Neuer sensitiver Assay zur quantitativen Bestimmung von Endo- und Exo-Amylase-Aktivitäten

TLB
Technologie-Lizenz-Büro
der Baden-Württembergischen Hochschulen GmbH

Neuer Assay zur Bestimmung von Amylase-Aktivitäten mit deutlich verbesserter Sensitivität, geringeren Kosten und einfacherer Durchführbarkeit als vergleichbare Assays.

- Deutlich gesteigerte Sensitivität gegenüber kommerziellen Vergleichsprodukten: Nachweisgrenze von 0,25 pkat mL-1 bzw. 4,5 µM
- Deutlich kostengünstiger: nur 3,4 Cent pro Ansatz im Vergleich zu ca. 1,95 Euro bei Ceralpha bzw. 1,93 Euro bei Betamyl3
- Beliebig skalierbar durch Anwendung in Mikrotiterplatten
- Direkte Anwendung durch Verwendung natürliches Substrat Stärke
- Einfach durchführbar bei 40° C

Kontakt
Dr. Dirk Windisch
TLB GmbH
Ettlinger Straße 25
76137 Karlsruhe | Germany
Telefon +49 721-79004-0
windisch@tlb.de | www.tlb.de

Entwicklungsstand
TRL4

Patentsituation
PCT/EP2023/050804 anhängig

Referenznummer
21/046TLB

Service
Die Technologie-Lizenz-Büro GmbH ist mit der Verwertung der Technologie beauftragt und bietet Unternehmen die Möglichkeit der Lizenznahme.

Anwendungsbereiche

Mögliche Anwendungen sind in allen Bereichen zu finden, in denen Amylasen verwendet werden. In der Lebensmittelindustrie könnte der Test zur Bestimmung von (Rest-)Amylasen in Getreide und Getreideprodukten, Molkereiprodukten und verwandten Lebens- und Futtermitteln eingesetzt werden. In der Waschmittelbranche knacken Amylasen stärkehaltige Flecken, z. B. in Soßen. In der Textilindustrie werden Amylasen eingesetzt, um die schützende Stärke nach dem Weben von Textilien, die starken mechanischen Belastungen ausgesetzt sind, zu entfernen.

Hintergrund

Amylasen werden in vielen Bereichen eingesetzt, wie z.B. in der Lebensmittelindustrie, z.B. bei der Herstellung von Backwaren oder Glukosesirupen, in der Textilindustrie und in der Waschmittelindustrie. Aufgrund der breiten Anwendung von Amylasen gibt es viele Bereiche, in denen die

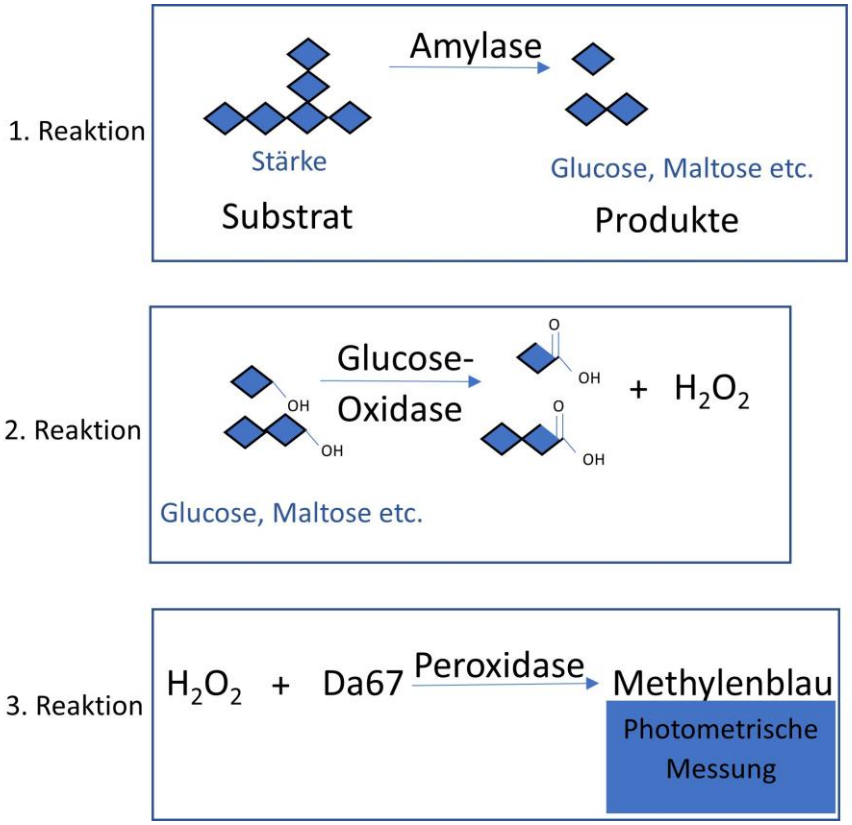
empfindliche und quantitative Bestimmung von Amylaseaktivitäten von großer Bedeutung ist. Dazu gehört z.B. die Bestimmung der Amylaseaktivitäten in Weizenmehlen, da diese einen großen Einfluss auf die Qualität von Backwaren haben. Auch die Bestimmung der Restaktivitäten von zugesetzten Amylasepräparaten in gebackenem Brot ist im Hinblick auf eine mögliche Deklarationspflicht von Bedeutung.

Problemstellung

In der Literatur sind bereits zahlreiche Assays zur Bestimmung der Amylaseaktivität beschrieben worden. Mit den handelsüblichen, in der Technik bekannten Kits können Amylaseaktivitäten bis zu einer Enzymaktivität von 0,05 U/ml (entspricht 0,84 nkat/ml) z.B. in Lebensmitteln zuverlässig bestimmt werden. Die Empfindlichkeit dieser Assays ist jedoch für bestimmte Fragestellungen nicht ausreichend, z.B. für die Bestimmung der Restaktivität bestimmter Amylasen in Brot. So ist die Empfindlichkeit bisheriger Assays zur Bestimmung von Amylase-Aktivitäten gering. Des Weiteren erfordern einige der bestehenden Tests viele und manchmal komplexe Schritte (z. B. Erhitzen auf 95 °C). Außerdem verwenden einige bekannte Assays synthetische Substrate, was für die Berechnung der erforderlichen Aktivitätsmengen nachteilig sein kann.

Lösung

Wissenschaftler der Universität Hohenheim haben einen verbesserten spektrometrischen Nachweistest zur Bestimmung von Endo- und Exo-Amylase-Aktivitäten in Proben entwickelt. Der neue Nachweistest zeichnet sich durch eine deutlich verbesserte Sensitivität, einfache Durchführbarkeit und durch eine deutliche Kostenersparnis im Vergleich zu anderen kommerziellen Tests aus. Bei dem neuartigen Nachweisverfahren kommen zwei zusätzliche Enzyme, nämlich eine Glucoseoxidase und eine Peroxidase, sowie der Farbstoff Methylenblau zum Einsatz um damit das in der zu untersuchenden Probe vorkommende natürliche Substrat Stärke nachzuweisen. Vergleichsstudien des neuen Nachweisverfahrens mit verfügbaren Alternativen haben gezeigt, dass das erfindungsgemäße Verfahren 4,7- bzw. 4,2-mal empfindlicher ist als die kommerziellen Assays Ceralpha (Bestimmung der Endo-Amylase-Aktivität) und Betamyl3 (Bestimmung der Exo-Amylase-Aktivität). Im Gegensatz zu den zuvor genannten kommerziellen Assays nutzt der neue Nachweistest direkt Stärke als Substrat (und keine synthetischen Substrate), wodurch das Nachweisverfahren industrienah bei verschiedenen Applikationen eingesetzt werden kann. Beispielweise kann das Verfahren in der Lebensmittelindustrie eingesetzt werden um die Amylase-Aktivität in Weizenmehl zu bestimmen. Mit Kosten von ca. 3,4 Euro-Cents pro Ansatz ist der neue Amylase-Test auch deutlich kostengünstiger als andere Nachweisverfahren.



Ablauf des Assays bestehend aus drei Einzelreaktionen: Spaltung langkettige Kohlenhydrate zu Mono- und Disaccharide durch die Amylase, weitere Umsetzung der Mono- und Disaccharide durch die Glucose-Oxidase zu Wasserstoffperoxid und den entsprechenden Säure-Derivaten. Als Elektronenakzeptor für diese zweite Reaktion dient der Farbstoff Da67, welcher durch die Peroxidase zu dem blauen Farbstoff Methylenblau reduziert wird. Der Nachweis erfolgt dann mittels photometrischer Messungen von Methylenblau. [Abb.: L. Fischer, Insitut für Biotechnologie, Universität Hohenheim]