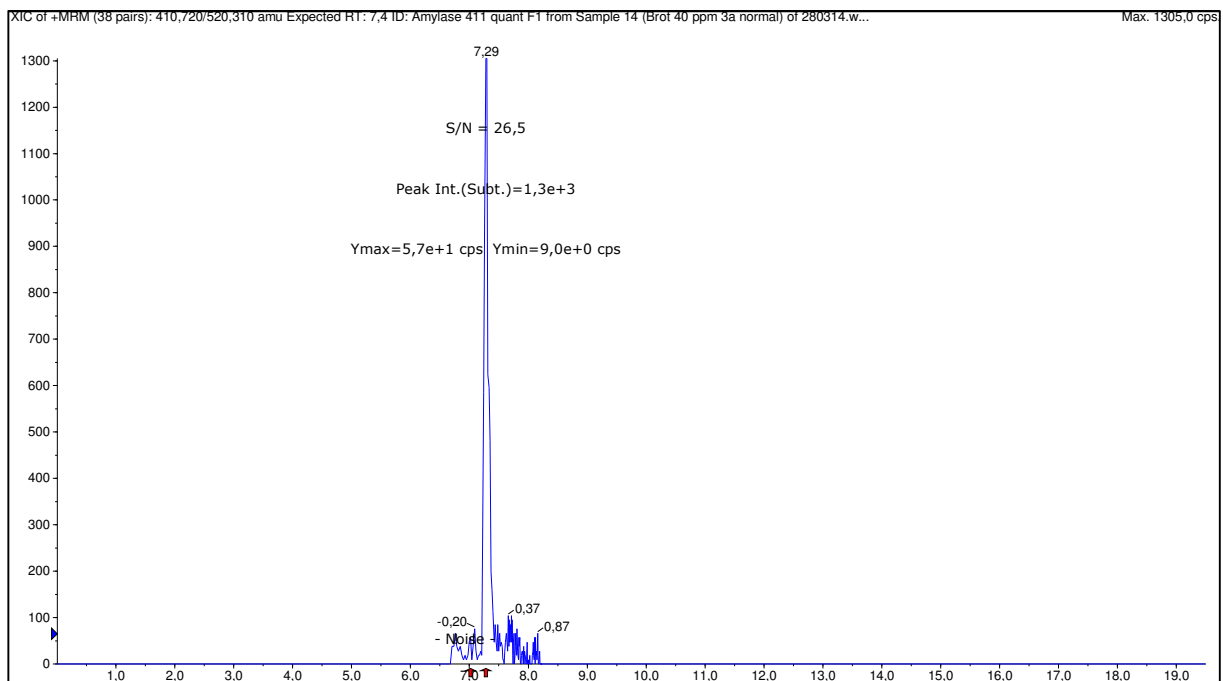


Abbildung A 5: Signal-Rausch-Verhältnis der α -Amylase an der Bestimmungsgrenze

Dargestellt wurde repräsentativ die Matrix Mehl (7,61 mg/kg) und das Quantifizierungs-Massenfragment 410,7 → 520,3

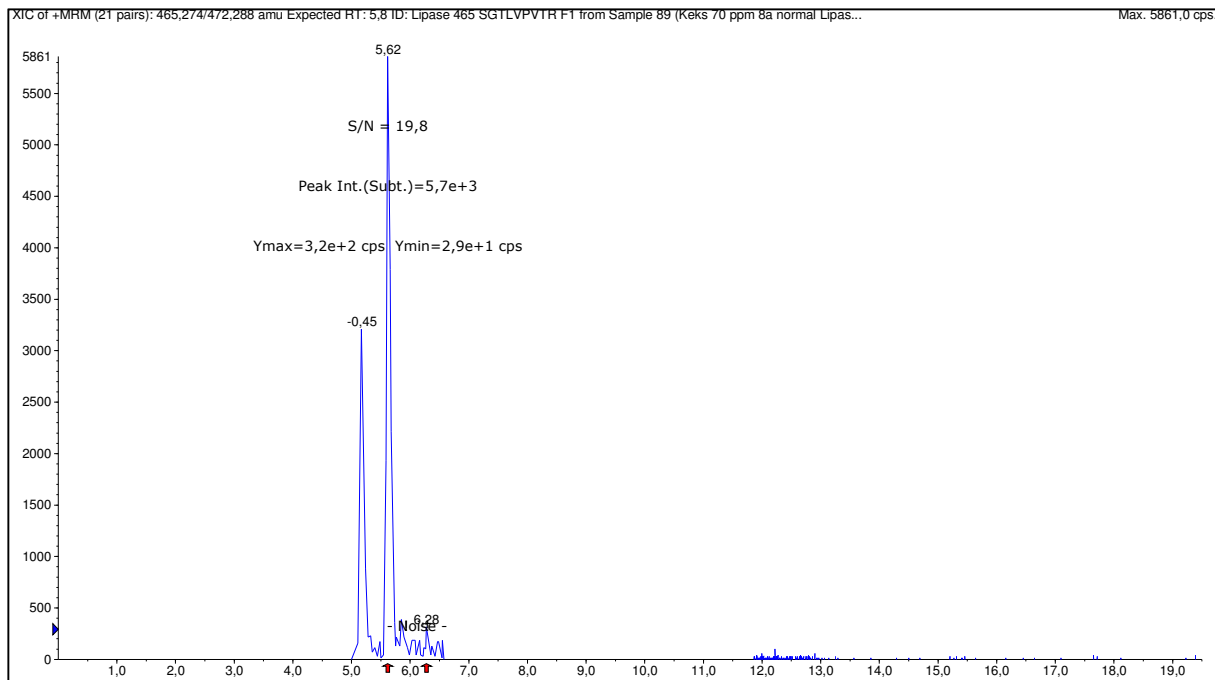


Abbildung A 6: Signal-Rausch-Verhältnis der Lipase in der Matrix Keks 1,26 mg/kg

Dargestellt wurde repräsentativ die Matrix Keks (1,26 mg/kg) und das Quantifizierungs-Massenfragment 465,3 → 472,3

Tabelle A 40: Peakflächen im LM-Blank, Matrix-Blank und an der BG zur Prüfung der Spezifität

N=15, PF LM: Peakfläche im Lösungsmittel-Blank, PF Matrix: Peakfläche in enzymfreiem Matrix-Blank, PF BG: Peakfläche an der Bestimmungsgrenze des Enzyms

| | Endo-1,4-Xylanase | | | <i>alpha</i> -Amylase | | | Lipase | | |
|-------------|-------------------|-----------|-------|-----------------------|-----------|-------|--------|-----------|-------|
| | PF LM | PF Matrix | PF BG | PF LM | PF Matrix | PF BG | PF LM | PF Matrix | PF BG |
| Mehl | 20 | 213 | 18600 | 42 | 3060 | 17200 | 0 | 98 | 50800 |
| | 0 | 336 | 9150 | 42 | 3050 | 18500 | 64 | 188 | 50500 |
| | 27 | 20 | 13400 | 81 | 3180 | 20400 | 0 | 2300 | 54200 |
| | 0 | 41 | 14600 | 0 | 903 | 20600 | 0 | 1790 | 53100 |
| | 102 | 41 | 13500 | 42 | 4410 | 21200 | 0 | 3600 | 49300 |
| | 27 | 0 | 13900 | 0 | 1540 | 17000 | 0 | 986 | 52600 |
| | 21 | 85 | 19200 | 42 | 3710 | 20700 | 0 | 3290 | 51800 |
| | 69 | 21 | 21500 | 81 | 2250 | 16900 | 0 | 2820 | 52400 |
| | 0 | 41 | 18500 | 0 | 339 | 14800 | 0 | 3480 | 62200 |
| | 0 | 1950 | 14600 | 81 | 1460 | 17300 | 193 | 8620 | 54300 |
| | 0 | 24 | 11500 | 0 | 956 | 16700 | 51 | 72 | 51000 |
| | 27 | 0 | 15600 | 81 | 114 | 16900 | 0 | 26 | 72400 |
| | 0 | 78 | 11900 | 42 | 541 | 16800 | 0 | 70 | 52300 |
| | 21 | 82 | 10200 | 42 | 2840 | 15600 | 0 | 1070 | 48500 |
| | 27 | 102 | 14700 | 0 | 2840 | 17400 | 0 | 1130 | 50800 |
| Brot | 20 | 137 | 30700 | 42 | 128 | 12000 | 0 | 132 | 4730 |
| | 0 | 0 | 22800 | 42 | 488 | 11900 | 64 | 892 | 4140 |
| | 27 | 350 | 22800 | 81 | 1060 | 11700 | 0 | 993 | 5370 |
| | 0 | 1280 | 21700 | 0 | 1100 | 12800 | 0 | 499 | 4370 |
| | 102 | 263 | 21500 | 42 | 1170 | 10400 | 0 | 416 | 4190 |
| | 27 | 1200 | 23500 | 0 | 1190 | 13400 | 0 | 387 | 6580 |
| | 21 | 802 | 22700 | 42 | 1760 | 10400 | 0 | 384 | 4000 |
| | 69 | 638 | 22800 | 81 | 403 | 11600 | 0 | 1140 | 5170 |
| | 0 | 86 | 22100 | 0 | 2330 | 9850 | 0 | 1230 | 5950 |
| | 0 | 47 | 19000 | 81 | 1460 | 11800 | 193 | 1450 | 7580 |
| | 0 | 345 | 20900 | 0 | 2840 | 11700 | 51 | 821 | 5070 |
| | 27 | 978 | 22400 | 81 | 1040 | 13300 | 0 | 535 | 6460 |
| | 0 | 608 | 22000 | 42 | 2590 | 13000 | 0 | 628 | 5150 |
| | 21 | 59 | 24300 | 42 | 1990 | 11300 | 0 | 642 | 4520 |
| | 27 | 475 | 21100 | 0 | 1360 | 10500 | 0 | 845 | 6490 |
| Keks | 20 | 27 | 20200 | 42 | 377 | 7610 | 0 | 1770 | 19200 |
| | 0 | 688 | 20200 | 42 | 1960 | 7510 | 64 | 840 | 20200 |
| | 27 | 321 | 21400 | 81 | 882 | 7250 | 0 | 1480 | 16600 |
| | 0 | 218 | 19200 | 0 | 364 | 7890 | 0 | 927 | 16600 |
| | 102 | 503 | 20500 | 42 | 1170 | 7510 | 0 | 1280 | 17700 |
| | 27 | 1170 | 18300 | 0 | 705 | 7550 | 0 | 1040 | 17500 |
| | 21 | 835 | 19800 | 42 | 1480 | 7380 | 0 | 799 | 19700 |
| | 69 | 70 | 19500 | 81 | 521 | 8550 | 0 | 1210 | 21200 |
| | 0 | 433 | 21700 | 0 | 1230 | 6550 | 0 | 5270 | 19200 |
| | 0 | 1620 | 18700 | 81 | 148 | 7330 | 193 | 4080 | 15800 |
| | 0 | 285 | 17800 | 0 | 1780 | 6760 | 51 | 4370 | 18200 |
| | 27 | 1050 | 18300 | 81 | 842 | 5290 | 0 | 4550 | 19500 |
| | 0 | 1970 | 20700 | 42 | 392 | 5290 | 0 | 4530 | 21900 |
| | 21 | 1500 | 21300 | 42 | 1500 | 5690 | 0 | 5550 | 25300 |
| | 27 | 570 | 20600 | 0 | 690 | 6870 | 0 | 4440 | 19900 |

Abbildungsverzeichnis Anlage

| | |
|--|-----|
| Abbildung A 1: BSA Standard-Kalibrierreihe für die Quantifizierung des Proteingehaltes..... | 156 |
| Abbildung A 2: HELOS-Partikelgrößenanalyse für Testmaterialien Matrix Brot | 158 |
| Abbildung A 3: HELOS-Partikelgrößenanalyse für Testmaterialien Matrix Mehl..... | 159 |
| Abbildung A 4: Signal-Rausch-Verhältnis der Endo-1,4-Xylanase an der Bestimmungsgrenze | 174 |
| Abbildung A 5: Signal-Rausch-Verhältnis der <i>alpha</i> -Amylase an der Bestimmungsgrenze | 174 |
| Abbildung A 6: Signal-Rausch-Verhältnis der Lipase in der Matrix Keks 1,26 mg/kg..... | 175 |

Tabellenverzeichnis Anlage

| | |
|---|-----|
| Tabelle A 1: Verwendete Chemikalien | 144 |
| Tabelle A 2: Verwendete Puffer und Lösungen | 145 |
| Tabelle A 3: Verwendete Geräte | 147 |
| Tabelle A 4: Verwendete Software | 148 |
| Tabelle A 5: Detailliertes Arbeitsschema zur Fettsäureanalytik..... | 148 |
| Tabelle A 6: Detailliertes Arbeitsschema zur Zuckeranalytik | 149 |
| Tabelle A 7: Einzelwerte der Schnellfeuchtebestimmung sowie berechneter Feuchteverlust | 149 |
| Tabelle A 8: Einzelwerte der TPA-Messung ausgedrückt als Härte..... | 150 |
| Tabelle A 9: Ergebnisse der Volumenbestimmung | 150 |
| Tabelle A 10: Ergebnisse der Fettsäureanalytik an Tag 1, Tag 3 und Tag 7..... | 150 |
| Tabelle A 11: Ergebnisse der Fettsäureanalytik der Brote mit Erdnussöl | 152 |
| Tabelle A 12: Zur Verfügung gestellte Daten zur Fettsäureanalytik von Toastbrot..... | 152 |
| Tabelle A 13: Ergebnisse der Zuckeranalytik..... | 153 |
| Tabelle A 14: Ergebnisse der sensorischen Prüfung der Testmaterialien – Teil 1..... | 154 |
| Tabelle A 15: Ergebnisse der sensorischen Prüfung der Testmaterialien – Teil 2..... | 155 |
| Tabelle A 16: <i>Pharmacia Peptid Standard</i> | 156 |
| Tabelle A 17: Gehaltsbestimmung von <i>alpha</i> -Amylase sowie Endo-1,4-Xylanase in Fungamyl | 157 |
| Tabelle A 18: Ermittelte Konzentrationen Lipase FE-01..... | 160 |
| Tabelle A 19: Ermittelte Konzentrationen Lipase FE-01..... | 160 |
| Tabelle A 20: Lösungen der synthetischen Peptidstandard (Markerpeptide) | 161 |
| Tabelle A 21: Synthetische Peptidstandards (isotopenmarkierte Markerpeptide) | 161 |
| Tabelle A 22: Lösungen der synthetischen Peptidstandard (isotopenmarkierte Markerpeptide) | 162 |
| Tabelle A 23: MRM-Tabelle der ausgewählten Markerpeptide..... | 163 |
| Tabelle A 24: Ermittelte Schwankungen der Ionenverhältnisse der MRM-Massenübergänge | 164 |
| Tabelle A 25: area ratios der einzelnen Konzentrationslevel der Kalibrierreihe..... | 165 |
| Tabelle A 26: Ermittelte Konzentrationen der Endo-1,4-Xylanase in den Referenzmaterialien..... | 166 |
| Tabelle A 27: Ermittelte Konzentrationen der <i>alpha</i> -Amylase in den Referenzmaterialien..... | 166 |
| Tabelle A 28: Ermittelte Konzentrationen der Lipase FE-01 in den Referenzmaterialien..... | 167 |
| Tabelle A 29: Ermittelte Konzentrationen der <i>alpha</i> -Amylase in den Referenzmaterialien..... | 167 |
| Tabelle A 30: WFR Endo-1,4-Xylanase | 168 |
| Tabelle A 31: WFR <i>alpha</i> -Amylase | 168 |
| Tabelle A 32: WFR Lipase | 169 |
| Tabelle A 33: WFR nach Verdau mit TP..... | 170 |
| Tabelle A 34: WFR in Mehl nach Quantifizierung mit Matrix-Kalibrierung..... | 171 |
| Tabelle A 35: WFR <i>alpha</i> -Amylase (Probe 2 und 4) nach Quantifizierung mit Standardaddition..... | 171 |
| Tabelle A 36: WFR Endo-1,4-Xylanase nach Quantifizierung mit isotopenmarkierten Peptidstandards | 172 |
| Tabelle A 37: WFR <i>alpha</i> -Amylase nach Quantifizierung mit isotopenmarkierten Peptidstandards | 172 |
| Tabelle A 38: WFR Lipase nach Quantifizierung mit isotopenmarkierten Peptidstandards | 173 |
| Tabelle A 39: Ermittelte Signal-Rausch-Verhältnisse an der Nachweis- bzw. Bestimmungsgrenze | 173 |
| Tabelle A 40: Peakflächen im LM-Blank, Matrix-Blank und an der BG zur Prüfung der Spezifität..... | 176 |

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende wissenschaftliche Arbeit selbstständig und ohne Hilfe Dritter verfasst habe. Andere als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel wurden nicht verwendet. Die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Abschnitte sind als solche kenntlich gemacht. Diese wissenschaftliche Arbeit hat in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner Prüfungsbehörde vorgelegen und wurde auch nicht veröffentlicht.

Potsdam, den 15. März 2016

Unterschrift

Danksagung

Nach Jahren intensiver Arbeit liegt sie nun vor Ihnen: meine Dissertation. Damit ist es an der Zeit, mich bei denjenigen zu bedanken, die mich in dieser herausfordernden, aber auch ungemein lohnenden Phase meiner akademischen Laufbahn unterstützt und begleitet haben. Zuerst danke ich Prof. Rawel dafür meine Arbeit in seinem Arbeitskreis anfertigen zu dürfen. Die zahlreichen unterstützenden und bei der Ideenfindung ins unendliche gehende Diskussionen und Besprechungen mit ihm werden mir noch lange in Erinnerung bleiben. Ich danke weiterhin Frau Prof. Pawelzik sowie Frau Prof. Schwarz für die Bereiterklärung Gutachterinnen meiner Arbeit zu werden.

Die Arbeit wurde in Zusammenarbeit mit der IGV GmbH ausgeführt. Auch hier standen mir viele Kollegen mit helfenden Händen und jederzeit offenen Ohren zur Seite. Ein besonderer Dank gilt dabei Herrn Dr. Huschek, Frau Bauermann, Herrn Prohassek und Herrn Kaiser.

Eine wissenschaftliche Arbeit ist nie das Werk einer einzelnen Person. Daher danke ich allen, die an dem Projekt mitgearbeitet haben, besonders jedoch Tina Buchholz, Phillis Wieland und Josephine Bönick.

Mein besonderer Dank geht an Frau Majohr und Herr Körber, die mir stets Ansprechpartner waren und vor allem den schriftlichen Teil meiner Arbeit durch ihre Ideen, ihre Anregungen und ihre konstruktive Kritik bereicherten. Ein weiterer großer Dank bei der vorherigen Beurteilung des Manuskriptes gilt Frau Dr. Andrea Henze, Herrn Dr. Thomas Homann, Frau Dr. Doreen Huschek und Herrn Dr. Frank Neuschäfer-Rube.

Meiner Familie sowie allen meinen lieben Freunden danke ich für die Ausdauer, Ruhe und Geduld, mit der sie mir stets zur Seite standen und mich in schwierigen Phasen immer wieder aufgemuntert haben. Wie ein solider Stein an meiner rechten Seite stand meine Freundin Yvonne Löwenstein jederzeit an meiner Seite und hat mich immer wieder aufgefangen und motiviert das Ziel vor Augen zu haben. Vielen Dank dafür.

Mein allergrößter Dank jedoch geht an meinen liebevollen Mann Marcel, der mir stets Mut zugesprochen und mich in meiner Arbeit bestärkt hat. Er hat mir den Rücken frei gehalten und stand an jedem Moment des Zweifels hinter mir. Mitten auf dem manchmal steinigen Weg einer Promotion hat er mir mit unserem goldigen Sohn Felix ein großes Licht geschenkt. Ich genieße jeden Tag mit euch Beiden und Danke euch für die wundervollen gemeinsamen Momente, die den Alltag mit Beruf und Promotion manchmal einfach vergessen ließen.