

**Struktur-Eigenschaftsbeziehungen  
nichtenzymatisch glykosylierter Molkenproteine**

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades

**Doctor rerum naturalium**

**(Dr. rer. nat.)**

vorgelegt

der Fakultät Mathematik und Naturwissenschaften

der Technischen Universität Dresden

von

Diplom-Lebensmittelchemikerin

Bozena B. Mulsow, geb. Wegrzynek

geboren am 15. April 1975 in Kattowitz (Polen)

Gutachter                    Prof. Dr. T. Henle  
                                     Prof. Dr. H. Rohm  
                                     Dr. A. Bockhardt

Eingereicht am:            05. Februar 2008

Tag der Disputation:      11. Juni 2008



# Inhaltsverzeichnis

**Abbildungsverzeichnis – v**

**Tabellenverzeichnis – ix**

- 1 Einleitung und Zielstellung – 1**
- 2 Theoretischer Teil – 3**
  - 2.1 Zusammensetzung und Eigenschaften von Kuhmilch – 3
  - 2.2 Milchproteine – 4
    - 2.2.1 Caseine – 4
    - 2.2.2 Molkenproteine – 5
  - 2.3 Nichtenzymatische Glykosylierung (Maillard-Reaktion) – 8
    - 2.3.1 Glykosyliertes  $\beta$ -Lactoglobulin – 9
    - 2.3.2 Bedeutung der Maillard-Reaktion in Lebensmitteln – 10
  - 2.4 Denaturierung der Molkenproteine – 11
    - 2.4.1 Auswirkung der Maillard Reaktion auf das Denaturierungsverhalten – 15
    - 2.4.2 Methoden zur Charakterisierung der Denaturierung – 16
  - 2.5 Funktionelle Eigenschaften der Milchproteine – 19
    - 2.5.1 Auswirkung der Maillard-Reaktion auf die funktionellen Eigenschaften – 23
    - 2.5.2 Methoden zur Charakterisierung der Emulgiereigenschaften – 25
  - 2.6 Schmelzkäse – 29
- 3 Experimenteller Teil – 35**
  - 3.1 Chemikalien – 35
  - 3.2 Material und Geräte – 37
  - 3.3 Proteinbestimmung nach Kjeldahl – 40
  - 3.4 Lactosylierung der Molkenproteine – 41
  - 3.5 Bestimmung der Lysinmodifizierung (Glykosylierungsgrad) – 41
    - 3.5.1 Probenvorbereitung für die Aminosäureanalyse – 41

- 
- 3.5.2 Aminosäureanalyse (ASA) – 42
  - 3.5.3 Auswertung – 42
  - 3.6 Bestimmung des Oligomerisierungsgrades – 42
    - 3.6.1 Probenvorbereitung für die Gelpermeationschromatographie (GPC) – 42
    - 3.6.2 Gelpermeationschromatographie (GPC) – 43
  - 3.7 Dialyse der Molkenlösungen – 43
  - 3.8 Erhitzungsexperimente – 44
  - 3.9 Bestimmung des Denaturierungsgrades (RP-HPLC) – 44
    - 3.9.1 Durchführung – 45
    - 3.9.2 Analytische HPLC – 46
  - 3.10 Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) – 47
    - 3.10.1 Lösungen – 47
    - 3.10.2 Probenvorbereitung für die SDS-PAGE – 50
    - 3.10.3 Herstellung eines Gradientengels – 51
    - 3.10.4 Elektrophoresebedingungen – 51
    - 3.10.5 Detektion – 52
  - 3.11 Differential-Scanning-Calorimetrie (DSC) – 52
    - 3.11.1 Probenvorbereitung und Durchführung – 52
    - 3.11.2 DSC-Analyse – 53
  - 3.12 Fluoreszenzanalytik – 53
    - 3.12.1 Probenherstellung – 53
    - 3.12.2 Hitzedenaturierung – 54
    - 3.12.3 Messparameter – 54
  - 3.13 Bestimmung der Oberflächenspannung – 54
    - 3.13.1 Erhitzungsversuch – 55
    - 3.13.2 Messung mit Wilhelmy Platte Pt 11 – 55
    - 3.13.3 Bestimmung der kritischen Mizellbildungskonzentration (CMC) – 56
  - 3.14 Trübungsmessung (photometrisch) – 57
    - 3.14.1 Herstellen der Emulsion – 57
    - 3.14.2 Messung der Trübung – 57
  - 3.15 Mikroskopische Untersuchung (Lichtmikroskopie) – 58
  - 3.16 Herstellung der Modellschmelzkäsezubereitung – 59
  - 3.17 Bestimmung des NPN-Wertes – 59
    - 3.17.1 Durchführung der Bestimmung – 60

- 3.17.2 Berechnung des NPN-Wertes – 61
- 3.18 Texture Analyser (Festigkeitsmessung) – 61
- 3.19 Penetrometer (Festigkeitsmessung) – 62
- 3.20 Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) – 63
  - 3.20.1 Probenvorbereitung für die TEM – 63
  - 3.20.2 Durchführung der TEM – 65
- 3.21 Rasterelektronenmikroskopie (REM) – 65
  - 3.21.1 Durchführung der REM – 66
- 3.22 Sensorische Untersuchungen – 66
- 3.23 Bestimmung der Geruchsschwellenwerte – 67
  - 3.23.1 Geruchsschwellenwerte in Wasser – 67
  - 3.23.2 Geruchsschwellenwerte in Molkenproteinlösungen – 69
- 4 Auswertung und Diskussion der Ergebnisse – 71**
  - 4.1 Nichtenzymatische Glykosylierung – 71
  - 4.2 Auswirkung der Glykosylierung auf das Denaturierungsverhalten – 76
    - 4.2.1 Charakterisierung mittels RP-HPLC – 77
    - 4.2.2 Charakterisierung mittels Elektrophorese – 81
    - 4.2.3 Charakterisierung mittels der Differential-Scanning-Calorimetrie – 83
    - 4.2.4 Charakterisierung mittels Fluoreszenzanalytik – 89
    - 4.2.5 Zusammenfassung der Denaturierungsstudien – 91
  - 4.3 Auswirkung der Glykosylierung auf die Emulgiereigenschaften – 92
    - 4.3.1 Oberflächenspannung und kritische Mizellbildungskonzentration (CMC) – 93
    - 4.3.2 Trübungsmessung – 97
    - 4.3.3 Lichtmikroskopische Untersuchungen – 100
    - 4.3.4 Zusammenfassung der Emulgiereigenschaften – 103
  - 4.4 Nichtenzymatische Glykosylierung und ihre Auswirkungen im Lebensmittel – 104
    - 4.4.1 Festigkeit – 105
    - 4.4.2 Mikrostruktur – 112
    - 4.4.3 Zusammenfassung der Auswirkungen der nichtenzymatischen Glykosylierung im Lebensmittel – 117
  - 4.5 Orientierende Untersuchungen zur Aromabindung – 118
    - 4.5.1 Beschreibende Sensorik – 118

- 4.5.2 Studien zur Interaktion der Molkenproteine mit Aromastoffen – 119
- 4.5.3 Zusammenfassung der Aromastudien – 127
- 5 Zusammenfassung – 129**
- 6 Summary – 133**
- Literaturverzeichnis – 137**

# Abbildungsverzeichnis

- 2-1 Das  $\beta$ -Lactoglobulin Molekül mit antiparallelen  $\beta$ -Faltblatt-Strukturen (cyan), der  $\alpha$ -Helix (grün) und den ungeordneten Bereichen (grau) sowie den Lysinresten (blau) und den bei der Bildung der beiden Disulfidbrücken beteiligten Cysteinresten (rot) – 6
- 2-2 Schema der frühen Maillard-Reaktion am Beispiel von Lactose mit der Lysinseitenkette von Proteinen – 9
- 2-3 Produkte der Säurehydrolyse von Lactuloselysin. (a) Furosin, (b) Lysin, (c) Pyrodi-sin. – 11
- 2-4 Denaturierungsgrade von  $\beta$ -Lactoglobulin – 13
- 2-5 Schema der Messanordnung einer Differenzthermoanalyse mit einem allgemeinen DSC-Thermogramm;  $T_f$ : Umwandlungstemperatur (aus: Physikalisch Chemisches Praktikum für Fortgeschrittene, Universität Köln) – 18
- 2-6 Abhängigkeit der Oberflächenspannung ( $\sigma$ ) von der Konzentration (c) – 26
- 2-7 Wirkungsweise ionenaustauschender Salze (Schmelzsalze) am Beispiel von Dinatriumhydrogenphosphat – 31
- 3-1 Bedampfung der Proben nach Gefrierbruch (Pt/C = Platin/Kohlenstoff; C = Kohlenstoff) – 64
- 3-2 Verdünnungsschema der Aromastoffe für die Bestimmung der Geruchsschwellenwerte – 68
- 4-1 Darstellung der unterschiedlich glykosylierten Molkenpulver; unerhitzt (a) bzw. erhitzt bei 60 °C für (b) 24, (c) 60 und (d) 96 Stunden – 73
- 4-2 SDS-PAGE der lactosylierten Molkenproteinpräparate. M: Molgrößenmarker;  $\beta$ -Lg und  $\alpha$ -La unter reduzierenden Bedingungen; von links nach rechts Molkenpräparate mit steigender Lysinmodifizierung (4,6 %; 16,7 %; 22,4 %; 26,2 %) 1-4: reduzierende Bedingungen, 5-8: nicht-reduzierende Bedingungen – 74

- 4-3 HPLC-Chromatogramm der bei pH 4,6 löslichen Molkenproteine mit unterschiedlichen Glykosylierungsgraden [ $Lys_{mod}$ ] im Vergleich zum  $\beta$ -Lg-Standard – 75
- 4-4 HPLC-Chromatogramm der bei pH 4,6 löslichen Molkenproteine mit zwei unterschiedlichen Glykosylierungsgraden [ $Lys_{mod}$ ] vor und nach Erhitzung (10 min, 80 °C) – 78
- 4-5 Abhängigkeit der Löslichkeit bei pH 4,6 (definiert als Gesamtpeakfläche) für unterschiedlich glykosylierte Molkenproteine von der Erhitzungszeit für  $\beta$ -Lg – 79
- 4-6 Elektrophoretische Trennung von Molkenproteinen mit unterschiedlichen Glykosylierungsgraden, nicht-reduzierende Bedingungen (a) nach Erhitzung bei 80 °C, 10 min. M: Marker; von links nach rechts Molkenpräparate mit steigender Lysinmodifizierung: 1: 4,6 %; 2: 10,2 %; 3: 13,0 %; 4: 16,7 %; 5: 22,4 %. (b) Vergleich zweier Molkenpräparate vor und nach Erhitzung (80 °C, 10 min). M: Marker, Molkenpräparate mit unterschiedlicher Lysinmodifizierung, 2a: 10,2 % vor Erhitzung; 2: 10,2 % nach Erhitzung; 4: 22,4 % vor Erhitzung; 4: 22,4 % nach Erhitzung – 81
- 4-7 Mittelwerte der Denaturierungsgrade (= Verhältnis Dimer zu Monomer) des  $\beta$ -Lg nach Erhitzung (80 °C, 10 min) in Abhängigkeit der Lysinmodifizierung – 83
- 4-8 DSC-Thermogramme dreier unterschiedlich glykosylierter Molkenproteine, nach Dialyse (normiert) – 84
- 4-9 Umwandlungstemperatur des  $\beta$ -Lg in Abhängigkeit von der Lysinmodifizierung mit und ohne freie Lactose; ermittelt mittels DSC – 85
- 4-10 DSC-Thermogramm mit Umwandlungstemperatur des  $\alpha$ -Lactalbumins in „Arla“-Proteinpulver – 86
- 4-11 Das  $\beta$ -Lactoglobulin Molekül mit den beiden Disulfidbrücken (rot), 15 Lysinresten (blau); gesondert gekennzeichnet  $Lys^{47}$  und  $Lys^{91}$  (orange) – 87
- 4-12 Fluoreszenzspektren von zwei Molkenproteinlösungen mit unterschiedlichem Glykosylierungsgrad vor und nach Erhitzung (85 °C, 10 min) – 91
- 4-13 Abhängigkeit der Mizellbildungskonzentration (CMC) vom Glykosylierungsgrad der Molkenproteine im Vergleich zu Natriumcaseinat und Lecithin; bestimmt nach der Wilhelmy-Plattenmethode mittels Tensiometrie bei pH 6,1 – 94
- 4-14 Abhängigkeit der CMC von dem Glykosylierungsgrad vor und nach Erhitzung im Vergleich zu Natriumcaseinat (Na-Cas.); bestimmt nach der Wilhelmy-Plattenmethode mittels Tensiometrie bei pH 6,1 – 96

- 4-15 Abhängigkeit der Emulgieraktivität von der Lysinmodifizierung vor und nach Erhitzen bei drei unterschiedlichen pH-Werten; erhitzt bei 80 °C, 10 min, schwarz: vor Erhitzung, rot: nach Erhitzung – 98
- 4-16 Lichtmikroskopische Aufnahmen zum Vergleich der Tröpfchengröße zwischen Molkenprotein mit 4,6 %  $Lys_{mod}$  (A) und 16,7 %  $Lys_{mod}$  (B) – 102
- 4-17 Tröpfchengrößenverteilung der dispersen Phase der mit Molkenprotein stabilisierten Emulsionen, nach lichtmikroskopischer Untersuchung – 102
- 4-18 Paretodiagramm des Box-Behnken-Versuches; Zielgröße: Festigkeit (Temp: Temperatur, Gly-Grad: Glykosylierungsgrad, (L) linearer Zusammenhang, (Q) quadratischer Zusammenhang und (-) negative Festigkeit – 108
- 4-19 Darstellung der Auswirkungen der Einflussgrößen ( $Lys_{mod}$ , NPN, Temperatur) auf die Zielgröße Festigkeit; bestimmt mittels Texture Analyser – 109
- 4-20 Dreidimensionale Darstellung der Zusammenhänge Festigkeit-Schmelztemperatur-Glykosylierungsgrad – 110
- 4-21 Festigkeit in Abhängigkeit von Schmelztemperatur und von Lysinmodifizierung für Schmelzkäsezubereitungen mit unterschiedlichen NPN-Werten [mg/g] – 111
- 4-22 Transmissionsmikroskopische Aufnahmen von zwei Schmelzkäsezubereitungen, hergestellt bei 80 °C unter Einsatz von Molkenprotein (a) mit je 10,2 %  $Lys_{mod}$ , (b) mit je 16,7 %  $Lys_{mod}$ . – 114
- 4-23 Transmissionsmikroskopische Aufnahmen von zwei Schmelzkäsezubereitungen, hergestellt bei 90 °C unter Einsatz von Molkenprotein (a) mit je 10,2 %  $Lys_{mod}$ , (b) mit je 16,7 %  $Lys_{mod}$ . – 115
- 4-24 Rasterelektronische Aufnahmen von zwei Schmelzkäsezubereitungen, hergestellt bei 80 °C unter Einsatz von Molkenprotein (a) mit 10,2 %  $Lys_{mod}$ , (b) mit 16,7 %  $Lys_{mod}$ . (S: Serum, P: Proteinmatrix, F: Fettkugel) – 116
- 4-25 Rasterelektronische Aufnahmen von zwei Schmelzkäsezubereitungen, hergestellt bei 90 °C unter Einsatz von Molkenprotein (a) mit 10,2 %  $Lys_{mod}$ , (b) mit 16,7 %  $Lys_{mod}$  – 117
- 4-26 Geruchsschwellenwerte für Diacetyl,  $\delta$ -Decalacton und 2-Hexanon und in Wasser (grau), 4,6 %  $Lys_{mod}$  (grün) und 16,7 %  $Lys_{mod}$  (blau) Molkenproteinlösung – 121
- 4-27 Geruchsschwellenwerte für Fureneol und Dimethyltrisulfid in Wasser (grau), 4,6 %  $Lys_{mod}$  (grün) und 16,7 %  $Lys_{mod}$  (blau) Molkenproteinlösung – 122
- 4-28 Zusammenstellung der Geruchsschwellenwerte in Molkenproteinlösungen mit unterschiedlichen Glykosylierungsgrad – 123

4-29 Das  $\beta$ -Lactoglobulin Molekül mit antiparallelen  $\beta$ -Faltblatt-Strukturen (cyan), der  $\alpha$ -Helix (grün) und den ungeordneten Bereichen (grau) sowie den Lysinresten (blau), den bei der Bildung der beiden Disulfidbrücken beteiligten Cysteinresten (rot) und der „hydrophoben Tasche“ (schwarz). Lys<sup>47</sup> und Lys<sup>91</sup> sind gesondert (gold) gekennzeichnet – 125

# Tabellenverzeichnis

- 2-1 Die Zusammensetzung der Kuhmilch – 3
- 3-1 Elutionsgradient für die RP-HPLC – 46
- 3-2 Herstellung eines Gradientengeles für die SDS-PAGE – 51
- 3-3 Elektrophoreseprogramm – 52
- 3-4 Rezeptur zur Herstellung einer Modellschmelzkäsezubereitung; mit langkettigen Polyphosphat\* und Trinatriumorthophosphat\*\* als Schmelzsalze – 59
- 3-5 Konzentrationen in [ppm] der Aromastoffe in destilliertem Wasser zur Bestimmung der Geruchsschwellenwerte – 68
- 3-6 Konzentrationen in [ppm] der Aromastoffe in 2 %-iger Proteinlösung zur Bestimmung der Geruchsschwellenwerte – 69
- 4-1 Grad der Lysinmodifizierung [%] ( $Lys_{mod}$ ) in kommerziell erhältlichen Molkenproteinpräparaten mit Angabe der Standardabweichung; bestimmt mit der Furosin-Methode – 72
- 4-2 Grad der Lysinmodifizierung [%] ( $Lys_{mod}$ ) des Molkenproteinpräparates in Abhängigkeit von der Erhitzungszeit [h] bei 60 °C (mit Standardabweichung); bestimmt mit der Furosin-Methode – 72
- 4-3 Ergebnisse der Hitzedenaturierung in  $\beta$ -Lactoglobulin-Standard und in Molkenproteinlösungen vor und nach Erhitzung (85 °C, 10 min) – 90
- 4-4 Zusammenfassung der Auswirkungen der Glykosylierung auf die Denaturierungseigenschaften der Molkenproteine – 92
- 4-5 Abhängigkeit der Emulsionsstabilität von der Lysinblockierung; dargestellt für drei ausgewählte pH-Werte, vor und nach Erhitzung (80 °C, 10 min) – 99
- 4-6 Zusammenfassung der Auswirkungen der Glykosylierung auf die Emulgiereigenschaften der Molkenproteine – 104
- 4-7 Rezeptur einer standardisierten Schmelzkäsezubereitung – 105

- 4-8 Box-Behnken-Plan für drei Faktoren zur Bestimmung der Festigkeitseinflüsse. Schmelztemperatur, Glykosylierungsgrad ( $Lys_{mod}$ ) und NPN-Wert als Einflussparameter. – 107
- 4-9 Triangeltest zur Bestimmung der abweichenden Probe (Kriterium:  $Lys_{mod}$  bzw. Herstellungstemperatur); \* Probe von Modellschmelzkäsezubereitung unter Einsatz von Molkenproteinpulvern mit unterschiedlichem Glykosylierungsgraden (=  $Lys_{mod}$ ).  $\alpha > 0,05$  nicht signifikant;  $\alpha = 0,01$  hoch signifikant;  $\alpha = 0,001$  sehr hoch signifikant – 119
- 4-10 Literaturdaten zu Geruchsschwellen- und Hydrophobizitätswerten von ausgewählten Aromastoffen – 120

# Notation

$\alpha$ -La	$\alpha$ -Lactalbumin
$\beta$ -Lg	$\beta$ -Lactoglobulin
$\lambda$	Wellenlänge
$\sigma$	Oberflächenspannung
Arg	Arginin (Aminosäure)
ASA	Aminosäureanalyse
c	Konzentration
CCD	Charge-coupled Device
CMC	Critical Micellization Concentration
Cys	Cystein (Aminosäure)
d	Durchmesser
Da	Dalton
DAD	Diodenarraydetektor
dest.	destilliert
DSC	Differential scanning calorimetry
EA	Emulgieraktivität
EAI	Emulgieraktivitätsindex
ES	Emulsionsstabilität
GC-MS	Gaschromatographie-Massenspektrometrie
GPC	Gelpermeationschromatographie
HPLC	high pressure liquid chromatography
IDF	international dairy federation
IP	isoelektrischer Punkt
kDa	kilo-Dalton
Lys	Lysin (Aminosäure)
Lys <sub>mod</sub>	Lysinmodifizierung

---

M	Molarität
MP	Molkenprotein
N	Normalität bzw. Newton
Na-Cas.	Natriumcaseinat
NPN	Nichtprotein-Stickstoff
O/W	Öl-in-Wasser
PNR	Penetrometer
REM	Rasterelektronmikroskop (-ie)
RP-HPLC	reverse phase high pressure liquid chromatography
Ser	Serin (Aminosäure)
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SMUF	Synthetisches Milchultrafiltrat
TA	Texture Analyser
TEM	Transmissionselektronenmikroskop (-ie)
UV	ultra violet
W/O	Wasser-in-Öl

# 1 Einleitung und Zielstellung

Während der Herstellung, Erhitzung und Lagerung von Lebensmitteln bzw. Lebensmittel-Rohstoffen laufen an Proteinen vielfältige chemische Umsetzungen ab. Von zentraler Bedeutung sind dabei die komplexen Reaktionen zwischen reduzierenden Kohlenhydraten und freien Aminogruppen, Aminosäuren und Proteinen (Maillard-Reaktion). Unter diesem Reaktionskomplex werden allgemein nichtenzymatische Glykosylierungs- und Quervernetzungsreaktionen zusammengefasst. Während über die strukturellen Veränderungen und die daraus resultierenden physikalischen Konsequenzen im Falle der enzymatischen Proteinmodifizierung (z. B. durch Einsatz von Transglutaminase) relativ viel bekannt ist, sind nichtenzymatische Proteinveränderungen hinsichtlich ihrer funktionellen Auswirkungen bislang nur unzureichend untersucht.

Eine gezielte Modifizierung kann die Möglichkeit bieten, kostengünstig funktionalisierte Proteine zu erhalten. Perspektivisch ist durch diese Funktionalisierung eine optimierte Verwendung des Rohstoffs Protein als strukturbestimmender Lebensmittelinhaltsstoff möglich. Vor dem Hintergrund dieser Anwendungsaspekte ist aus sowohl lebensmittelchemischer als auch lebensmitteltechnologischer Sicht eine umfassende Grundlagenforschung zur Klärung der molekularen Veränderungen und der daraus resultierenden funktionellen Konsequenzen notwendig. Die durch Glykosylierungsreaktionen eintretenden Veränderungen an den Milchproteinen sind stark mit Änderungen ihrer funktionellen Eigenschaften, wie z. B. Löslichkeit, Fettbindevermögen, Wasserbindevermögen, pH-Stabilität, Hitzestabilität, Gelbildung, Adsorption an Grenzflächen sowie Schäumungs- und Emulgiervermögen, verbunden. Systematische Studien, insbesondere zur Beurteilung des Effektes technologisch relevanter Glykosylierungsgrade auf die Proteinfunktionalität, stehen jedoch aus.

Ziel dieser Arbeit war es deshalb, gezielt in kommerziell erhältlichem Molkenpulver technologisch relevante Glykosylierungsgrade (im niedrigen bis mittleren Bereich) zu realisieren und analytisch zu charakterisieren. Anschließend sollten in den Molkenproteinpräparaten das Denaturierungsverhalten sowie die funktionellen Eigenschaften (insbesondere Emulgiereigenschaften) in Abhängigkeit vom Glykosylierungsgrad mit unterschiedlichen

Methoden bestimmt werden. Der aus praktischer Sicht relevante Einfluss der Glykosylierung auf die sensorischen Eigenschaften wurde einerseits in Molkenproteinlösungen und andererseits in einem komplexen System (Modell-Schmelzkäsezubereitung) erfasst. Schließlich galt es den Einfluss der Glykosylierung auf die Mikrostruktur und die Festigkeit am Beispiel der Modell-Schmelzkäsezubereitung zu untersuchen und daraus unmittelbare Konsequenzen für die technologische Praxis abzuleiten.

## 2 Theoretischer Teil

### 2.1 Zusammensetzung und Eigenschaften von Kuhmilch

Milch ist nach § 2, Satz 1 der Milchverordnung „...das durch ein- oder mehrmaliges tägliches Melken gewonnene unveränderte Eutersekret von zur Milchgewinnung gehaltenen Kühen“. Milch, im allgemeinen als Kuhmilch zu verstehen, ist ein polydisperses System, was bedeutet, dass die Milchinhaltsstoffe grobdispers (Lipide), kolloidaldispers (Proteine), molekulardispers (Kohlenhydrate) sowie im ionogenen Zustand (Mineralsalze) vorliegen. In der wässrigen Phase der Milch, dem so genannten Serum, sind die Lactose, Vitamine und Salze gelöst, d. h. molekular verteilt. Darin suspendiert sind die Caseinmizellen sowie separat emulgiert die von einer Proteinmembran umgebenen Fetttropfchen ([Kirchmeier 1987](#), [Berger et al. 1989](#)).

Die Inhaltsstoffe der Milch mit der Angabe der durchschnittlichen Gehalte sind in der Tabelle 2-1 dargestellt.

Die Hauptkomponente des Fettes sind Triglyceride (95 %) neben Phospholipiden, Chol-

**Tab. 2-1:** Die Zusammensetzung der Kuhmilch ([Berger et al. 1989](#))

Bestandteil	Durchschnittlicher Gehalt in Milch (Gew. %)	Schwankungsbreite (Gew. %)
Wasser	87,2	85,8 - 88,1
Fett	3,8	3,4 - 6,1
Protein	3,4	2,8 - 4,4
Lactose	4,7	4,5 - 5,0
Asche	0,7	0,6 - 0,8
Minorkomponenten	0,1	-

esterol, freien Fettsäuren und Diglyceriden. Die Fettkugeln sind im Milchserum dispergiert und variieren stark in ihrer Größe (0,5 - 10  $\mu\text{m}$ ) (Schlimme und Buchheim 1995).

Mit einem Gehalt von 4,7 % ist Lactose (4-O- $\beta$ -D-Galactopyranosyl-D-glucoopyranose) das dominierende Kohlenhydrat der Kuhmilch und hat als Einzelkomponente den höchsten Anteil an der Trockenmasse der Milch. Die Lactose tritt in zwei verschiedenen Konfigurationen – der  $\alpha$ - und der  $\beta$ -Form – auf ( $\alpha : \beta = 1 : 1,55$ ). Neben den Mineralstoffen zählt Lactose zu den osmotisch wirksamen Substanzen der Milch. Die weiteren Kohlenhydrate der Milch, wie z. B. die Glucose und Galactose, treten nur in Spuren auf (Schlimme und Buchheim 1995).

Die Asche setzt sich aus anorganischen Salzen zusammen und umfasst Mineralstoffe, Spurenelemente sowie Citrat. Von ernährungsphysiologischer Bedeutung ist der relativ hohe Anteil an Calcium (0,1 - 0,14 %) und Phosphor (0,08 - 0,11 %). Die Mineralstoffe in der Milch haben eine puffernde und stabilisierende Wirkung auf den kolloiden Zustand der Milchproteine (Berger et al. 1989, Belitz et al. 2001).

## 2.2 Milchproteine

Milch enthält eine Vielzahl von Proteinen, die sich in ihrer Zusammensetzung und damit in ihren Eigenschaften unterscheiden. Milchproteine werden analog ihrer Isolierung in zwei Gruppen – Caseine und Molkenproteine – eingeteilt. Caseine sind Phosphoproteine und liegen in Form makromolekularer Komplexe, den so genannten Caseinmizellen vor. Diese Fraktion lässt sich aufgrund ihrer Struktur durch isoelektrische Fällung bzw. durch Zentrifugation von den unter diesen Bedingungen löslichen Proteinen, den Molkenproteinen, trennen. Das Mengenverhältnis dieser zwei Eiweißgruppen liegt im Mittel bei 82:18 (Absolutanteile in der Milch Caseine: 2,7 % und Molkenproteine: 0,6 %) (Kirchmeier 1987, Mehrens und Reimerdes 1991, Wong et al. 1996).

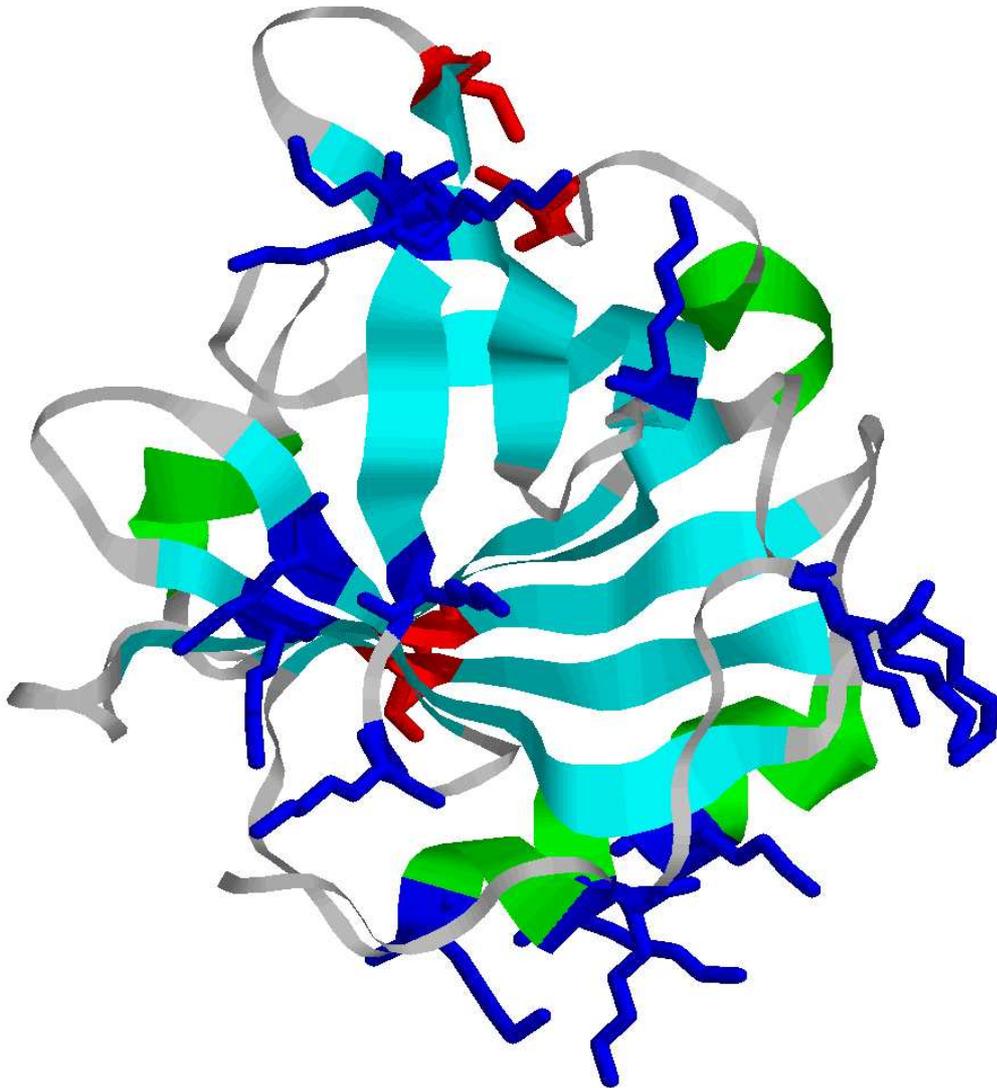
### 2.2.1 Caseine

Casein ist die wichtigste Proteinfraction der Milch und macht einen Anteil von 82 % am Gesamtprotein aus. Als Caseinfraction bezeichnet man den bei einem pH-Wert von 4,6 ausfällbaren Anteil, welcher in drei Hauptkomponenten ( $\alpha_s$ -,  $\beta$ - und  $\kappa$ -Casein) unterscheidbar ist (Wong et al. 1996). Die Komponenten der Caseinfraction liegen in der Milch zu 95 % in

kolloidal-disperser Form, als Caseinmizellen vor, die Calciumphosphate enthalten (Kirchmeier 1987, Wong et al. 1996). Auf Grund eines relativ hohen Anteils der Aminosäure Prolin und damit des Fehlens einer Tertiärstruktur sind diese Proteine sehr hitzestabil und damit nicht denaturierbar. Die hohe Flexibilität von Caseinen ist zudem durch das Fehlen von Cystein und Cystin verursacht und damit das Ausbleiben von inter- und intramolekularen Disulfidbrücken. Diese Proteine zeichnen sich demnach hauptsächlich durch nicht strukturell geordnete Bereiche, so genannte Random coils aus. Dieser Aspekt wird vor allem am Beispiel von  $\beta$ -Casein deutlich, welches aus ca. 10 %  $\alpha$ -Helix, 13 %  $\beta$ -Faltblatt und 77 % Random coil besteht (Cheftel et al. 1992). Alle Caseine besitzen einen isoelektrischen Punkt (IP) von etwa 5. Auf Grund ihres hohen Gehaltes an Asparagin- und Glutaminsäure werden sie deshalb als saure Proteine bezeichnet. Caseine werden im allgemeinen als sehr hydrophobe Proteine angesehen, wobei die dafür verantwortlichen Aminosäurereste nicht statistisch sondern gehäuft auf die Moleküle verteilt sind, d. h. die Caseine weisen stark hydrophobe Partien gegenüber sehr hydrophilen Teilsequenzen auf (Schlimme et al. 1986, Cheftel et al. 1992, Wong et al. 1996).

### 2.2.2 Molkenproteine

Molkenproteine sind globuläre Proteine, zu denen hauptsächlich das  $\beta$ -Lactoglobulin (56 %) und das  $\alpha$ -Lactalbumin (21 %) gehören. Als Minorkomponenten sind des weiteren Serumalbumin (7 %), Immunglobuline (14 %) und Lactoferrin (2 %) vertreten, wobei jedoch auf die letzten nicht näher eingegangen wird. Im Gegensatz zu den Caseinen enthalten die Molkenproteine weniger Glutaminsäure und Prolin, was einerseits zur Erhöhung des isoelektrischen Punktes und andererseits zur Ausbildung ausgeprägter Sekundärstrukturen führt (Schlimme und Buchheim 1995). Auf Grund von hohen Gehalten an  $\alpha$ -Helixstrukturen sowie an den Aminosäuren Cystein und Cystin sind Molkenproteine hitzeokoagulierbar und damit denaturierbar. Sie bleiben nach der sauren Ausfällung der Caseine (pH 4,6) in Lösung (Mehrens und Reimerdes 1991, Schlimme und Buchheim 1995). Die mengenmäßig stärkste Komponente der Molkenproteinfraktion (2-3 g/l Milch) ist das  $\beta$ -Lactoglobulin ( $\beta$ -Lg) mit einer Sequenz von 162 Aminosäuren und einem stark hydrophoben Charakter (Abb. 2-1). Die ausgeprägte Sekundärstruktur enthält etwa 15 %  $\alpha$ -Helix (Dreifach-Windung), 50 %  $\beta$ -Faltblatt (antiparallel verlaufende Strukturen) und 15-20 %  $\beta$ -Turn sowie ungeordnete Strukturen (Kirchmeier 1987, Mehrens und Reimerdes 1991, Cheftel et al. 1992, Hambling et al. 1992). Die verschiedenen genetischen Varianten – im wesentlichen die Varianten A (Molekularge-



**Abb. 2-1:** Das  $\beta$ -Lactoglobulin Molekül mit antiparallelen  $\beta$ -Faltblatt-Strukturen (cyan), der  $\alpha$ -Helix (grün) und den ungeordneten Bereichen (grau) sowie den Lysinresten (blau) und den bei der Bildung der beiden Disulfidbrücken beteiligten Cysteinresten (rot). (Dargestellt mit dem Programm RasMol 2.6)

wicht von 18362 Da) und B (Molekulargewicht von 18276 Da) – unterscheiden sich leicht in der Primärstruktur (Hambling et al. 1992, Wong et al. 1996).  $\beta$ -Lactoglobulin enthält fünf Cysteinreste, von denen das Cystein<sup>121</sup> mit freier Thiolgruppe (SH-Gruppe) vorliegt und die anderen (Cys<sup>106</sup> und Cys<sup>119</sup> sowie Cys<sup>66</sup> und Cys<sup>160</sup>) zwei Disulfidbrücken ausbilden (siehe Abb. 2-1), womit eine stabile räumliche Struktur bewirkt wird (Hambling et al. 1992, Wong et al. 1996). Die Verteilung der polaren, unpolaren und ionisierbaren Reste erfolgt gleichmäßig entlang des Polypeptidstranges, weshalb die Amphiphilie weniger stark ausgeprägt ist als beispielsweise bei den Caseinen. Durch hydrophobe Reste im Molekülinneren sind Wechselwirkungen und Assoziationen mit anderen Proteinen begrenzt, wobei jedoch  $\beta$ -Lactoglobulinmoleküle je nach pH-Wert über hydrophobe Wechselwirkungen polymerisieren können.

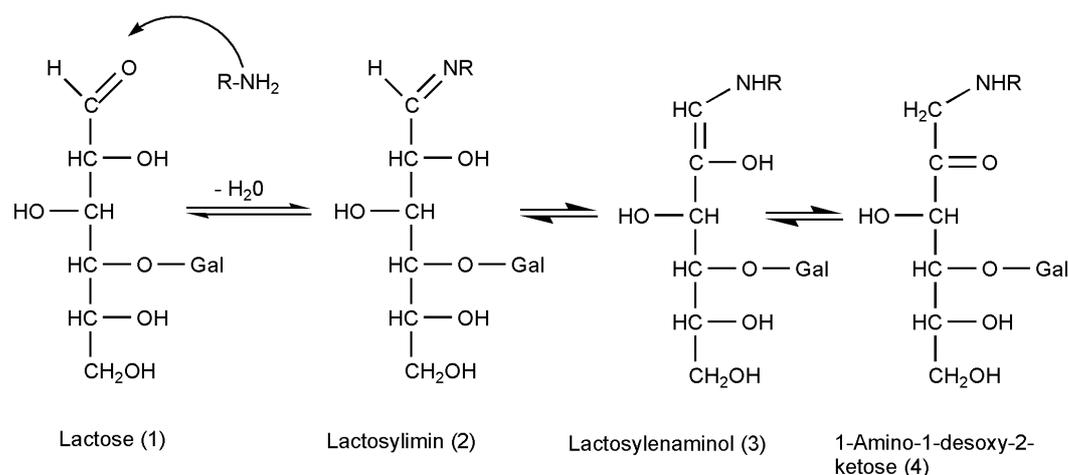
In Abhängigkeit von Temperatur und pH-Wert liegt das Protein als Monomer, Dimer oder Oktamer vor. Bei Raumtemperatur (20 °C) und einem pH-Wert von 7 besteht ein Gleichgewicht zwischen der monomeren und der dimeren Form. Bei einem pH-Wert über 8,6 erfolgt eine irreversible Denaturierung, ebenso beim Erhitzen und in Gegenwart hoher Calciumkonzentrationen (Kirchmeier 1987, Wong et al. 1996). Die Thiolgruppe des  $\beta$ -Lgs, die sich im Inneren des nativen Moleküls befindet, wird bereits durch partielle Denaturierung freigelegt und kann zum einen zur Dimerisierung des Proteins über eine Disulfidbrücke führen oder zum anderen Reaktionen mit weiteren Milchproteinen eingehen. Das  $\beta$ -Lactoglobulinmolekül enthält 15 Lysinreste, welche in Abhängigkeit von ihrer Position innerhalb der Raumstruktur unterschiedliche Reaktivität aufweisen und vor allem in der Anfangsphase der Maillard Reaktion mit reduzierenden Zuckern reagieren können (Morgan et al. 1997; 1999b). Das Protein ist auch in der Lage, unpolare Substanzen, wie Fettsäuren oder Aromastoffe, zu binden (Hambling et al. 1992, Wong et al. 1996). Es wird angenommen, dass  $\beta$ -Lactoglobulin in Milch eine Rolle im Transport von Retinol spielt (Wong et al. 1996).

Das  $\alpha$ -Lactalbumin stellt aus quantitativer Sicht die zweit wichtigste Fraktion der Molkenproteine (ca. 1 g/l Milch) dar. Es liegt in einer Sequenz von 123 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von 14147 Da für die genetische Variante A sowie 14175 Da für die Variante B vor. Das Protein hat eine sehr ausgeprägte räumliche Struktur. Das  $\alpha$ -La enthält 26 %  $\alpha$ -Helixelemente und 14 % Faltblattstrukturen. Für die Stabilisierung der Tertiärstruktur sind vier Disulfidbrücken und ein Calcium-Ion verantwortlich (Kirchmeier 1987, Mulvihill und Donovan 1987, Wong et al. 1996).

## 2.3 Nichtenzymatische Glykosylierung (Maillard-Reaktion)

Bei der Erhitzung sowie Lagerung von Milchprodukten in Anwesenheit reduzierender Zucker kann es in Abhängigkeit von pH-Wert,  $a_w$ -Wert und Temperatur des Milieus zur Reaktion von Aminogruppen mit der Carbonylgruppe des Zuckermoleküls kommen, der so genannten *Maillard*-Reaktion. Diese Reaktion wurde bereits 1912 von *Louis Camille Maillard* beschrieben und nach ihrem Entdecker benannt ([Maillard 1912](#)). Der auch als nichtenzymatische Bräunung bekannte Prozess umfasst ein großes Spektrum an einzelnen Teilschritten. Die für Lebensmittel relevanten Reaktanten sind einerseits reduzierende Zucker, wie Glucose, Maltose, Fructose, Lactose und in geringerem Umfang reduzierende Pentosen und andererseits die Aminokomponenten von freien Aminosäuren, N-Termini der Peptide sowie Proteine und sekundäre Aminogruppen ([Ledl und Schleicher 1990](#)). Dabei spielen die  $\epsilon$ -Aminogruppe des Lysins und die Guanidinogruppe des Arginins die Hauptrolle. Die unter dem Begriff Maillard-Reaktion zusammengefassten Vorgänge lassen sich in die drei Teilbereiche, frühe und fortgeschrittene Maillard-Reaktion sowie das Endstadium, einteilen ([Hodge 1953](#), [Mauron 1981](#), [Ledl und Schleicher 1990](#), [Friedman 1996](#)).

Die frühe Phase der nichtenzymatischen Bräunung wird wesentlich durch die  $\alpha$ -Hydroxycarbonyl-Umlagerung charakterisiert. Dabei kommt den Umlagerungsprodukten als thermodynamisch stabilen Zwischenstufen eine besondere Bedeutung zu. Im Rahmen dieser Arbeit ist vor allem die Anfangsphase, die „frühe *Maillard*-Reaktion“ für die Glykosylierung der Proteine mit dem verwendeten Glykosylierungsagens Lactose ([Abb. 2-2 \(1\)](#)) von Interesse. Zur Darstellung wird die Lactose in der [Abb. 2-2](#) in offenkettiger Form verwendet, obwohl dieses Disaccharid in Lösung vor allem in Halbacetal-Formen vorliegt. In der Anfangsphase der Maillard-Reaktion kommt es zur nucleophilen Addition der Aminogruppe an die Carbonylfunktion der Lactose, unter Bildung von Lactosylimin ([Abb. 2-2 \(2\)](#)), einer *Schiffschen* Base. Die in  $\alpha$ -Position vorhandene Hydroxylgruppe ermöglicht die Umlagerung des instabilen Imins, mittels so genannter *Amadori*-Umlagerung, über eine 1,2-Enolisierung (Lactosylenaminol, [Abb. 2-2 \(3\)](#)) zur *Amadori*-Verbindung, der 1-Amino-1-desoxy-2-ketose ([Abb. 2-2 \(4\)](#)). Ketosen reagieren analog den Aldosen mit Aminen zu Ketosylaminen, die über den entsprechenden Reaktionsweg der *Heyns*-Umlagerung zu 2-Amino-2-desoxy-1-aldosen umgewandelt werden. Reagiert nun die Lysinseitenkette mit Lactose entsteht  $N^\epsilon$ -Lactulosyllysin (Lactuloselysin) als Produkt der frühen Maillard-Reaktion



**Abb. 2-2:** Schema der frühen Maillard-Reaktion am Beispiel von Lactose mit der Lysinseitenkette von Proteinen

(Ledl und Schleicher 1990). Begünstigt wird der Prozess durch hohe Temperaturen, geringe Wasseraktivität sowie lange Lagerzeiten und ist damit bereits für die Herstellung und Verarbeitung von milchhaltigen Produkten, z. B. Milchpulvern, relevant (Erbersdobler 1970). Das zweite Stadium der Maillard-Reaktion, die fortgeschrittene Phase, umfasst die Fragmentierungs- oder Enolisierungsreaktionen der gebildeten *Amadori*- und *Heyns*-Verbindungen (Ledl und Schleicher 1990). Die dabei entstehenden und sehr reaktiven  $\alpha$ -Dicarbonylverbindungen sind Vorstufen für eine Vielzahl von niedermolekularen heterozyklischen und häufig aromaaktiven Substanzen. Die dritte Phase, das Endstadium, ist gekennzeichnet durch Kondensations- und Polymerisationsreaktionen, einschließlich der Bildung von aromaaktiven Verbindungen und ungesättigten stickstoffhaltigen farbigen Polymeren, den so genannten Melanoiden (Friedman 1996). Da die Reaktionsphasen in der Realität zum Teil auch parallel verlaufen, ist die Zuordnung einzelner Maillard-Reaktionsschritte und eine exakte Beschreibung der Reaktionsabläufe nur bedingt möglich.

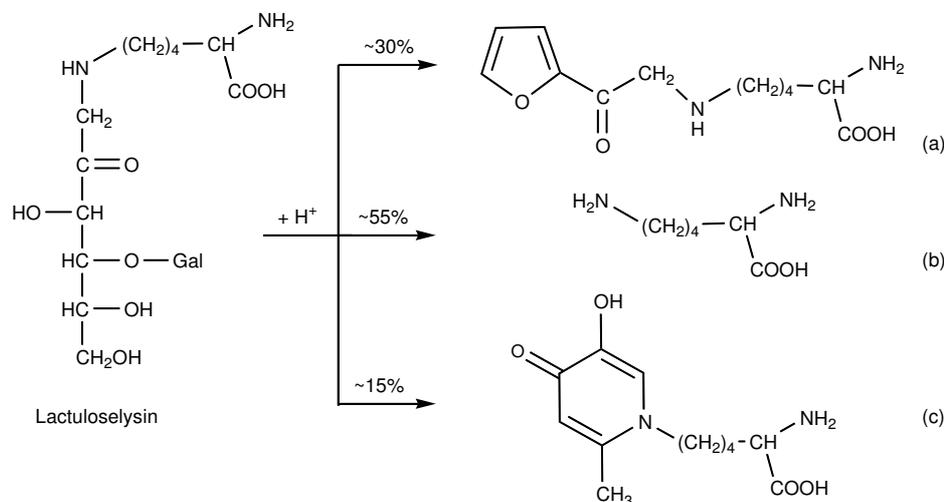
### 2.3.1 Glykosyliertes $\beta$ -Lactoglobulin

Das  $\beta$ -Lg besitzt 16 Amino- und 3 Guanidinogruppen, d. h. 15 Lysinreste (Lys 8, 14, 47, 60, 69, 70, 75, 77, 83, 91, 100, 101, 135, 138, 141), drei Argininreste (Arg 40, 124, 148) und die N-terminale Aminogruppe, die für die Reaktion mit reduzierenden Zuckern in Frage kommen (Morgan et al. 1999b). Aus den Reaktionen der relevanten Aminogruppen mit unterschiedlicher Anzahl von Lactosemolekülen resultiert ein breites Spektrum an Reakti-

onsprodukten. [Morgan et al. \(1999b\)](#) untersuchten mittels HPLC und Massenspektrometrie reines lactosyliertes  $\beta$ -Lg und beobachteten, dass Lys<sup>47</sup> und Lys<sup>91</sup> die größte Reaktivität zeigen und die übrigen Reste nach dem Zufallsprinzip lactosyliert werden. Die Umsetzung des  $\beta$ -Lgs mit reduzierenden Zuckern kann sowohl in wässriger Lösung als auch durch trockenes Erhitzen erfolgen, wobei in letzterem Fall die Sekundär- und Tertiärstruktur größtenteils unbeeinflusst bleiben. Bei der Glykosylierung in wässriger Lösung jedoch kommt es zu Strukturänderungen, welche hauptsächlich an der Kontaktstelle der Dimere lokalisiert sind. Dabei wird eine erhöhte Reaktivität der freien Thiolgruppe sowie die Bildung kovalent verbundener Dimere beobachtet. Auf diese Weise modifizierte Proteine zeigen ein verändertes Denaturierungsverhalten und aggregieren in weiteren Schritten zu höhermolekularen Spezies ([Morgan et al. 1999b](#)).

### 2.3.2 Bedeutung der Maillard-Reaktion in Lebensmitteln

Es ist bekannt, dass während der Erhitzung bzw. Lagerung von Milchprodukten eine signifikante Anzahl von Lysinresten durch eine kovalente Bindung an Lactose im Verlauf der Maillard-Reaktion modifiziert wird ([Erbersdobler 1970](#), [Mauron 1981](#), [Hurrell et al. 1983](#), [Ledl und Schleicher 1990](#), [Morgan et al. 1999b](#), [Leonil et al. 1997](#), [Clawin-Rädecker et al. 2000a](#)). Durch diese nichtenzymatische Glykosylierung wird unter anderem der Genusswert eines erhitzten Lebensmittels bestimmt. Dazu gehört die Ausbildung von erwünschten bzw. unerwünschten Aromastoffen sowie die Farbbildung und der Geschmack ([Leonil et al. 1997](#)). Neben den sensorischen Eigenschaften beeinflusst die Maillard-Reaktion auch direkt die nutritiven Eigenschaften. Hierbei spielt vor allem die Verfügbarkeit der essentiellen Aminosäuren eine entscheidende Rolle. Die kovalente Anbindung des Zuckers an Lysin kann dazu führen, dass diese Aminosäure vom Körper nicht mehr für die Proteinbiosynthese zur Verfügung steht. Zur analytischen Bestimmung des Ausmaßes der „frühen“ Maillard-Reaktion muss eine Säurehydrolyse des proteingebundenen Lactuloselysins durchgeführt werden, welches zur Bildung von Furosin führt ([Henle et al. 1991](#), [Renterghem und Block 1996](#), [Resmini et al. 2003](#), [Krause et al. 2003](#), [Krause 2005](#)). Anhand der bestimmten Menge an Furosin (siehe [Abb. 2-3](#)) sowie den Überföhrungsfaktoren (Furosin : Pyrodisin : Lysin = 30 : 15 : 55) kann die Menge an modifizierten Lysin berechnet werden ([Krause et al. 2003](#), [Krause 2005](#)). Somit ist Furosin als Marker für die frühe Phase der Maillard-



**Abb. 2-3:** Produkte der Säurehydrolyse von Lactuloselysin. (a) Furosin, (b) Lysin, (c) Pyrodisin. Quantitative Daten nach Krause (2005)

Reaktion in Lebensmitteln geeignet und dient als Indikator für die Erhitzung von Milch und Milchprodukten.

Posttranslationale Modifikationen bewirken damit neben chemischen und ernährungsphysiologischen Variationen auch eine Änderung der physikalischen Eigenschaften. Die nicht-enzymatische Glykosylierung besitzt gegenüber chemischen Modifikationen, wie Acylierung, Alkylierung, Oxidation und Reduktion, den Vorteil, dass sie „natürlich“ im Lebensmittel abläuft.

## 2.4 Denaturierung der Molkenproteine

Denaturierung bedeutet den Verlust der nativen Konformation, verbunden mit einer Auffaltung geordneter Strukturbereiche. Die Veränderungen können dabei reversibel oder irreversibel sein. Als Folge der Denaturierung werden Wasserstoffbrücken, Ionenbindungen und hydrophobe Wechselwirkungen gelöst, ohne jedoch die kovalenten Bindungen zu spalten (Kirchmeier 1987, Belitz et al. 2001).

Molkenproteine sind als Albumine und Globuline thermisch instabil (Kirchmeier 1987). Hierdurch unterscheiden sie sich streng von den Caseinen, die auch bei höherer Wärmebelastung hinreichend stabil sind, da sie bereits in Form statistischer Knäuel vorliegen. Die

thermische Denaturierung der Molkenproteine umfasst mehrere Reaktionsschritte und ist im wesentlichen durch zwei Phasen – Auffaltung und Aggregation – gekennzeichnet (Sawyer et al. 1971, Mulvihill und Donovan 1987, Kessler 1988). Bei Erhöhung der Temperatur dissoziieren die Dimere in Monomere, wodurch reversible Auffaltungsreaktionen mit Freilegung verborgener hydrophober Bereiche ermöglicht werden. Die thermische Denaturierung von  $\beta$ -Lactoglobulin erfolgt ab einer Temperatur von 65 °C bei einem pH-Wert von 6,7 mit einer anschließenden Aggregation (Wong et al. 1996). Der initiale Denaturierungsschritt umfasst eine Reihe reversibler Konformationsänderungen, welche das reaktive Cystein<sup>121</sup> freilegen. Die offen gelegten Gruppen verbinden sich auf Grund eines Sulfhydryl-Disulfid-Austausches. Die anschließende Aggregation ist nicht spezifisch (Wong et al. 1996, Manderson et al. 1998). Die aktivierte Thiolgruppe kann im Anschluß mit einer nicht aktivierten Disulfidbrücke eines nativen  $\beta$ -Lactoglobulinmoleküls reagieren und somit intermolekulare Disulfidbindungen ausbilden, was zur einer irreversiblen Aggregation der Moleküle führt (Mulvihill und Donovan 1987). Hierbei wird eine neue reaktive Thiolgruppe freigelegt. Somit kann dieser Schritt beliebig oft hintereinander erfolgen.

Kinetische Studien haben gezeigt, dass die frühe Phase der Denaturierungsreaktion aus zwei Umfaltungsreaktionen 1. Ordnung besteht und mit einer Erhöhung der  $\beta$ -Struktur einhergeht. Die nichtspezifische Aggregation des Proteins ist irreversibel und temperatur- sowie zeitabhängig (Sawyer et al. 1971). Die kritische Denaturierungstemperatur des  $\beta$ -Lactoglobulins von 70 °C wurde ebenfalls mittels Differential Scanning Calorimetrie (DSC) bestätigt. Die genaue Denaturierungstemperatur des  $\beta$ -Lgs wird mit  $70,4 \pm 0,5$  °C bei einem pH-Wert von 6,7 angegeben (Wong et al. 1996). Das  $\alpha$ -Lactalbumin denaturiert bei 65 °C beim pH von 6,7. Dannenberg und Kessler (1988b) untersuchten die Temperaturabhängigkeit der Denaturierung von Molkenproteinen und schlussfolgerten, dass im Temperaturbereich unterhalb 90 °C die Auffaltung den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Gesamtreaktion darstellt. Beim Zusammentreffen von Proteinmolekülen kommt es nicht zwingend zur Aggregation, da die Auffaltung noch unvollständig ist. Oberhalb 90 °C ist die Auffaltung im Allgemeinen abgeschlossen. Hier bestimmt die Aggregation die Gesamtgeschwindigkeit. In Abb. 2-4 sind die Denaturierungsgrade von  $\beta$ -Lactoglobulin bei unterschiedlichen Milcherhitzungsverfahren, sowie die aus den reaktionskinetischen Daten berechneten Denaturierungsgrade dargestellt. Die für die Milchverarbeitung technologisch relevanten Gebiete sind darin gesondert gekennzeichnet. Die logarithmische Darstellung der Denaturierungsgrade zeigt einen diskontinuierlichen Verlauf. Die Knickpunkte in den Geraden bei 90 °C

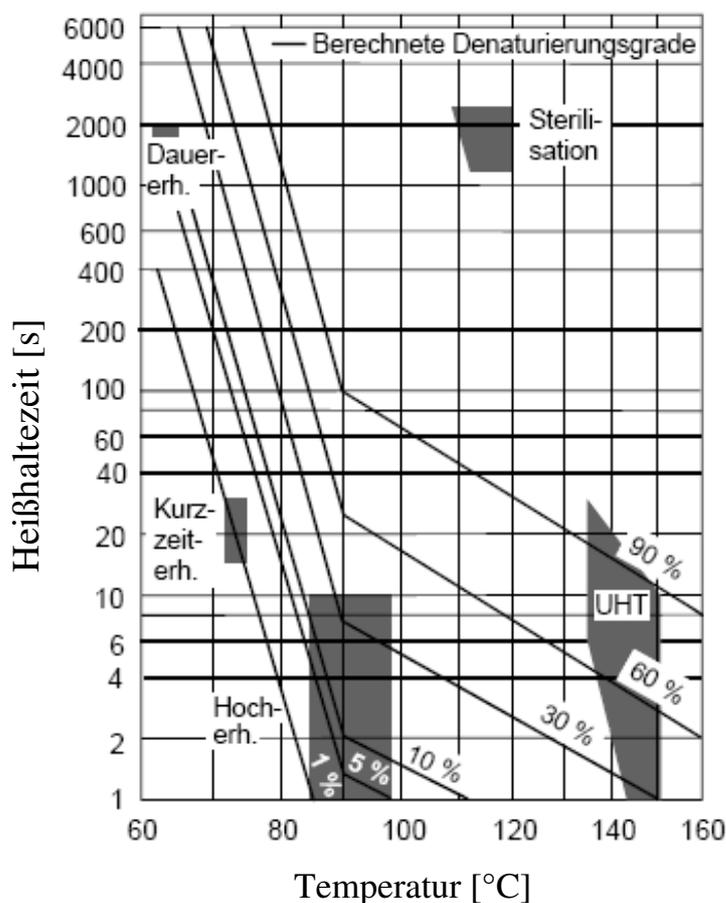


Abb. 2-4: Denaturierungsgrade von  $\beta$ -Lactoglobulin (Dannenbergh und Kessler 1987)

verdeutlichen, dass die Proteindenaturierung in zwei Temperaturbereiche mit unterschiedlicher Aktivierungsenergie zu unterteilen ist.

Eine geeignete Methode, um thermodynamische Daten über den Denaturierungsprozess von Proteinen zu ermitteln, stellt die Differential Scanning Calorimetrie (DSC) dar. Hoffmann et al. (1997) und Verheul et al. (1998) entwickelten mit Hilfe der DSC übereinstimmend ein vereinfachtes Modell der Denaturierungsreaktion, welches die Ergebnisse vorangegangener Studien bestätigt. Der Schritt vom nativen Protein N zum aufgefalteten Protein U verläuft reversibel, die Aggregation jedoch irreversibel (Gleichung (2-1)). Da die



mit

$N$	natives Protein
$U$	entfaltetes Protein
$A$	aggregiertes Protein
$k$	Geschwindigkeitskonstanten der Einzelschritte

Auffaltung eine Reaktion erster Ordnung ist und die Aggregation zweiter, wird die Ordnung der Gesamtreaktion vom Anteil der Einzelreaktionen beeinflusst. Werden die Reaktionsbedingungen, wie pH-Wert, Ionenstärke oder Heizrate variiert, so können Abweichungen von der erwarteten Reaktionsordnung  $n = 1,5$  auftreten (Verheul et al. 1998). Zwischen den unterschiedlichen genetischen Varianten des  $\beta$ -Lactoglobulins zeigen sich Unterschiede in der Denaturierungstemperatur. Bikker et al. (2000) beobachteten beim  $\beta$ -Lg A eine größere Hitzebeständigkeit als bei der Variante B. In anderen Studien wurde allerdings ein entgegengesetzter Trend verzeichnet (Anema et al. 1996, Boye et al. 1997).

Weiterhin spielen bei der thermischen Denaturierung der Molkenproteine die Milieubedingungen eine wichtige Rolle. Zu den wichtigsten Einflussgrößen gehören die Proteinkonzentration, pH-Wert, Lactose- und Salzgehalt. Mit einer steigenden Proteinkonzentration kommt es zur Zunahme der irreversiblen Denaturierung des  $\beta$ -Lgs, was auf eine erhöhte Kollisionsgeschwindigkeit der einzelnen Moleküle zurückzuführen ist (Nielsen et al. 1996). Der pH-Wert beeinflusst den Ladungszustand und dadurch die Konformationsstabilität des Proteins. Mittels DSC-Messungen wurde im pH-Bereich zwischen 10 und 4 mit sinkendem pH-Wert ein Anstieg der Denaturierungstemperatur für  $\beta$ -Lg ermittelt, welches ein Stabilitätsmaximum unterhalb des isoelektrischen Punktes – zwischen 3,5 und 4 – aufweist. Beim weiteren Ansäuern kommt es zum Abfall der Konformationsstabilität (Relkin 1994, Verheul et al. 1998). Die Löslichkeit von thermisch denaturierten Molkenproteinen zeigt ein Minimum um den isoelektrischen Punkt zwischen pH 4 und 5. Die unterschiedliche Löslichkeit bei einem pH-Wert von 4,6 dient dementsprechend als Unterscheidungskriterium zwischen nativen und denaturierten Molkenproteinen. Jou und Harper (1996) ermittelten mit der Thermoanalyse (DSC) eine Erhöhung der Denaturierungstemperatur von Molken-

proteinen in Gegenwart von Lactose.

Die Denaturierungsreaktion führt zu einer partiellen oder vollständigen Änderung der Konformation (Sekundär-, Tertiär-, Quartärstruktur) eines Proteins, ohne dabei die kovalenten Bindungen (mit Ausnahme von Disulfidbindungen) zu lösen. Durch diese Variationen können die technofunktionellen Eigenschaften der Proteine verändert werden. Daher wird die thermische Auffaltung (50-80 °C, 10-15 min) von  $\beta$ -Lg sowie der gesamten Molkenproteine im sauren (2 bis 4) bzw. leicht alkalischen (7 bis 8,5) pH-Bereich zur Verbesserung der funktioneller Eigenschaften eingesetzt (Cheftel et al. 1992, Wong et al. 1996).

#### 2.4.1 Auswirkung der Maillard Reaktion auf das Denaturierungsverhalten

Nur wenige Publikationen berichten über das Denaturierungsverhalten von nichtenzymatisch glykosylierten Molkenproteinen. Bouhallab et al. (1999) beschreiben eine Erhöhung der Löslichkeit von  $\beta$ -Lg-Lactose-Konjugaten nach Erwärmung bei 65 - 90 °C für 10 Min, gegenüber dem nativen Protein. Besonders im Bereich des isoelektrischen Punktes bei pH 4 - 5 zeigt sich die Löslichkeit deutlich verbessert. Die Arbeitsgruppe um van Teeffelen et al. (2005) ermittelte nach der Umsetzung des reinen  $\beta$ -Lgs mit Glucose eine Reduktion der spezifischen Wärme um 60 % und einen Anstieg der Denaturierungstemperatur um 5 K. Mittels massenspektrometrischer Methoden wurde in diesem Fall die Blockierung von 14 der 17 für eine Glykosylierung in Frage kommenden Aminogruppen festgestellt, was einem Glykosylierungsgrad von 82 % entspricht. Die Vermutung, dass unpolare Reste des Proteins vor der Freilegung durch kovalente Bindung der Zuckermoleküle geschützt werden, konnte durch diese Arbeitsgruppe bestätigt werden. Bereits Broersen et al. (2004) beobachteten mittels Differential Scanning Calorimetrie eine um 4,5 K verbesserte Hitzestabilität für ein fructosyliertes  $\beta$ -Lg. Eine Glykosylierung mit Glucose bewirkte sogar einen Anstieg der Denaturierungstemperatur um 6 K.

Die zitierten Forschungsergebnisse basieren auf Versuchen mit hoch glykosylierten Proben, welche für die Lebensmittelindustrie nicht von Relevanz sind. Daher besteht anwenderseitig der Bedarf an Informationen über das Verhalten niedrig glykosylierter Molkenprodukte. Zudem wurde nur reines Protein untersucht, welches im kommerziellen Produkten kaum Verwendung findet.

## 2.4.2 Methoden zur Charakterisierung der Denaturierung

### RP-HPLC

Als Unterscheidungsmerkmal zwischen nativen und denaturierten Molkenproteinen dient die Löslichkeit bei einem pH-Wert von 4,6. Dabei werden die nach Erhitzung thermisch denaturierten und aggregierten Proteine angesäuert und durch Zentrifugation von den nativen Proteinen abgetrennt (IDF-Standard 1996, Resmini et al. 1989, Block et al. 1998, Bouhallab et al. 1999, Clawin-Rädecker et al. 2000b, Morales et al. 2000). Die Bestimmung der Konzentrationsabnahme der nativen Proteine erfolgt auf Basis unterschiedlicher hydrophober Eigenschaften der einzelnen Molkenproteinfraktionen. Der „Denaturierungsgrad“ entspricht der Gesamtpeakfläche nach Erhitzung, geteilt durch die Gesamtpeakfläche vor Erhitzung. Damit ergibt sich:

$$DG = \frac{P_{erhitzt}}{P_0} \quad (2-2)$$

mit

$DG$	Denaturierungsgrad
$P_{erhitzt}$	Gesamtpeakfläche nach Erhitzung
$P_0$	Gesamtpeakfläche vor Erhitzung

### Elektrophorese

Die Elektrophorese basiert auf dem Wanderungsverhalten geladener Moleküle in einem angelegten Gleichstromfeld in Richtung einer Elektrode mit entgegengesetzter Ladung. Bei dieser Technik werden Gemische von Stoffen oder Teilchen in Abhängigkeit von ihrer Wanderungsgeschwindigkeit in Einzelfractionen aufgetrennt. Die Wanderungsgeschwindigkeit ist direkt proportional zur Stärke des elektrischen Feldes sowie zur elektrophoretischen Mobilität der Partikel. Eine weitere Abhängigkeit besteht zum pK-Wert der geladenen Gruppen und der Molekülgröße.

Bei der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) werden durch Zugabe von Harnstoff und Natriumdodecylsulfat (SDS) die nicht-kovalenten Bindungen im

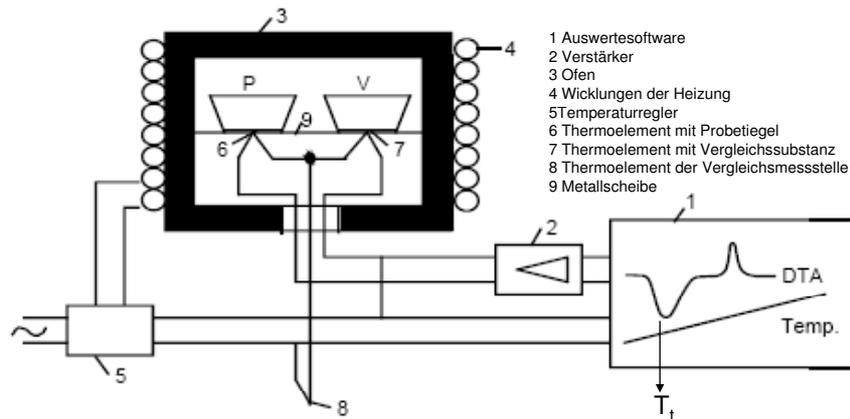
Molekül zerstört, was zur Dissoziation der nativen polymeren Proteinaggregate in Monomere führt. Die Anlagerung des SDS an deren Oberfläche bewirkt die Aufhebung der Ladungsunterschiede der Proteine. Demnach werden sie nur nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Mit Hilfe der SDS-PAGE lässt sich somit unter Vergleich mit Markerproteinen bekannter Größe eine Abschätzung der Molmassen von Einzelfractionen vornehmen. Diese Methode kann zur Untersuchung des Oligomerisierungsgrades von  $\beta$ -Lactoglobulin während des Denaturierungsprozesses genutzt werden (Manderson et al. 1998, Morgan et al. 1999a, Bertrand-Harb et al. 2002, Chevalier et al. 2002, Anema et al. 2006).

Differential Scanning Calorimetrie (dynamische Differenzkalorimetrie)

Die dynamische Differenzkalorimetrie (engl.: Differential Scanning Calorimetry, DSC) stellt eine Methode zur Charakterisierung der physikalischen Umwandlung von Stoffen dar, wie z. B. zur Gewinnung von thermodynamischen Daten über den Denaturierungsprozess von Proteinen (Relkin 1994, Jou und Harper 1996, Verheul et al. 1998, Broersen et al. 2004, van Teeffelen et al. 2005). Modifikationsumwandlungen, wie z. B. das Schmelzen, welche zu Reaktionen erster Ordnung gehören, laufen bei einer konstanten Umwandlungstemperatur  $T_t$  und dazugehörigem konstantem Druck ab. Dabei kommt es zu einer charakteristischen Änderung von Enthalpie und Entropie.

Zur Kalibrierung der Apparatur wird eine Substanz mit bekannter Schmelztemperatur, Schmelzenthalpie und Wärmekapazität, wie z. B. Indium verwendet. Als Referenz dient meist ein mit Wasser oder Luft gefüllter Probetiegel. Das Peak-Minimum, welches im Thermogramm sichtbar ist, entspricht in der Proteinanalytik der Umwandlungstemperatur  $T_t$ . Aus der Peak-Fläche kann die Umwandlungsenthalpie  $H$  berechnet werden.

Bei einem Differenz-Wärmestrom-Kalorimeter (Abb.2-5) werden sowohl die Probe als auch die Referenz mit einer konstanten Geschwindigkeit erwärmt, wobei die zugeführte Wärmemenge pro Zeiteinheit stets gleich bleibt. Bei einer Zustandsumwandlung in der Probe, z. B. durch Umwandlung, Schmelzen, Verdampfen entsteht eine Differenz im Wärmestrom, welche proportional zur Temperaturdifferenz ist. Im Diagramm wird anschließend die zugeführte Wärmemenge pro Zeit gegen die Temperatur (oder Zeit) aufgezeichnet.



**Abb. 2-5:** Schema der Messanordnung einer Differenzthermoanalyse mit einem allgemeinen DSC-Thermogramm;  $T_t$ : Umwandlungstemperatur (aus: Physikalisch Chemisches Praktikum für Fortgeschrittene, Universität Köln)

### Fluoreszenzspektroskopie

Fluoreszenz ist die spontane Emission von Licht beim Übergang eines elektromagnetisch angeregten Systems in einen Zustand niedrigerer Energie. Erfolgt eine Energiezufuhr durch Absorption von ultraviolettem, sichtbarem oder infrarotem Licht, nennt man die emittierte Strahlung Photolumineszenz, welche je nach Dauer des Abstrahlvorganges in Fluoreszenz und Phosphoreszenz unterschieden wird. Als Rotverschiebung („Stokes-Shift“) elektromagnetischer Wellen wird die Verlängerung der gemessenen Wellenlänge gegenüber der ursprünglich emittierten Strahlung bezeichnet.

Fluoreszenzspektroskopie ist eine Methode, bei der die Proteine zerstörungsfrei unter physiologischen Bedingungen mit hoher Sensitivität und Selektivität untersucht werden können. Nach Anregung durch elektromagnetische Strahlung liefert das emittierte Licht Informationen über die Umgebung des Fluorophors, da dieses durch Wechselwirkungen mit benachbarten Gruppen und/oder Lösungsmittelmolekülen beeinflusst wird (Manderson et al. 1999, Palazolo et al. 2000, Lotte 2004). Bei den Fluorophoren die in der natürlichen Struktur von Proteinen vorhanden sind, den sogenannten intrinsischen Fluorophoren, handelt es sich um die aromatischen Aminosäuren Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan. Da diese moleküleigenen Fluorophore unterschiedliche Absorptionsmaxima (Phenylalanin: 258 nm, Tyrosin: 277 nm, Tryptophan: 280 nm) sowie unterschiedliche Absorptionskoeffizienten aufweisen (Phenylalanin : Tyrosin : Tryptophan = 1 : 7 : 27), kann die Aminosäure mit dem do-

minierenden Einfluss (Tryptophan) selektiv bei 295 nm angeregt werden. Aufgrund der starken Abhängigkeit des Tryptophanfluoreszenz von der chemischen Umgebung, dient diese der Charakterisierung von Proteinstrukturen (Lotte 2004).

## 2.5 Funktionelle Eigenschaften der Milchproteine

Über den ernährungsphysiologischen Wert hinaus haben Proteine aufgrund ihrer funktionellen Eigenschaften eine besondere Bedeutung für die Herstellung von Lebensmitteln. Lebensmittelrechtlich gelten Milchproteine als Zutaten und nicht als Zusatzstoffe, was eine Deklaration ohne E-Nummern ermöglicht. Proteine unterliegen als Lebensmittelbestandteile physikalischen und chemischen Veränderungen bei ihrer Herstellung oder Anwendung. Isolierte Proteine können gezielt zur Modifikation ihrer bestehenden Eigenschaften eingesetzt werden. Dies erfolgt mit der Intention, diese zu verbessern oder ihnen neuen Fähigkeiten zu verleihen. Diese Änderungen führen im allgemeinen nur zur einer Modifikation der Konformation (Cheftel et al. 1992). Stärkere thermische Behandlungen haben eine Konformationsänderung der Proteine zu Folge. Art und Ausmaß der Verfahren bestimmen die daraus resultierenden Veränderungen der funktionellen Eigenschaften, wie Löslichkeit, Quellbarkeit, Fett- und Wasserbindevermögen, pH-Stabilität, Hitzestabilität, Viskosität, Gelbildung, Adsorption an Grenzflächen, Schaumbildung und Emulgiervermögen (Pearce und Kinsella 1978, Mehrens und Reimerdes 1991, Cheftel et al. 1992, Hall 1996, Wong et al. 1996, Zayas 1997, Darewicz und Dziuba 2001, Damodaran 2005, AlvarezGomez und RodriguezPatino 2006).

### Löslichkeit

Eine der wichtigsten funktionellen Eigenschaften der Proteine ist ihre Löslichkeit unter verschiedenen Bedingungen wie Ionenstärke, pH-Wert und Temperatur. Native Molkenproteine sind über den gesamten für Lebensmittel relevanten pH-Bereich sehr gut löslich (Mehrens und Reimerdes 1991). Dazu gegensätzlich verhalten sich die Caseine, welche nahe ihrem isoelektrischen Punkt eine minimale Löslichkeit besitzen (Zayas 1997). Das Löslichkeitsverhalten von Proteinen ist von der Anzahl der hydrophoben und hydrophilen Gruppen sowie von deren Anordnung im Molekül abhängig. Im allgemeinen steigt die Löslichkeit der

Milchproteine mit zunehmendem pH-Wert an (Mehrens und Reimerdes 1991, Hambling et al. 1992).

### Adsorption und Grenzflächeneigenschaften

Caseine und Molkenproteine besitzen eine hohe Grenzflächenaktivität, was bedeutet dass beide Proteingruppen ein großes Adsorptionsbestreben an hydrophoben Grenzflächen aufweisen (Mehrens und Reimerdes 1991, Wong et al. 1996, Dickinson 2003). Diese Fähigkeit ist mit den amphipolaren Eigenschaften dieser Proteine zu erklären. Die hohe Oberflächenhydrophobizität und Grenzflächenaktivität von Caseinen resultiert aus der geringen Stabilität ihrer Sekundär- und Tertiärstruktur und der hierdurch bedingten Freilegung von hydrophoben Resten. Beim  $\beta$ -Lactoglobulin ist aufgrund der globulären Struktur die Aufaltung an einer Grenzfläche langsamer als beim Casein. Die gebildete Grenzschicht und das Adsorptionsverhalten differieren jedoch bei den beiden Proteingruppen. So bildet das  $\beta$ -Casein, bedingt durch seine voluminöse Struktur und flexible Konformation, dicht gepackte Grenzschichten (Dalglish und Leaver 1991, Dickinson 2001), wodurch eine höhere Anzahl an Proteinmolekülen im Vergleich zu  $\beta$ -Lactoglobulin an der Grenzfläche adsorbiert wird (Nylander und Wahlgren 1994). Während Caseine vorrangig reversibel an Grenzflächen adsorbieren und sich dabei nur begrenzt umfalten, wird bei  $\beta$ -Lactoglobulin ein zweistufiger Adsorptionsprozess beschrieben, wobei zunächst eine reversible Adsorption von Monomeren gefolgt von einer irreversiblen grenzflächeninduzierten Konformationsänderung stattfindet (Nylander und Wahlgren 1994). Dabei bildet sich eine zweidimensionale gel-ähnliche Schicht, die zuerst über physikalische Wechselwirkungen und schließlich über langsam verlaufende kovalente Quervernetzungen gefestigt wird (Dickinson 1999a). Die so gebildete Grenzschicht besitzt eine Ausdehnung von ca. 2 nm.

In Lebensmitteln werden grenzflächenaktive Substanzen eingesetzt, wie niedermolekulare Emulgatoren (Phospholipide und Mono- und Diglyceride) sowie makromolekulare Emulgatoren (Proteine). Da Proteine Makromoleküle sind, erhöhen sie zusätzlich die Viskosität der kontinuierlichen Phase (Lagaly et al. 1997).

### Emulgiereigenschaften von Milchproteinen

Emulsionen sind disperse Systeme aus zwei oder mehreren nicht oder nur teilweise mischbaren Flüssigkeiten (Hall 1996). Die Fähigkeit eine Emulsion zu stabilisieren hängt un-

ter anderem vom Wasser- und Fettbindevermögen der Proteine, ihren rheologischen Eigenschaften sowie ihrem Verhalten bei der Ausbildung von Grenzflächenschichten ab. Die Emulgatoren adsorbieren an die Grenzfläche, richten sich aus und bewirken eine Verringerung der Grenzflächenspannung und damit eine Reduzierung der freien Energie des Systems (Lagaly et al. 1997, Dickinson 1997). Es muss zwischen zwei Arten von Emulsionen unterschieden werden, Öl in Wasser (O/W) sowie Wasser in Öl (W/O). Die Milchproteine werden als überwiegend hydrophile Makromoleküle zur Stabilisierung von O/W - Emulsionen eingesetzt (Zayas 1997). Zu den Emulgiereigenschaften gehört die Emulsionsstabilität sowie die Emulgierkapazität. Unter Emulsionsstabilität versteht man die Fähigkeit des Emulgators, eine Emulsion gegenüber destabilisierenden Faktoren über eine definierte Zeitspanne zu stabilisieren. Die Emulgierkapazität wird definiert als die maximale Menge an dispergierter Phase, die stabilisiert werden kann (Pearce und Kinsella 1978, Mehrens und Reimerdes 1991, Hall 1996). Um die Zusammenlagerung der dispergierten Fetttropfchen (Koaleszenz) zu verhindern, muss eine stabile Membran um die Fetttropfchen ausgebildet werden (Mehrens und Reimerdes 1991).

Milchproteine – in gelöster Form – besitzen hervorragende Emulgiereigenschaften (Zayas 1997, Dickinson 1999b). Sie agieren wegen ihrer amphiphilen Molekülstruktur als makromolekulare Emulgatoren. Sie wandern an die Grenzfläche, wo sie einen energetisch günstigeren Zustand einnehmen. Sie tendieren dazu, ihre Konformation während der Adsorption zu ändern. Das Ausmass der Konformationsänderung wird durch die Umgebungsbedingungen, wie pH-Wert, Ionenkonzentration und Temperatur beeinflusst (Wong et al. 1996, Zayas 1997, Damodaran 2005). Im nativen Zustand unterscheiden sich die Caseine in ihrer Konformation von den Molkenproteinen. Demzufolge zeigen die beiden Proteingruppen unterschiedliche Funktionalität bei der Emulsionsbildung und -stabilisierung. Caseine können auf Grund der offenkettigen und flexiblen Struktur sowie der hohen Grenzflächenaktivität leicht an Luft/Wasser - Oberfläche sowie an Öl/Wasser - Grenzfläche adsorbieren und senken damit die Oberflächen- bzw. Grenzflächenspannung. Die Caseine sind dementsprechend als besonders effiziente Proteinemulgatoren einzustufen (Mehrens und Reimerdes 1991, Zayas 1997). Die Oberflächenaktivität des  $\beta$ -Lactoglobulins ist ausgesprochen pH-Wert abhängig. Die höchste Adsorptionsrate des  $\beta$ -Lg ist nahe des Isoelektrischen Punktes, bei einem pH-Wert von 4,9 zu finden (Wong et al. 1996). Hier ist die elektrostatische Abstossung zwischen den Molekülen am geringsten. Deshalb ist die hohe Adsorption und Umlagerung der Proteinmoleküle an der Oberfläche möglich. Der limitierende Faktor für den Einsatz

von Molkenproteinen als Emulgatoren in Emulsionen ist ihre geringe Hitzestabilität (Zayas 1997).

### Schaumbildung

Ein Schaum wird als die Feindispersion eines Gases in einer Flüssigkeit definiert. Um Schaum zu bilden, muss die hohe Oberflächenspannung an der Grenzfläche Wasser/Luft durch grenzflächenaktive Substanzen (z. B. Proteine) reduziert werden (Zayas 1997). Dabei findet zunächst eine Adsorption der Proteine an der Grenzfläche statt, wo es zur Auffaltung der Proteine kommt, bzw. im Fall der globulären Molkenproteine zur so genannten Grenzflächendenaturierung (Mehrens und Reimerdes 1991). Abhängig von ihrer molekularen Struktur zeigen Proteine ein unterschiedliches Verhalten an der Grenzfläche. So weisen die Caseine, welche sich durch offenkettige Struktur auszeichnen, eine hohe Flexibilität an der Grenzfläche auf. Gegensätzlich dazu verhalten sich die Molkenproteine, welche als globuläre Proteine einen relativ starren Film ausbilden (Dickinson 2003).

### Gelbildung

Die Fähigkeit Gele, also 3-dimensionale Netzwerke, auszubilden besitzen sowohl Caseine als auch Molkenproteine (Zayas 1997). Diese Eigenschaft spielt eine wesentliche Rolle bei der Lebensmittelherstellung. Gelbildungsprozesse in Milch erfolgen durch Säurekoagulation, Enzyme, Hitze oder durch Lagerung. Die meisten dieser Prozesse werden durch Casein verursacht, es existieren jedoch auch Interaktionen mit  $\beta$ -Lg und  $\alpha$ -La. Caseine bilden Gele durch einen Zusatz von Säure (Säuregel), Chymosin (Labgel) oder Calciumchlorid (Mehrens und Reimerdes 1991, Wong et al. 1996). Molkenproteine bilden Gele nur bei Erhitzung auf Temperaturen, welche über der Denaturierungstemperatur liegen (Mehrens und Reimerdes 1991).

### Zusammenfassung der funktionellen Eigenschaften

Die meisten funktionellen Eigenschaften beeinflussen einerseits die sensorischen Eigenschaften und andererseits das physikalische Verhalten eines Lebensmittels bzw. eines Lebensmittelinhaltsstoffes während der Verarbeitung, Herstellung sowie Lagerung (Cheftel et al. 1992). Neben der Intention ausgewählte funktionelle und nutritive Eigenschaften zu

erzielen werden verschiedene Proteinadditive auch aus ökonomischen Gründen bei der Herstellung von Lebensmitteln eingesetzt (Cheftel et al. 1992, Wong et al. 1996). Molkenproteine eröffnen wegen ihren einzigartigen funktionellen und ernährungsphysiologischen Eigenschaften enorme Möglichkeiten für den Einsatz in Lebensmitteln sowie für die Entwicklung neuer Rezepturen. So wird z. B. Molkenpulver bis zu 44% bei der Herstellung von Schmelzkäse eingesetzt, da die darin enthaltene Lactose die Konsistenzverdickung fördert. Zudem verfügen sowohl die Lactose als auch die Molkenproteine über eine sehr gute Wasserbindungsfähigkeit (Berger et al. 1989).

Im Rahmen dieser Arbeit werden die Proteine überwiegend aufgrund ihrer grenzflächenaktiven Eigenschaften und damit als Emulgatoren verwendet.

### 2.5.1 Auswirkung der Maillard-Reaktion auf die funktionellen Eigenschaften

Die Maillard-Reaktion wirkt sich durch die strukturverändernde Wirkung direkt auf die funktionellen Eigenschaften der Proteine aus. Die Einführung hydrophiler Kohlenhydrate und die Modifizierung der Aminosäureseitenketten verändern die Polarität und damit die Oberflächenbeschaffenheit eines Proteins. Zudem wird dessen dreidimensionale Struktur modifiziert (Cheftel et al. 1992). Diese beiden Faktoren bestimmen entscheidend die Funktionalität eines Proteins.

Untersuchungen von glykosyliertem  $\beta$ -Casein bestätigen die durch Modifikation verursachten Strukturwandlungsprozesse, wobei die Anteile an Random-coil-Strukturen zugunsten von  $\beta$ -Turn abnehmen (Darewicz und Dziuba 2001). Zudem lassen die durch Darewicz und Dziuba (2001) erzielten Ergebnisse erkennen, dass die durchschnittliche Fetttropfchengröße bei Emulsionen, die mit glykosyliertem  $\beta$ -Casein im Vergleich zu nativem Protein hergestellt wurden, signifikant verringert wird und die Emulsionsstabilität im Umkehrschluss erhöht wird. Diese Arbeitsgruppe beschäftigte sich auch mit dem Adsorptionsverhalten des nativen und modifizierten  $\beta$ -Caseins an hydrophoben Grenzflächen. Im Laufe der Untersuchungen wurde deutlich, dass die Bedeckung der Grenzfläche durch das glykosylierte Protein erheblich erhöht wird. Daraus resultiert die Bildung von dickeren Grenzschichten, wobei wahrscheinlich polare Gruppen in verstärktem Maße in die wässrige Phase orientiert sind. Damit können verbesserte Emulgiereigenschaften durch eine stärkere elektrostatische Stabilisierung der dispersen Phase erklärt werden.

Groubet et al. (1999) beobachteten eine erhöhte Löslichkeit des glykosylierten  $\beta$ -Caseins, jedoch nur in einem pH-Bereich von 4 bis 6. Die Emulgieraktivität des  $\beta$ -Caseins blieb nach der Glykosylierung unverändert.

Die Modifizierung von  $\beta$ -Lactoglobulin mit verschiedenen Mono- und Disacchariden, wie beispielsweise Ribose, Glucose und Lactose, zeigt eine Veränderung der Emulgiereigenschaften des eingesetzten Proteins. Nacka et al. (1998) stellten eine deutlich erhöhte Emulgieraktivität für Emulsionen mit glykosyliertem  $\beta$ -Lg im Vergleich zum nativen Protein innerhalb des untersuchten pH-Bereiches von 3 bis 9 fest. Auch die kovalente Modifizierung von  $\beta$ -Lg mit dem höhermolekularen Kohlenhydrat Carboxymethyldextran zeigte in Versuchen deutlich bessere Emulgiereigenschaften hinsichtlich Bildung und Stabilität als das native Protein (Nagasawa et al. 1996).

Chevalier et al. (2001) erhitzten reines  $\beta$ -Lg mit Zuckern wie Arabinose, Galactose, Glucose, Lactose, Rhamnose und Ribose in Lösung bei 60 °C für 72 Stunden. Anschließend wurden die Proben dialysiert und gefriergetrocknet sowie ihre funktionellen Eigenschaften untersucht. Nichtenzymatisch glykosyliertes  $\beta$ -Lg wies eine Reihe von veränderten Eigenschaften auf. Die glykosylierten Spezies zeigten eine Verbesserung der thermischen Stabilität bei einem pH-Wert von 5. Schaumbildungseigenschaften des  $\beta$ -Lgs wurden im Zuge der Glykosylierung mit Lactose oder Rhamnose nicht beeinträchtigt, verbesserten sich jedoch nach einer Glykosylierung mit Glucose oder Galactose. Die Emulgiereigenschaften konnten durch die kovalente Bindung von Sacchariden verbessert werden. Eine höhere Emulsionsstabilität resultierte nach dem Einsatz reaktiverer Zucker, wie Arabinose oder Ribose. Die erhaltenen Konjugate wiesen eine Löslichkeit von 35 % bei pH 4 im Vergleich zu erhitztem  $\beta$ -Lg bzw.  $\beta$ -Lg glykosyliert mit den restlichen Sacchariden auf. Durch die Verschiebung des isoelektrischen Punktes jedoch zeigten die Derivate eine erhöhte Löslichkeit bei pH 5 im Vergleich zu  $\beta$ -Lg. Die Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass die Art des verwendeten Zuckers ein essentieller Faktor für die Verbesserung der funktionellen Eigenschaften von glykosylierten Proteinen durch die Maillard-Reaktion ist. Groubet et al. (1999) beobachteten eine Erhöhung der Löslichkeit nach Lactosylierung reinen  $\beta$ -Lgs im Vergleich zu unerhitztem Protein. Gauthier et al. (2001) stellten fest, dass die kovalente Bindung von Lactose an reines  $\beta$ -Lg einen Einfluss auf das Verhalten des Proteins an der Luft/Wasser-Oberfläche hat. Die trockene Erhitzung beeinflusste, trotz höherer Glykosylierungsgrade, nur leicht die Grenzflächeneigenschaften, im Gegensatz zur Erhitzung in Lösung, wonach es zu höherer Adsorption kam.

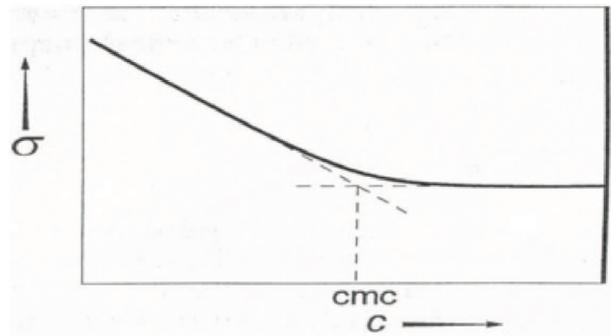
Bezüglich der Auswirkungen Maillard-induzierter Proteinmodifikationen auf ein konkretes Lebensmittel bzw. einen Lebensmittelzusatz gibt es nur wenige Untersuchungen. [Ennis und Mulvihill \(1999\)](#) beschäftigten sich mit den veränderten Hydratationseigenschaften von Labcasein, aufgrund der Bildung von Lactuloselysin im Laufe der frühen Maillard-Reaktion. Labcasein wird als Zusatz zur Herstellung von Mozzarella-ähnlichem Käse verwendet. Durch die Hydroxylgruppen des Zuckers und die somit zusätzlichen Wasserstoffbrückenbindungen werden die Protein-Protein-Wechselwirkungen und dadurch das Hydratationsverhalten der Proteine verändert. [Shepherd et al. \(2000\)](#) beschäftigten sich mit den emulgierenden Eigenschaften von Casein-Maltodextrin-Konjugaten und stellten eine deutlich verbesserte Emulgieraktivität und -stabilität im niedrigen pH-Bereich fest. Diese Konjugate sind demnach als effektive Emulgatoren bzw. als lösliche Proteinadditive für saure Lebensmittel, wie saure Diät- und Sportgetränke oder Nahrungsergänzungsmittel geeignet.

## 2.5.2 Methoden zur Charakterisierung der Emulgiereigenschaften

### Oberflächenspannung und kritische Mizellbildungskonzentration

Die Oberflächenspannung ist ein Sonderfall der Grenzflächenspannung, bei der definitionsgemäß eine Grenzfläche zwischen Festkörpern oder Flüssigkeiten gegenüber der jeweiligen Dampfphase bzw. Luft vorliegt. Die Oberflächenspannung kann als Maß zur Charakterisierung von Stoffeigenschaften genutzt werden und wird mit Hilfe von dynamischen oder statischen Messmethoden ermittelt.

Die kritische Mizellbildungskonzentration (CMC, engl.: Critical Micellization Concentration) stellt die Konzentration einer grenzflächenaktiven Substanz in Wasser dar, oberhalb derer sich monomere Moleküle zu Aggregaten, den Mizellen, zusammenlagern. Hohe CMC-Werte weisen dabei auf hydrophile grenzflächenaktive Substanzen, niedrige CMC-Werte auf hydrophobe Verbindungen hin ([Menger et al. 2000](#), [Piispanen 2002](#)). Zur Bestimmung der kritischen Mizellbildungskonzentration wird die Oberflächenspannung ( $\sigma$ ) in Abhängigkeit der Tensidkonzentration (Proteinkonzentration) gemessen. Dabei wird die Oberflächenspannung gegen die logarithmierte Konzentration des Tensids (Proteins) aufgetragen. Unterhalb der CMC lagern sich die Moleküle an der Luft/Wasser-Grenzfläche an und setzen so die Oberflächenspannung herab. Bei weiterer Zugabe grenzflächenaktiver



**Abb. 2-6:** Abhängigkeit der Oberflächenspannung ( $\sigma$ ) von der Konzentration ( $c$ ) (Figura 2004)

Substanzen tritt eine Sättigung der Grenzfläche mit diesen Monomeren ein was dann in einer abrupten Aggregation der Monomere zu Mizellen resultiert. Dementsprechend zeigt das CMC - Konzentrationsdiagramm einen steilen Abfall unterhalb der CMC und ein asymptotisches Verhalten oberhalb der CMC (siehe Abb. 2-6. Die Konzentration, bei der die maximale Grenzflächenbelegung erreicht ist und deshalb die Mizellbildung einsetzt, wird kritische Mizellbildungskonzentration genannt. Diese berechnet sich aus dem Schnittpunkt der beiden linearen Ausgleichsgeraden (Piispanen 2002, Figura 2004). Die CMC ist eine temperaturabhängige Kenngröße für grenzflächenaktive Substanzen. Die Vertikal-Plattenmethode nach *Wilhelmy*, als eine statische Methode zur Quantifizierung der Oberflächenspannung auf Basis einer Kraftmessung, beruht auf dem Benetzungsgleichgewicht zwischen dem Festkörper (angerauten Platinplättchen) und einer Flüssigkeit. Die Benetzung der Platte durch die Flüssigkeit führt zu einer konisch verlaufenden Flüssigkeitslamelle. Die aufziehende Flüssigkeit verursacht eine Gewichtsänderung des Plättchens, welche durch eine angeschlossene Waage automatisch registriert wird.

### Trübungsmessung

Die Trübungsmessung ist eine der häufigsten in der Literatur beschriebenen Methoden zur Bestimmung der Emulsionsstabilität und der Emulgieraktivität. Diese bezieht sich auf die Aufrahmung bzw. Sedimentation der dispersen Phase, die durch Destabilisierungsfaktoren (z. B. Flokkulation und Aggregation) begünstigt werden. Es kann eine Abnahme der Trübung mit der Zeit beobachtet und somit die Emulgiereigenschaften ermittelt werden.

Grundlegend für das Messen von Trübungen ist die Tatsache, dass kolloiddisperse Systeme das eingestrahlte Licht streuen. Bei dieser Methode wird die Verminderung der Inten-

sität nach Transit des eingestrahlt Lichtes einer bestimmten Wellenlänge gemessen. Die Trübung, auch Turbidität genannt, ist dabei proportional zur Verminderung dieser Lichtintensität durch Streueffekte analog dem *Lambert-Beerschen* Gesetz (Lagaly et al. 1997). Bei Trübungsmessungen wird demnach eine scheinbare Absorption gemessen.

Pearce und Kinsella (1978) entwickelten eine darauf beruhende Methode und berechneten den so genannten Emulgieraktivitätsindex (EAI). Die Trübung  $\tau$  leitet sich analog dem *Lambert-Beer-Gesetz* (2-3) aus der gemessenen Absorption  $A$  von Licht einer definierten Wellenlänge (häufig 500 nm) ab und ist indirekt proportional zur Schichtdicke  $l$  der Küvette.

$$\tau = \frac{2,303 \cdot A}{l} \quad (2-3)$$

mit

$\tau$	Trübung
$A$	Absorption
$l$	Schichtdicke der Küvette

Ein grundlegendes Problem bei polydispersen Systemen stellt eine kleine Anzahl großer Teilchen dar, die die Streuintensität großer Mengen an kleinen Teilchen überlagern können (Lagaly et al. 1997).

Aus der Trübungsmessung lassen sich sowohl die Emulgieraktivität als auch die Emulsionsstabilität ableiten. Die Emulgieraktivität (EA) wird als die Fähigkeit eines Emulgators definiert, eine neu formulierte Emulsion unter gegebenen Bedingungen zu formen und zu stabilisieren (Hall 1996). Die Emulsionsstabilität (ES) beschreibt die Beständigkeit der Emulsion gegenüber destabilisierenden Faktoren - wie Koaleszenz, Flokkulation oder Sedimentation von Tröpfchen der dispersen Phase - innerhalb eines bestimmten Zeitraumes (Hall 1996).

### Lichtmikroskopie

Durch lichtmikroskopische Untersuchungen von Emulsionen lassen sich Aussagen über die Teilchengröße und Verteilung der Fettröpfchen treffen. Gerade der Parameter Teilchengröße spielt eine wichtige Rolle hinsichtlich der Stabilität aber auch der Bildung von Emulsionen. Die Aufrahmungsgeschwindigkeit ist nach dem *Stokeschen* Gesetz direkt proportio-

nal zum Quadrat des Tröpfchenradius (siehe Gleichung (4-2) Unterabschnitt 4.3.3). Daher besteht die Möglichkeit der Stabilitätssteigerung durch eine starke Reduktion der Teilchendurchmesser (Dörfler 2002). Lichtmikroskopische Methoden lassen sich auf Grund des begrenzten Auflösungsvermögens von Mikroskopen allerdings nur bei Makroemulsionen mit Teilchendurchmessern von über  $1 \mu\text{m}$  einsetzen. Wie von Pearce und Kinsella (1978) beschrieben, können mikroskopische Bestimmungen der Größe von dispers verteilten Fetttröpfchen proteinstabilisierender Emulsionen zur Charakterisierung emulgierender Eigenschaften eingesetzt werden.

### Elektronenmikroskopie

Die Auflösung von Lichtmikroskopen ist durch die Wellenlänge des Lichtes auf ca. 200 nm begrenzt. Zur Steigerung des Auflösungsvermögens werden in einem Elektronenmikroskop stattdessen Elektronenstrahlen mit einer gegenüber dem Licht vielfach kleineren Wellenlänge verwendet. Der Elektronenstrahl wird in einer Kathode (i. d. R. aus Wolfram) erzeugt, beschleunigt und mittels magnetischer Felder (Linsen) gelenkt und gebündelt. Es werden zwei prinzipielle Verfahren unterschieden: die Transmissions- (TEM) und die Rasterelektronenmikroskopie (REM).

Das Transmissionselektronenmikroskop ist im Aufbau und Funktion einem Lichtmikroskop nachempfunden. Es besteht aus hintereinander geschalteten vergrößernden Elektronenlinsen, welche die Ablenkung der Elektronen-Flugbahnen gestatten. Die freien Elektronen werden durch eine Elektronenkanone erzeugt und in Richtung Anode beschleunigt. Diese durchdringen dann die Probe, welche hinreichend dünn sein muss, und werden nach dem Transit durch einen Leuchtschirm bzw. einen CCD-Sensor (engl. Charge-coupled Device) detektiert und quantifiziert. Im Ergebnis erzeugt das TEM ein Durchlicht-Elektronenbild mit einer 100- bis 500-tausendfachen Vergrößerung und einer Auflösung von etwa 0,2 nm. Die Probe wird dabei vollständig in einem Schritt erfasst. Zur Messung von für Elektronenstrahlung undurchdringlichen Materialien, wie z. B. Metalloberflächen, ist es notwendig von den entsprechenden Proben Folienabdrücke anzufertigen und diese dann zu durchleuchten.

Im Gegensatz zum TEM erfasst das Rasterelektronenmikroskop (engl. SEM von scanning electron microscopy) die zu untersuchende Probe nicht in einem Schritt sondern sequentiell in Form eines Rasters. Dabei wird ein feiner Elektronenstrahl in einem kleinen Punkt auf der Oberfläche des Objektes fokussiert und anschließend zeilen- und spaltenweise

über die Probe geführt. Die durch die Probe reflektierte bzw. emittierte Strahlung wird dann durch entsprechende Detektoren, wie CCD-Detektoren, erfasst und zu einem Ergebnisbild zusammengesetzt. Im Vergleich zur Lichtmikroskopie ist die Präparation aufwendiger, da die meisten Proben elektrisch leitend modifiziert werden müssen, indem sie beispielsweise mit Gold bedampft werden. Die Rasterelektronenmikroskope verfügen über einen ca. 20- bis 150-tausendfachen Vergrößerungsbereich und besitzen ein Auflösungsvermögen zwischen 3 und 6 nm. Das Auflösungsvermögen ist geringer als bei der TEM, die Tiefenschärfe jedoch um Größenordnungen höher. Daher ist das REM besonders zur plastischen und dreidimensionalen Abbildung der Oberfläche eines Gegenstandes geeignet.

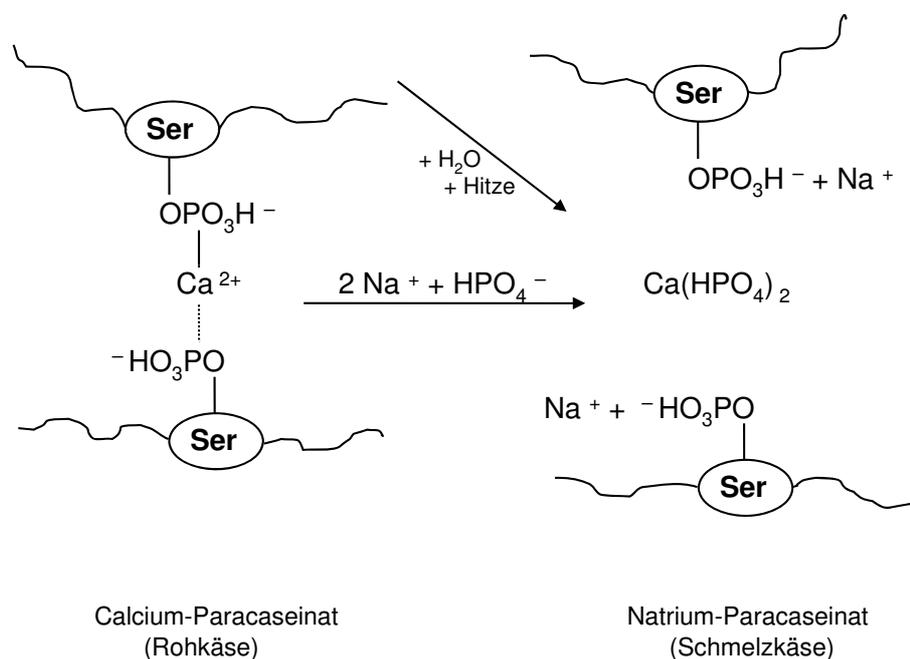
Sowohl REM als auch TEM werden zur Erfassung der Mikrostruktur des Lebensmittels Schmelzkäse verwendet. Folgende Studien betrachten generell die Verteilung der in einer kontinuierlichen Proteinmatrix eingebetteten Fettkugeln im Schmelzkäse: [Heertje et al. \(1981\)](#), [Lee et al. \(1981\)](#), [Kaláb et al. \(1987\)](#), [Klostermeyer und Buchheim \(1988\)](#), [Berger et al. \(1989\)](#), [Savello et al. \(1989\)](#), [Marshall \(1990\)](#), [Kaláb \(1995\)](#), [Marchesseau et al. \(1997\)](#).

## 2.6 Schmelzkäse

Nach der Wärmebehandlung von Schnittkäse in Blechdosen durch den Niederländer Jan Hendrikzoon im Jahre 1899 wurde die Schmelzkäseherstellung durch Walter Gerber und Fritz Stettler 1911 weiter etabliert ([Kammerlehner 2003](#)). Die beiden Schweizer setzten der Rohmasse Natriumcitrat zu und erhielten nach folgender Erhitzung ein stabiles, modifiziertes Produkt. Im Laufe der Zeit wurden andere Salze zugesetzt, die wegen ihrer Funktionalität als „Schmelzsalze“ bezeichnet wurden ([Kammerlehner 2003](#)). Bei Schmelzkäseerzeugnissen ist zwischen Schmelzkäse und Schmelzkäsezubereitungen zu unterscheiden. Laut Käseverordnung vom 14. April 1986 § 1 Absatz 3, Ziffer 1 ist Schmelzkäse ein Erzeugnis, das mindestens zu 50 % aus Käse besteht, dem andere Milcherzeugnisse zugesetzt werden können, und welches durch Schmelzen unter Wärmeeinwirkung sowie durch Verwendung von Schmelzsalzen zum Emulgieren gebracht wurde. Unter Schmelzkäsezubereitungen werden Erzeugnisse verstanden, die zum einen Schmelzkäse oder Käse sowie eine Kombination beider Grundbestandteile beinhalten können und zum anderen unter Zusatz anderer Milcherzeugnisse oder Lebensmittel unter gleichen Bedingungen wie Schmelzkäse hergestellt wurden. Der Anteil an Käse in Schmelzkäsezubereitungen bleibt meistens unter

40 %.

Die technologische Modifikation des Ausgangsmaterials Käse führt während des Schmelzprozesses zu Veränderungen und Phasenumwandlungen in der Matrix, woraus geänderte Eigenschaften des Endproduktes resultieren. Eine Erhitzung ohne Schmelzsalze führt zur Trennung der drei Phasen Eiweiß (Paracaseinat), Wasser (Serum) und Fett (Klostermeyer und Buchheim 1988). Die simultane Wirkung von Hitze, mechanischer Bearbeitung und Schmelzsalzen (in Mengen zwischen 1 - 3 %) verhindert jedoch die Phasentrennung. Das gelöste Schmelzsalz dringt in die mit kolloidalem Calciumphosphat verdichteten intermicellaren Räume ein und führt ein Ionenaustausch durch, wobei die Schmelzsalze Calciumionen ( $\text{Ca}^{2+}$ ) aufnehmen und Natriumionen ( $\text{Na}^+$ ) an das Casein abgeben. Hierbei entsteht das Natrium-Paracaseinat. Mit dem Austausch der zweiwertigen Kationen durch einwertige kommt es zur Vereinzelung der Peptidketten bzw. der para-Caseinsubmizellen (Abb.2-7). Durch die damit einhergehende Ladungsänderung kommt es zum Abbau der Grenzflächen-spannung zwischen Wasser und Proteinen sowie zu einer stärkeren Ausbildung von Hydrathüllen an der Teilchenoberfläche (Caric et al. 1985, Spreer 1995, Guinee et al. 2004). Dass lösliche Caseine wie z. B. das Natrium-Paracaseinat als „aufgeschlossenes Milcheiweiß“ exzellente Emulgatoren sind, ist bekannt. Sie werden daher z. B. bei Brühwurst eingesetzt, um das freie Fett zu emulgieren (Berger et al. 1989). Das Paracaseinat emulgiert in der Schmelzkäsemasse die dispergierten Fetttropfchen und bildet zusammen mit den Schmelzsalzionen und Aminosäuren eine stabile Öl-in-Wasser Emulsion. Weitere Effekte die durch die Zugabe von Schmelzsalzen neben der Stabilisierung der Öl-in-Wasser Emulsion stattfinden, sind die Entfernung des Calciums aus dem Protein, die Hydratation und Quellung des Paracaseins, eine pH-Wert-Erhöhung und Pufferung sowie die Struktur-ausbildung (Cavalier-Salou und Cheftel 1991, Caric und Kaláb 1993, Marchesseau et al. 1997). Letztendlich führt die Zugabe der Schmelzsalze zur einer geschmeidigen und homogenen Schmelzkäsemasse. Im allgemeinen werden als Schmelzsalze die Natriumsalze der Phosphor- und Citronensäure verwendet. Die besten Effekte werden mit Schmelzsalzen erreicht, in welchen ein monovalentes Kation, meistens Natrium, mit einem polyvalentem Anion kombiniert ist. Polyvalente Anionen haben eine höhere Wasserbindungskapazität als monovalente Anionen. Die Puffereigenschaften der Phosphate hängen von deren Kettenlänge ab. So haben Mono- und Diphosphate eine hohe Pufferkapazität und sind deshalb als pH-Wert-Korrektoren geeignet. Mit steigender Kettenlänge nimmt die Pufferkapazität ab (Schar und Bosset 2002, Guinee et al. 2004). Eine geeignete Schmelzsalzmischung führt



**Abb. 2-7:** Wirkungsweise ionenaustauschender Salze (Schmelzsätze) am Beispiel von Dinatriumhydrogenphosphat; nach Berger et al. (1989)

zur Erhöhung des pH-Wertes von 5,0–5,5 bis zu 5,6–5,9 und gleichzeitig zur pH-Wert-Stabilisierung aufgrund der Pufferkapazität (Gupta et al. 1984, Cavalier-Salou und Cheftel 1991, Marchesseau et al. 1997).

Sowohl der Einsatz von Schmelzsätzen als auch die Schereinwirkung während des Mischvorgangs bedingen die Verteilung und die Größe der Fettkügelchen und folglich die Mikrostruktur und die Textur des Schmelzkäses. Für Trinatriumcitrat wurden im Vergleich zu Dinatriumphosphat größere Durchmesser der Fettkügelchen sowie eine verbesserte Schmelzbarkeit beobachtet (Guinee 2002). Awad et al. (2002) berichten über die Abnahme der Anzahl an Fettkügelchen im Schmelzkäse nach Zusatz von Citraten oder Monophosphaten. Die Verteilung der kugelförmigen, zwischen 1 und 10  $\mu\text{m}$  großen und in eine kontinuierliche Proteinmatrix eingebetteten Fetteilchen kann mittels elektronenmikroskopischer Methoden beobachtet werden (Heertje et al. 1981, Lee et al. 1981, Kaláb et al. 1987, Klostermeyer und Buchheim 1988, Berger et al. 1989, Savello et al. 1989, Kaláb 1995, Marchesseau et al. 1997). Die Verteilung des Fettes sowie des Paracaseinates im Schmelzkäse ist homogener als im Rohkäse und deshalb die Koaleszenz der Fettkügelchen signifikant niedriger. Die

Fettkügelchen in der kontinuierlichen Matrix variieren in ihrer Größe, sind aber signifikant kleiner als im Rohkäse (Heertje et al. 1981, Lee et al. 1981, Kaláb et al. 1987, Savello et al. 1989, Caric und Kaláb 1993). Die Paracaseinat-Membran, welche die Oberfläche der freien Fettkügelchen bedeckt, ist verbunden mit den Matixsträngen und für die Kontinuität des Gelnetzwerkes verantwortlich (Auty et al. 2001).

Die Umwandlung des zäh-elastischen Teiges eines Rohkäses in die typische „kurze Struktur“ des Schmelzkäses während des Schmelzprozesses bezeichnet man als „Cremierung“. Sie wird durch Hydratation der Proteine verursacht, vollzieht sich nur während des Schmelzprozesses und ist somit mit der Abkühlung unterbrochen (Spreer 1995). Ist das Hydratationsvermögen der Proteine erschöpft, kommt es zur sogenannten „Übercremierung“. Als „Cremierung“ können demnach die Effekte Hydratation, Viskositätserhöhung und Teigverkürzung zusammengefasst werden (Spreer 1995, Kammerlehner 2003). Das Wasserbindungsvermögen der Proteine spielt hier wahrscheinlich die größte Rolle und zwar durch Verhinderung der Phasentrennung von Protein und Serum (Klostermeyer und Buchheim 1988). Elektronenmikroskopische Aufnahmen belegen, dass durch die Wirkung der Schmelzsalze die aus Caseinmizellen gebildeten Netzwerke aufgelöst werden und in Teilchen der Größe von Caseinmizellen zerfallen, welche anschließend in der wässrigen Phase dispergiert werden. Der Käse verliert demnach einen Teil seiner Struktur und geht vom Proteingel (Rohkäse) in ein Protein-Sol (Schmelzkäse) über (Klostermeyer und Buchheim 1988, Berger et al. 1989). Klostermeyer und Buchheim (1988) zeigten mittels TEM, dass mit dem Einsetzen der „Cremierung“ die Bereiche mit geringer Teilchendichte signifikant kleiner werden. Beim optimaler „Cremierung“ sind die Caseinuntereinheiten gleichmäßig verteilt und die Proteinmatrix damit vollständig homogen. Beim Überschreiten des optimalen „Cremierungs-Zustandes“, der „Übercremierung“, nimmt das dünnviskose zähflüssige Sol eine puddingartige bis feste Konsistenz an. Der Prozeß der „Cremierung“ mit der Herbeiführung einer kurzen Teigstruktur und damit einer guten Streichfähigkeit des Schmelzkäses, darf dementsprechend nicht bis zum Optimum geführt werden.

Ein mittelalter Rohkäse mit einer kurzen Struktur und einem relativen Caseingehalt von 60–75% soll nicht mit der gleichen Intensität bearbeitet werden wie ein junger Käse, dessen lange Struktur erst durch verstärkte mechanische Kräfte in einer kurze Struktur umgewandelt werden muss.

Bei Schmelzkäsezubereitungen wird unter anderem Molkenpulver zugesetzt. Dieses zugesetzte Pulver trägt wegen des geringen Anteils an Proteinpulver kaum zur Strukturver-

---

festigung bei. Lactose und Molkenprotein gemeinsam verfügen jedoch über eine hervorragende Wasserbindefähigkeit ([Kammerlehner 2003](#)). Zudem wird es aus wirtschaftlichen Überlegungen eingesetzt. Milch- und Magermilchpulver begünstigen die Strukturbildung, fördern die Cremierung und verbessern die Konsistenz und Geschmack. Zur Herstellung von stabilem Schmelzkäse ist zudem ausreichend gerüstbildendes Casein (aus Naturkäse) erforderlich. Der absolute Gehalt an intaktem Casein soll dabei mindestens 12 % betragen.



## 3 Experimenteller Teil

### 3.1 Chemikalien

Verwendete Chemikalien unter Angabe von Bestellnummer und Hersteller, soweit im Text nicht anders vermerkt:

Acetonitril CHROMASOLV® gradient grade, 43851, Riedel-de Haën, Seelze

Acrylamid p. A. 10674, Serva, Heidelberg

Ammoniumperoxidsulfat p. A. 13375, Serva, Heidelberg

Ammoniumsulfat p. A. 0032, J.T.Baker, Deventer (Niederlande)

Borsäure p. A. 31146, Riedel-de Haën, Seelze

Bromthymolblau, 103026, Merck AG, Darmstadt

Calciumchlorid-Dihydrat p. A. 10234, Grüssing GmbH, Filsum

Chloroform reinst, 102431, Merck AG, Darmstadt

Coomassie Brilliant Blue G 250 reinst, 17524, Serva, Heidelberg

Cytochrom C, für biochem. Zwecke, Merck AG, Darmstadt

$\delta$ -Decalacton >98 %, W236101, Sigma Aldrich, Taufkirchen

Diacetyl >97 %, W237005, Sigma Aldrich, Taufkirchen

Diethylether reinst, 100926, Merck AG, Darmstadt

2,5-Dimethyl-4-hydroxy-3(2H)-furanon >99 %, 40703, Sigma Aldrich, Taufkirchen

Dimethyltrisulfid p. A. 79592, Sigma Aldrich, Taufkirchen

Di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat p. A. 106580, Merck, Darmstadt

1,4-Dithiothreitol (DTT), 20710, Serva, Heidelberg

Essigsäure p. A. 33209, Riedel-de Haën, Seelze

Ethanol rein 96 % vergällt, 02893, Fluka, Buchs, Schweiz

Furosindihydrochlorid 98,5 %, SC494 G, Neosystems, Straßburg, Frankreich

Glutaraldehyd 25 %, 354400, Merck AG, Darmstadt

Glycerin p. A. 87 %, 104094, Merck AG, Darmstadt

Harnstoff p. A. 51460, Fluka, Taufkirchen

2-Hexanon 98 %, 146881000, Acros Organics, New Jersey, USA  
Iodacetamid >99 %, 57670, Fluka, Taufkirchen  
Kaliumcarbonat p. A. 60110, Fluka, Taufkirchen  
Kaliumdihydrogencitrat p. A. 60214, Fluka, Taufkirchen  
Kaliumchlorid p. A. 60130, Fluka, Taufkirchen  
Kaliumdihydrogenphosphat p. A. 60356, Fluka, Taufkirchen  
Kaliumsulfat p. A. 25107, Riedel-de Haën, Seelze  
 $\alpha$ -Lactalbumin, Arla Foods, Viby J, Dänemark  
 $\beta$ -Lactoglobulin, Institut für Lebensmittelverfahrestechnik, TU München  
Lactose D (+) Monohydrat, 107660, Merck AG, Darmstadt  
Magnesiumchlorid-Hexahydrat p. A. 105833, Merck AG, Darmstadt  
Maiskeinoil, Mazola, Unilever Bestfoods, Hamburg  
Mercaptoethanol >99 %, 63689, Fluka, Taufkirchen  
Methanol p. A. 32213, Riedel-de Haën, Seelze  
Methylenbisacrylamid, p. A. 29195, Serva, Heidelberg  
Methylenblau (C.I. 52015) für Mikroskopie, 115943, Merck AG, Darmstadt  
Methylrot Natriumsalz (C.I. 13020), 106078, Merck AG, Darmstadt  
Molkenprotein, Milacteal 60\*, Milei, Stuttgart  
N,N,N,N-Tetramethylethylendiamin (TEMED), 35930, Serva, Heidelberg  
Natriumazid p. A. 99,5 %, 71289, Fluka, Taufkirchen  
Natriumcarbonat wasserfrei, 106395, Merck, Darmstadt  
Natriumcaseinat p. A. 0222, Rovita GmbH, Engelsberg/Wiesmühl  
Natriumchlorid p. A. 106404, Merck, Darmstadt  
Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat reinst, 106342, Merck, Darmstadt  
Natriumdodecylsulfat reinst, 20760, Serva, Heidelberg  
Natriumhydroxid p. A. 106498, Merck, Darmstadt  
Natriumthiosulfat p. A. 106512, Merck AG, Darmstadt  
Natronlauge 32 %, 30531, Riedel-de Haën, Seelze  
Ninhydrin p. A. 33437, Riedel-de Haën, Seelze  
Orange G (C.I. 16230), 115925, Merck AG, Darmstadt  
Ölrot für Mikroskopie, 105230, Merck AG, Darmstadt  
Phosphorsäure 85 % in Wasser, 452289, Sigma Aldrich, Taufkirchen  
Polyphosphat (langkettig) N16-63, MV1331, Budenheim KG, Budenheim  
Proteinmarker 4 für Elektrophorese, 39208, Serva, Heidelberg

Proteinmarker 5 für Elektrophorese, 39209, Serva, Heidelberg  
 Salzsäure 6N, für Hydrolysen, 6011, J.T.Baker, Deventer (Niederlande)  
 Salzsäure 37 % p. A. 84426 Fluka, Taufkirchen  
 Selenreaktionsgemisch nach Wieninger, 108030, Merck, Darmstadt  
 Schwefelsäure 98 % zur Stickstoffbestimmung, 84727, Fluka, Buchs, Schweiz  
 Sudanschwarz B practical grade, S2380, Sigma Aldrich, Taufkirchen  
 Tashiro-Indikator, 36083, Riedel-de Haën, Seelze  
 Trichloressigsäure p. A. 20742, VWR, Darmstadt  
 Trifluoressigsäure rein, 91700, Fluka, Buchs, Schweiz  
 Trinatriumcitrat-Dihydrat p. A. 106448, Merck AG, Darmstadt  
 Trinatriumorthophosphat N53-40, MV1562, Budenheim KG, Budenheim  
 TRIS (hydroxymethyl)-aminomethan p. A. 37180, Serva, Heidelberg

\*Milchprotein, Milacteal 60 mit 60 % Protein (davon 20,3 %  $\alpha$ -Lactalbumin und 60,15 %  $\beta$ -Lactoglobulin), 25 % Lactose, 5 % Fett, 64 % Asche, < 5 % Wasser.

Alle zu chromatographischen Bestimmungen eingesetzten Fließmittel wurden mit Reinstwasser hergestellt, membranfiltriert und 15 min im Ultraschallbad entgast.

## 3.2 Material und Geräte

Liste der verwendeten Materialien und Geräte sofern nicht an entsprechender Stelle detailliert beschrieben:

Analysenwaage	BP 121S und BP 3100S, Sartorius, Göttingen
Aminosäureanalysator	LKB-alpha plus Biochrom, Cambridge, UK
Blutzählkammer	Tiefe 0,1 mm, 1/25 + 1/400 mm <sup>2</sup> , Bürker-Türk Feinoptik, Bad Blankenburg
Dialyse	Dialyse-Cellulose Membran, Ausschlußgröße 12kDa, Sigma Aldrich, Taufkirchen
Elektronenmikroskop	Rasterelektronenmikroskop DSM 982 GEMINI mit thermischer Feldemissionskathode, Carl Zeiss, Oberkochen und AGAR Manual Sputter Coater B7340, Agar Scientific Ltd., Stansted, Essex, England Transmissionselektronenmikroskop FEI Company, Philips,

	Niederlande, mit Gefrieranlage Jet-Gefriergerät JFD 030 und Hochvakuum-Gefrierätzanlage BA 360 M Balzers, Lichtenstein
Elektrophorese	Elektrophoresekammer vertikal SE 600, Gradient-Gießkammer SG50, Scientific Instruments, San Francisco Schüttelplatte Polymax 1040, Heidolph Instruments, Schwabach Scanner Mastek Scanexpress 12000 SP, Mastek Villingen-Schwenningen Software Image Master 1D Elite, Amersham Biosciences München
Fluoreszenz- spectrophotometer	F-4500, Hitachi, Pleasanton, US
Gefriertrocknungs- anlagen	ALPHA 1-2, Christ, Osterode BETA 1-8K, Christ, Osterode
Hydrolyseröhrchen	20 ml, Schott Glas, Mainz
Kalorimeter	Wärmestromkalorimeter DSC 121, Setaram, Frankreich
Kjeldahl-Anlage	Büchi Scrubber B-414, Digestion Unit K-435 und Destillation Unit B-324, Büchi Labortechnik AG, Flawil, Schweiz Dosimat 775 Metrohm mit Metrohm Stirrer 728, Methrom, Filderstadt
Kolbenhubpipetten	Eppendorf Reference und Research, unterschiedliche Volumina, Eppendorf-Nethler-Hinz, Hamburg
Küvetten	Einmal-Küvetten, 2,5 ml, Brand GmbH, Wertheim
Lichtmikroskop	Forschungsmikroskop LUMIPAN Carl Zeiss, Jena mit Kodak Digital Science DC 40 Camera, Kodak GmbH, Stuttgart Mikroskop Axiostar Carl Zeiss, Jena Mikroskop Jena Labor SFBN Mechanik, Bucha/Jena
Membranfilter	RC-L-55, regenerierte Cellulose, Durchmesser 47 mm, Porengröße 0,45 $\mu\text{m}$ , unsteril, Schleicher und Schüll, Dassel Spritzenvorsatzfilter SPARTAN 13/0,2 RC, regenerierte Cellulose, Durchmesser 13 mm, Porengröße 0,45 $\mu\text{m}$ und 0,2 $\mu\text{m}$ , Schleicher und Schüll, Dassel
Penetrometer	PNR10, Petrotest Instruments, Dahlewitz
pH-Meßgerät	inoLab level 2, WTW, Weinheim

---

Photometer	Ultrospek 1000, Pharmacia Biotech, Freiburg
Reagenzglasschüttler	MS1 Minishaker, IKA Labortechnik, Staufen
Reaktionsgefäße	1,5 ml und 2,0 ml, safe-lock, Eppendorf-Nethler-Hinz, Hamburg
Rollrandschnappdeckelgläser	10 ml, VWR International, Darmstadt
Rotationsverdampfer	Laborota 4000, Heidolph, Schwabach
Rühr- und Heizwerk	RH basic mit Thermometer ETS-D4 fuzzy, IKA Labortechnik Staufen
Schraubreagenzgläser	Duran 12 mm x 100 mm, GL 14 und Duran 16 mm x 160 mm, GL 18, Schott Glaswerke, Mainz
Temperierbad	Haake K 15 mit Thermostat Haake DC 10, Gebrüder Haake Karlsruhe
Tensiometer	Dataphysics DCAT 11, Wilhelmy Platte Pt 11 nach DIN 53914, Software SCAT 12, DataPhysics Instruments GmbH, Filderstadt
Texturanalyse	Texture Analyser TA-XT2i, Meßzelle 50-1 kg, Meßstempel mit 6 mm Durchmesser, Stable Micro Systems, Surrey, UK
Thermomix	TM21, Vorwerk, Wuppertal
Trockenschrank	Modell 200, Memmert, Schwabach
Ultraschallbad	Ultraschallbad RK50, Bandelin, Berlin
Ultra-Turax	Janke und Kunkel GmbH / CO. KG-IKA Labortechnik, Staufen
Vakuumkonzentrator	Speed Vac Plus SC 110 AR mit Universal Vacuum System Plus UVS40 A, Avant, Farmingdale, USA Savant SPD 131 DDA speed vac, Global Medical Instrumentation, Ramsey, Minnesota, USA
Vakuumpumpe	CVC 2, Vacuubrand, Wertheim
Wärmestromkalorimeter	DSC 121, Setaram, Frankreich
Zentrifugen	Biofuge pico, Heraeus Instruments, Hanau Centrifuge 5804R, Eppendorf-Nethler-Hinz, Hamburg

### 3.3 Proteinbestimmung nach Kjeldahl

#### *Chemikalien und Lösungen*

Katalysatorgemisch nach Wieninger

Natronlauge 10 %

100 g Natriumhydroxid Plätzchen einwiegen und auf 1 l mit dest. Wasser auffüllen.

Borsäure 2 %

100 g Borsäure einwiegen und mit destilliertem Wasser auf 5 l auffüllen.

Schwefelsäure 0,1 N

Der Inhalt einer Schwefelsäureampulle Testal in einen Maßkolben überführen und mit destilliertem Wasser auf 1 l auffüllen.

Mischindikator nach Tashiro

Lösung A:

150 mg Methylrot in 365 ml Ethanol (96 % vol.) lösen und mit destilliertem Wasser auf 500 ml auffüllen.

Lösung B:

100 mg Methylenblau in einen 100 ml Maßkolben einwiegen und mit destilliertem Wasser auffüllen.

Indikator:

100 ml der Lösung A und 15 ml der Lösung B miteinander vermischen.

#### *Proteinbestimmung*

Zur Überprüfung des Proteingehaltes des Molkenpulvers ca. 0,05 g in den Kjeldahlkolben geben und eine Spatelspitze Katalysatorgemisch nach Wieninger zugeben und mit 10 ml Schwefelsäure erhitzen. Der Aufschluss ist beendet, wenn die Lösung klar erscheint. Nach dem Abkühlen den Kolben direkt mit seinem gesamten Inhalt zur automatischen Destillation an der Destillationapparatur Büchi B-324 einsetzen. Das Destillat in einer Borsäurelösung (2 %) auffangen und direkt im Anschluss mit 0,1 N Schwefelsäure gegen Tashiro-Indikator titrieren. Die Titration erfolgt mittels Dosierautomat bis zum Farbumschlag von grün nach violett.

Auf gleiche Weise zur Bestimmung der Wiederfindung mit Ammoniumsulfat vorgehen, wobei den Feststoff direkt in den Aufschlusskolben einwiegen. Für den Blindwert analog verfahren, jedoch ohne Probeneinwaage.

*Destillationseinstellung:*

Wasser	30 ml
Natronlauge	50 ml
Borsäure	50 ml
Delay	3 s
Destillationsdauer	4 min
Dampf	100 %
ASPIR	SAM

### 3.4 Lactosylierung der Molkenproteine

Die Reaktion der Molkenproteine erfolgt mit der im verwendeten Molkenproteinpulver (Miltactal 60: 60 % Protein, 25 % Laktose, 5 % Fett, 4 % Asche, <5 % Wasser) enthaltenen Laktose bei 60 °C im Trockenschrank unter Variation der Erhitzungszeit (6, 12, 18, 24, 60 und 96 Stunden). Das Lysin-Laktoseverhältnis beträgt dabei 1: 2,03, der  $a_w$ -Wert 0,5.

Für die Durchführung 2 l-Schottflaschen mit ca. 300 g Molkenproteinpulver füllen sowie zur besseren Wärmeverteilung mit Aluminiumfolie umwickeln. Die Proben nach abgeschlossener Reaktion kühlen und bei ca. 5 °C aufbewahren.

### 3.5 Bestimmung der Lysinmodifizierung (Glykosylierungsgrad)

#### 3.5.1 Probenvorbereitung für die Aminosäureanalyse

*Saure Hydrolyse*

10 mg der jeweiligen Probe auf 1 mg genau in Schott®-Schraubreagenzgläser einwiegen, mit 10 ml 6 N Salzsäure versetzen und nach Verschließen und Umschütteln in einem vorgeheizten Sandbad im Trockenschrank 23 h bei 110 °C hydrolysieren. Zur Dichtheitskontrolle die Reagenzgläser vor und nach der Hydrolyse wiegen. Anschließend die Ansätze im Eisbad abkühlen, nach Filtration über ein Weißbandfilter ein Aliquot abnehmen (1 ml) und in einer Vakuumzentrifuge zur Trockne einengen. Den Rückstand in 1 ml Natriumcitratpuffer (0,2 mol/l, pH 2,2) aufnehmen (Henle et al. 1991), 15 Minuten mit Ultraschallbad

behandeln und danach gut mittels Vortex durchmischen. Vor der Aminosäureanalyse die Lösung durch 0,45  $\mu\text{m}$  regenerierten Cellulosefilter filtrieren. 20  $\mu\text{m}$  der Lösung direkt in den Aminosäureanalysator einspritzen.

### 3.5.2 Aminosäureanalyse (ASA)

Gerät	Alpha Plus Aminosäureanalysator (LKB Biochrom, Cambridge, UK)
Säule	PEEK (4,6 x 125) mm
Kationenaustauscher	Harz 5 $\mu\text{m}$ , Serie 686, Analysentechnik K. Grüning, Olching
Fluss	0,27 ml/min
Temperaturgradient	55 bis 85 °C
Detektion	Nachsäulenderivatisierung mit Ninhydrin
Detektor	VIS-Photometer, $\lambda = 570 \text{ nm}$
Puffer	siehe <a href="#">Henle et al. (1991)</a> und <a href="#">Krause (2005)</a>
Methode	siehe <a href="#">Henle et al. (1991)</a> und <a href="#">Krause (2005)</a>

### 3.5.3 Auswertung

Integration der Peaks mittels Eurochrom 2000 chromatography Software (Knauer GmbH, Berlin) durchführen. Es erfolgt mindestens eine Dreifachbestimmung. Nach der Furosin-Bestimmung erfolgt die Berechnung der Lysinmodifizierung nach [Finot et al. \(1977\)](#) unter Benutzung der Umrechnungsfaktoren von [Krause et al. \(2003\)](#).

## 3.6 Bestimmung des Oligomerisierungsgrades

### 3.6.1 Probenvorbereitung für die Gelpermeationschromatographie (GPC)

#### *Puffer*

Elutionspuffer

6 M Harnstoff / 0,1 M NaCl / 0,1 M Phosphat / 0,1 % 3-[3-Cholamidopropyl]dimethylammonium]-1-propansulfonat (CHAPS); pH 6,8

360,36 g Harnstoff, 5,84 g NaCl, 17,80 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  und 1,0 g 3-[3-Cholamidopropyl]-

dimethyl-ammonium]-1-propansulfonat (CHAPS) in ca. 800 ml bidest. Wasser lösen, mit konz. HCl auf pH 6,80 einstellen und mit bidest. Wasser auf 1000 ml auffüllen, membranfiltrieren (0,45  $\mu\text{m}$ ) und entgasen. Die Lösung ist bei 4 °C eine Woche haltbar.

#### Probenpuffer

6 M Harnstoff / 0,1 M NaCl / 0,1 M Phosphat / 0,1 % 3-[3-Cholamidopropyl)dimethylammonium]-1-propansulfonat (CHAPS) / 1 % DTT; pH= 6,8

Die Herstellung erfolgt entsprechend dem Elutionspuffer unter Zusatz von 1 g 1,4-Dithiothreitol auf 100 ml Elutionspuffer.

#### Molkenproben

2 mg Molkenpulver pro 2 ml Elutionspuffer bzw. Probenpuffer miteinander vermengen und um eine vollständige Reduktion zu erreichen, ca. 24 h bei 4 °C inkubieren. Um eventuelle Verunreinigungen zu beseitigen, vor der GPC membranfiltrieren (0,45  $\mu\text{m}$ ).

### 3.6.2 Gelpermeationschromatographie (GPC)

System	Wellchrom Knauer mit Autosampler A-900, HPLC-Pumpe K-1001, Injektor, UV-Detektor K-2501 (ausschliesslich WellChrom Knauer, Berlin)
Säule	Superdex 200HR 10/30, Pharmacia, Freiburg
Fluss	0,5 ml/min
Injektionsvolumen	150 $\mu\text{m}$
Probenkonzentration	0,1 % Proteinlösung
Detektion	UV/VIS $\lambda = 280 \text{ nm}$
Datenaufnahme	ECW 2000 Integration Package Software Version 1.2.

## 3.7 Dialyse der Molkenlösungen

#### Chemikalien und Lösungen

Essigsäure 5 %

Synthetisches Milchultrafiltrat (SMUF) pH 6,8 nach Jenness und Koops (1962):

- Lösung A:

15,80 g Kaliumdihydrogenphosphat, 12,0 g Kaliumcitrat, 17,91 g Natriumcitrat, 1,8 g Kaliumsulfat und 6,0 g Kaliumchlorid einwiegen und mit destilliertem Wasser auf 200 ml auffüllen.

- Lösung B:

13,19 g Calciumchlorid und 6,51 g Magnesiumchlorid in 200 ml mit destilliertem Wasser lösen.

Zur Herstellung der SMUF-Lösung 20 ml Lösung A in 800 ml destilliertem Wasser vorlegen, 0,30 g Kaliumcarbonat und 20 ml Lösung B zufügen und den pH-Wert mit 0,1 N Kaliumhydroxidlösung auf 6,8 einstellen. Zum Schluss auf 1000 ml aufgefüllen.

#### *Durchführung der Dialyse*

Für die Dialyse die Celluloseschläuche (Ausschlussgröße 12 kDa) mindestens 24 Stunden in 5 %iger Essigsäure einweichen sowie anschliessend mit destilliertem Wasser sorgfältig spülen. Jeweils 80 ml der 0,4 %igen Molkenproteinlösungen in die vorbereiteten Schläuche einfüllen und nacheinander je 24 Stunden gegen fließendes Leitungswasser, destilliertes Wasser und gegen synthetisches Milchultrafiltrat bei 6 °C dialysieren, um die freie Lactose zu entfernen. Die Lösung quantitativ in einen Maßkolben überführen und mit SMUF zu 100 ml auffüllen. Da der Proteingehalt des Molkenpulvers 60 % beträgt, resultieren für die Probelösungen Proteinkonzentrationen von ca. 0,2 %.

### 3.8 Erhitzungsexperimente

Von den dialysierten als auch nicht-dialysierten Molkenproteinlösungen (in SMUF bzw. dest. Wasser) 10 ml in Reagenzgläser geben und diese mit Gummistopfen verschliessen. Im vortemperierten Wasserbad bei 75, 80, 85 und 90 °C zu verschiedenen Zeiten (5, 10, 15, 20, 25, 30 min) erhitzen. Danach sofort im Eiswasser kühlen.

### 3.9 Bestimmung des Denaturierungsgrades

#### (RP-HPLC)

Probenvorbereitung und Wahl der Analysenbedingungen erfolgt nach einer standardisierten Methode der International Dairy Federation zur Bestimmung des säurelöslichen  $\beta$ -Lg

(IDF-Standard 1996) in Anlehnung an Resmini et al. (1989), Block et al. (1998), Bouhallab et al. (1999), Clawin-Rädecker et al. (2000b), Morales et al. (2000). Die im Bereich ihres isoelektrischen Punktes löslichen Molkenproteine chromatographisch an einer Umkehrphase trennen und nach UV-Detektion quantifizieren.

#### *Chemikalien und Lösungen*

Acetonitril 100 %

Salzsäure 2 M und 0,3 M

Trifluoressigsäure

Phosphatpuffer pH 6,7

- Lösung A:

Zur Herstellung einer 0,2 M Natriumdihydrogenphosphat-Lösung 3,12 g Salz einwiegen und im Maßkolben zu 100 ml mit destilliertem Wasser auffüllen.

- Lösung B:

3,56 g Dinatriumhydrogenphosphat einwiegen und mit destilliertem Wasser auf 100 ml auffüllen.

57 ml Lösung A und 43 ml Lösung B mischen und auf 200 ml mit destilliertem Wasser auffüllen.

### 3.9.1 Durchführung

Zur Probenvorbereitung die erhitzten sowie nativen Proben unter ständigem Rühren bei Verwendung eines pH-Meters mit 2 N bzw. 0,3 N Salzsäure auf pH 4,6 ansäuern. Nach mindestens 20 minütigem Stehen für 20 Minuten bei 2000 U/min zentrifugieren. Vom Überstand 3 ml in einen 10 ml Maßkolben überführen und mit Phosphatpuffer bis zur Marke auffüllen. Nach gründlichem Mischen eine Stunde stehen lassen und durch 45  $\mu$ m Mikrofilter in Glasvials filtrieren.

Zur Herstellung der Standardlösung 10 mg  $\beta$ -Lg in einen 25 ml Maßkolben einwiegen und mit Phosphatpuffer bis zur Marke auffüllen. Diese Lösung nach Filtration direkt zur chromatographischen Messung verwenden.

### 3.9.2 Analytische HPLC

Agilent 1100 mit Autosampler G1329A, binärer Hochdruckpumpe G1312A, UV-Detektor G1315B, Säulenofen G1316A, Degasser G1379A, Fluoreszenzdetektor G1321A, Rechnergestützte Datenaufnahme mittels ChemStation for LC 3D (ausschliesslich Agilent Technologies, Waldbronn)

Knauer WellChrom HPLC-System, Solvent Organizer K-1500, 2 Pumpen K-1001, UV-Detektor K-2701, DAD-Detektor K-2700, Säulenthermostat, 4-Kanal Degasser K-5004, Rechnergestützte Datenaufnahme mittels Knauer WellChrom (ausschliesslich Knauer, Berlin)

#### *HPLC-Bedingungen*

Trennsäule	PLRP-S, 8 $\mu\text{m}$ , 300 A, 150 x 4,6 mm Polymer Laboratories, Darmstadt
Fließmittel A	Trifluoressigsäure 0,1 % in Wasser (v/v)
Fließmittel B	Trifluoressigsäure 0,1 % in Acetonitril (v/v)
Equilibrationszeit	15 min
Fluss	1 ml/min
Säulentemperatur	40 °C
Einspritzvolumen	80 $\mu\text{l}$
Detektion	DAD 205 nm und 280 nm

**Tab. 3-1:** Elutionsgradient für die RP-HPLC

Zeit [min]	Solvent A [%]	Solvent B [%]
0,0	65	35
1,0	65	35
8,0	62	38
16,0	58	42
22,0	54	46
22,5	0	100
23,0	0	100
23,5	65	35

## 3.10 Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Untersuchungen erfolgen nach Praktikumsvorschrift der Professur für Lebensmittelchemie der Technischen Universität Dresden in Anlehnung an [Manderson et al. \(1998\)](#), [Morgan et al. \(1999a\)](#), [Bertrand-Harb et al. \(2002\)](#), [Chevalier et al. \(2002\)](#), [Anema et al. \(2006\)](#).

Die zu untersuchenden Proteine nach Vorbehandlung mit Natrium-Dodecyl-Sulfat (SDS) auffalten und die Anionen mit einer negativen Ladung anlagern lassen. Auf einem Polyacrylamidgel (PAG) erfolgt unter der Wirkung eines elektrischen Feldes die Auftrennung nach Molekulargewicht. Die aufgetrennten Proteine durch Zusatz eines Farbstoffes einfärben und densitometrisch quantifizieren.

### 3.10.1 Lösungen

#### *Lösungen zur Gelherstellung*

##### Acrylamid-Stammlösung

52,4 % Acrylamid / 1,6 % Methylenbisacrylamid

26,19 g Acrylamid und 0,81 g Methylenbisacrylamid in bidestilliertem Wasser lösen und auf 50 ml auffüllen. Die hergestellte Lösung ist eine Woche bei 4 °C haltbar.

##### Trenngelpuffer pH 8,5

3,2 M Tris / 11,1 mM SDS pH = 8,5

19,47 g Tris und 0,16 g SDS auf 50 ml mit bidestilliertem Wasser auffüllen und mit 6 N Salzsäure auf pH 8,5 einstellen. Die erzeugte Lösung ist ein Jahr bei 4 °C haltbar.

##### Per-Lösung

1,5 M Ammoniumperoxodisulfat

430 mg Ammoniumperoxodisulfat in 1 ml bidestilliertem Wasser lösen. Die entstehende Lösung ist lichtgeschützt bei Temperaturen um 4 °C höchstens einen Tag haltbar.

#### *Lösungen zur Probenvorbereitung unter reduzierenden Bedingungen*

#### Probenpuffer

0,8 M Tris / 2 mM EDTA / 70 mM SDS/ 2 % Orange G / 27,6 % Glycerol

4,84 g Tris, 0,03 g EDTA, 1,0 g SDS und 0,01 g Orange G in ca. 25 ml Wasser und 13,8 ml Glycerol (87 %) lösen, mit 6 N HCl auf pH 8,0 einstellen und auf 50 ml bidest. Wasser auffüllen. Wenn es sich um feste Proben handelt, die so hergestellte Lösung im Verhältnis 1:1 mit 6 M Harnstofflösung verdünnen, wobei den Harnstoff erst in den Maßkolben einwiegen und dann im Probenpuffer und bidest. Wasser lösen.

#### Iodacetamidlösung

16,7 % Iodacetamid

0,2 g Iodacetamid in 1 ml bidestilliertem Wasser lösen. Bis zur Verwendung die Lösung lichtgeschützt aufbewahren.

#### DTT-Lösung

43 % Dithiothreitol

0,15 g Dithiothreitol in 0,2 ml bidestilliertem Wasser lösen.

#### Harnstofflösung

6 M Harnstoff

18 g Harnstoff in 50 ml-Maßkolben einwiegen, mit bidest. Wasser lösen und auf 50 ml mit bidest. Wasser auffüllen.

#### *Lösungen zur Auswertung*

##### Marker

Je 10 mg Elektrophoresemarker 4 und 5 in je 1 ml Elektrophoresepuffer lösen. Diese Lösungen anschließend zu gleichen Teilen mischen. Das Proteingemisch enthalten Moleküle bekannter Größe.

##### Elektrophoresemarker 4:

Carbonic anhydrase	29000 Da
Albumin egg	45000 Da
Albumin bovine	67000 Da
Phosphorylase B	97400 Da

##### Elektrophoresemarker 5:

Trypsin inhibitor bovine	6500 Da
--------------------------	---------

Cytochrom C	12500 Da
Trypsin inhibitor soybean	21000 Da
Carbonic anhydrase	29000 Da

#### Cytochrom

5 mg Cytochrom in 500  $\mu$ l 6 M Harnstoff lösen.

#### *Pufferlösungen für die Elektrophoresekammer*

##### Anodenpuffer

0,2 M Tris, pH = 8,9

121,1 g Tris in ca. 1 l bidest. Wasser lösen, mit 1 N HCl auf pH 8,9 einstellen und auf 5 l mit bidest. Wasser auffüllen.

##### Kathodenpuffer

1 M Tris / 0,1 M Tricin / 3,5 mM SDS

12,1 g Tris, 17,9 g Tricin und 1,0 g SDS in ca. 500 ml bidest. Wasser lösen und auf einen 1 l auffüllen. Keine pH-Wert-Einstellung mit HCl.

#### *Lösungen für Detektion*

##### Fixierlösung

20 g Trichloressigsäure (0,12 M) auf 1 l mit destilliertem Wasser auffüllen.

##### **Blaufärbung**

##### Färbelösung

Wasser / Methanol / Eisessig 65:25:10 (v/v) / 0,04 % Coomassie Brilliantblau G 250

Dest. Wasser, Methanol und Eisessig in einem Verhältnis von 65:25:10 mischen und pro Liter mit 400 mg Coomassie Brilliantblau G 250 versetzen.

##### Entfärbelösung

Wasser / Methanol / Eisessig 65:25:10 (v/v)

Wasser, Eisessig und Methanol im Verhältnis 65:25:10 mischen.

##### **Silberfärbung**

##### Ethanolische Entfärbelösung

Ethanol (96 %, vergällt) und destilliertes Wasser zu gleichen Anteilen mischen.

##### Sensibilisierungslösung

4,0 g Natriumthiosulfat in destilliertem Wasser lösen und auf 100 ml auffüllen. Von dieser

Stammlösung 2,5 ml auf 500 ml auffüllen und 40  $\mu\text{l}$  Formaldehyd (37 %ig) zusetzen.

*Imprägnierlösung*

1,0 g Silbernitrat in 500 ml Wasser lösen und 375  $\mu\text{l}$  Formaldehyd (37 %ig) zusetzen.

*Entwicklerlösung*

11,0 g Natriumcarbonat in 500 ml destilliertem Wasser lösen und 500  $\mu\text{l}$  Formaldehyd (37 %ig) sowie 25  $\mu\text{l}$  Natriumthiosulfat-Stammlösung (siehe oben) zugeben.

*Stopplösung*

500 ml einer Lösung aus Methanol, Eisessig und Wasser (25:10:65) 5 ml einer 0,04-0,05 M EDTA-Lösung zugeben.

### 3.10.2 Probenvorbereitung für die SDS-PAGE

Um vielfältige Einflüsse zu untersuchen und diskutieren zu können, wird für die ersten Proben die gesamte Lösung vor und nach der Erhitzung zu verschiedenen Zeiten verwendet. In weiteren Ansätzen wird stets zusätzlich auf pH 4,6 eingestellt. Zur Elektrophorese sowohl die Gesamtlösung als auch lösliche und unlösliche Fraktion getrennt einsetzen. Das nach Ansäuern und Zentrifugieren erhaltene Präzipitat völlig in 4,5 ml 6 M Harnstoff lösen. Zu 1 ml Aliquot 0,5 ml Probenpuffer geben. Der lösliche Überstand in gleicher Weise wie die Gesamtlösung vorbereiten. Ein Teil mit je einem Teil 6 M Harnstoff und Probenpuffer versetzen und auf das vorbereitete Gel auftragen. Um später eine qualitative Auswertung vornehmen zu können, zum Vergleich ein Gemisch aus Elektrophoresemarker 4 und 5 mit Proteinen bekannter Größe verwenden.

#### *Probenreduktion*

Für die Reduzierung der Disulfidbrücken die Proben wie folgt vorbereiten. 10  $\mu\text{l}$  DTT-Stammlösung zu 500  $\mu\text{l}$  Probenlösung (mit Puffer und Harnstoff) zugeben und 4 min im siedenden Wasserbad erhitzen. Unter fließendem Wasser kühlen, weitere 5  $\mu\text{l}$  DTT-Stammlösung und 50,5  $\mu\text{l}$  Iodacetamidlösung zugeben und vor der Auftragung auf das Gel 30 min reagieren lassen.

### 3.10.3 Herstellung eines Gradientengels

Zur Herstellung eines Dichtegradientengeles (4-20 %) je 7 ml der vorbereiteten Lösungen für das leichte und schwere Gel in die gekühlte Mischkammer geben. Nach Zugabe von 10  $\mu\text{l}$  Per-Lösung die Kammern öffnen, wobei durch kontinuierliches Zumischen von leichter zur schweren Lösung ein Gel mit abnehmender Dichte entsteht. Für die Ausbildung des Dichtegradienten das Gel 15 min im Kühlraum (6 °C) und 30 min bei Raumtemperatur ruhen lassen. Danach für eine Stunde bei 40 °C polymerisieren lassen, wobei wenige  $\mu\text{l}$  Wasser als Verdunstungsschutz auf das Gel auftragen. Zum Schluss ein Spacergel konstanter Dichte gießen und in dessen Taschen später die Proben einbringen. In das noch flüssige Spacergel den Probenkamm einsetzen. Um vollständige Polymerisation zu erreichen, das Gel mit Folie bedecken und über Nacht bei 4 °C lagern.

**Tab. 3-2:** Herstellung eines Gradientengeles für die SDS-PAGE

	Trenngel schwer (20 % Acrylamid)	Trenngel leicht (4 % Acrylamid)	Spacergel (20 % Acrylamid)
Acrylamidlösung [ml]	3,704	0,741	0,741
Gelstamm-puffer [ml]	3,120	3,120	3,120
Glycerol (87 %) [ml]	3,066	-	-
mit bidestilliertem Wasser auf 10 ml auffüllen			
TEMED [ $\mu\text{l}$ ]	10	10	10
Lösungen im Vakuum entlüften			
Per [ $\mu\text{l}$ ]	10	10	20

### 3.10.4 Elektrophoresebedingungen

#### *Parameter der Analyse*

Kammer	vertikale Elektrophoresekammer
Temperatur	10 °C
Gelstärke	0,75 mm

Gel                                      Gradientengel (4-20 % Acrylamid)  
    Spacergel (4 % Acrylamid)

### *Elektrophoreseprogramm*

In Tab. 3-3 ist das verwendete Elektrophoreseprogramm näher beschrieben. Werden zwei Gele gleichzeitig der Elektrophorese unterzogen, die Stromstärke jeder Phase verdoppeln.

**Tab. 3-3:** Elektrophoreseprogramm

Phase	Zeit [h]	Spannung [mA]	Stromstärke [V]
1	1	400	25
2	3	800	55
5	1	800	55

### 3.10.5 Detektion

Nach erfolgtem Elektrophoreselauf das Gel vorsichtig aus den Glasplatten lösen und für 20 min fixieren, danach 3mal mit dest. Wasser waschen und für 15-20 min färben. Um das Gel auswerten zu können, zweimal für 20-30 min mit Entfärbelösung behandeln. Die Detektion und Auswertung mit Image Master Scan und der Software Image Master 1D Elite v 3.00 vornehmen.

## 3.11 Differential-Scanning-Calorimetrie (DSC)

Die Untersuchung erfolgt in Anlehnung an Relkin (1994), Jou und Harper (1996), Verheul et al. (1998), Broersen et al. (2004), van Teeffelen et al. (2005).

### 3.11.1 Probenvorbereitung und Durchführung

Für die Thermoanalyse Molkenproteinlösungen mit definierter Konzentration herstellen, um den Vergleich untereinander zu gewährleisten. Die Proben nach Einschluss in Probentiegel

aus Edelstahl mit konstanter Geschwindigkeit erwärmen. Die dazu benötigte Energie wird registriert und mit einer Referenz verglichen. Die ermittelte Energiedifferenz in Abhängigkeit der Temperatur auftragen.

Für die DSC-Analyse muss der Proteingehalt höher als die bisher verwendeten Lösungen gewählt werden. Deshalb die dialysierten Lösungen einfrieren und anschließend gefriertrocknen. Aus dem dabei erhaltenen laktosefreien Molkenproteinpulvern nach Zugabe von destilliertem Wasser etwa 25%-ige Probelösungen herstellen. Als nicht glykosylierte Probe dient eine ca. 25%-ige Lösung von gefriergetrocknetem  $\beta$ -Lg-Standard in destilliertem Wasser und in SMUF. Eine zweite Probenreihe ohne vorherige Dialyse und Gefrier-trocknung untersuchen, um den Einfluss freier Laktose aufzuzeigen. Dazu direkt 25%-ige Lösungen der verschiedenen glykosylierten Molkenpulver herstellen. Da das verwendete Molkenpulver bereits einen produktspezifischen Salzgehalt aufweist, in destilliertem Wasser lösen.

### 3.11.2 DSC-Analyse

Die Thermoanalyse wurde freundlicherweise von Frau A. Göpfert (Institut für Physikalische Chemie und Elektrochemie, Technische Universität Dresden) durchgeführt.

Für die DSC 60 bis maximal 100 mg der vorbereiteten Lösungen in Edelstahlstahlkapseln geben, dabei genau einwiegen. Danach kalt verschweißen und den Inhalt luftdicht einschließen. Im Messraum des Kalorimeters erfolgt nach Temperierung der Probe auf 20 °C die Erhitzung mit 5 °C/min zu 120 °C.

## 3.12 Fluoreszenzanalytik

Die Untersuchung erfolgt in Anlehnung an [Manderson et al. \(1999\)](#), [Palazolo et al. \(2000\)](#), [Lotte \(2004\)](#) an der Professur für Allgemeine Biochemie der Technischen Universität Dresden.

### 3.12.1 Probenherstellung

Auf Literaturangaben basierend aus den verschiedenen glykosylierten Molkenproteinpulvern 0,5%-ige Lösungen herstellen und wie unter [3.7](#) angegeben dialysieren. Für alle Messungen

jeweils 1 ml Proteinlösung im Maßkolben auf 5 ml verdünnen.

### 3.12.2 Hitzedenaturierung

5 ml der Molkenproteinlösungen (0,5%-ig in Wasser) 10 Minuten bei 80 °C im Wasserbad erhitzen und danach sofort mit Eiswasser kühlen. Das Fluoreszenzspektrum bei konstanter Anregungswellenlänge von 295 nm zwischen 300 und 400 nm aufnehmen.

### 3.12.3 Messparameter

Messmethode	Emission
Anregungswellenlänge	295 nm
Messbereich	300 - 400 nm
Scan speed	60 nm / min
Sensitivität	1 Messpunkt / nm

## 3.13 Bestimmung der Oberflächenspannung

Die Bestimmung der Oberflächenspannung erfolgt am Institut für Lebensmittel- und Bioverfahrenstechnik der Technischen Universität Dresden.

### *Chemikalien und Lösungen*

Phosphatpuffer nach Sørensen

Für die Herstellung des Phosphatpuffers nach Sørensen werden zunächst die beiden Lösungen A und B benötigt.

Herstellung Lösung A:

9,078 g Kaliumdihydrogenphosphat einwiegen und auf 1 l mit bidestilliertem Wasser auffüllen.

Herstellung Lösung B:

11,876 g Dinatriumhydrogenphosphat einwiegen und mit bidestilliertem auf 1 l Wasser auffüllen.

Herstellung Puffer (pH 8,0)

5,5 ml der Lösung A mit 95,5 ml der Lösung B mischen.

Herstellung Puffer (pH 6,1)

81,5 ml der Lösung A mit 18,5 ml der Lösung B mischen.

Stammlösung der Molkenproteine mit unterschiedlichen Glykosylierungsgraden:

Das Molkenproteinpulver der Firma Milei ist durch einen Proteingehalt von 60 % gekennzeichnet. Für die Herstellung von Stammlösungen mit einer Konzentration von 10 g/l an Protein deshalb etwa 1,667 g auf 0,1 mg genau einwiegen und auf 100 ml mit Phosphatpuffer (pH = 6,1) auffüllen. Erhaltene Ergebnisse auf den Proteingehalt beziehen. Die Stammlösungen im gefrorenen Zustand lagern.

Verdünnungsreihe der Molkenproteine mit unterschiedlichen Glykosylierungsgraden:

Die Verdünnung der Molkenproteinammlösungen erfolgt so, dass Endkonzentrationen von 0,1 g/l, 0,01 g/l, 0,001 g/l, 0,005 g/l, 0,5 g/l und 0,0001 g/l resultieren, wobei die entsprechenden Lösungen auf 100 ml mit Phosphatpuffer (pH = 6,1) auffüllen. Zur Berechnung der Konzentration die Proteinkonzentration zugrunde legen.

Verdünnungsreihe Natriumcaseinat mit Lactose modifiziert:

Die Verdünnung der Natriumcaseinatproben erfolgt auf gleiche Weise der Verdünnung der Molkenproteine. Allerdings bildet die Einwaagemenge die Berechnungsgrundlage. Der später ermittelte Proteingehalt der jeweiligen Stammlösungen separat bestimmen.

Verdünnungsreihe Lecithin:

Die Verdünnung des Lecithins erfolgt auf gleiche Weise der Verdünnung der Molkenproteine, wobei noch eine zusätzliche Verdünnungsstufe von 0,01 mg/l verwenden.

### 3.13.1 Erhitzungsversuch

5 ml der Molkenproteinlösungen 10 Minuten bei 80 °C im Wasserbad erhitzen und danach sofort mit Eiswasser kühlen.

### 3.13.2 Messung mit Wilhelmy Platte Pt 11

Bevor die Oberflächenspannung unbekannter Proben ermittelt wird, das Gerätes mit destilliertem Wasser überprüfen. Anschließend die Oberflächenspannung der verdünnten Lösungen sowohl der Natriumcaseinat-, als auch der Molkenproteinproben und Lecithin bestimmen.

*Messparameter zur Oberflächenspannungsbestimmung*

Generelle Messbedingungen:

Platte	Wilhelmy Platte Pt 11
Temperatur	25 °C
Eintauchtiefe	3,00 mm
Motorgeschwindigkeit (Oberflächendetektion)	1,00 mm / s
Oberflächendetektionsgrenzwert	1 mg
Anzahl Messpunkt pro Sekunde	1

Abbruch- und Evaluationsbedingungen:

Anzahl Messpunkt pro Sekunde	1
Mittelwert der letzten n Messungen	n = 100
Abbruch, wenn Standardabweichung manuell, nach 20 Minuten	< 0,03 mN / m wird deaktiviert

### 3.13.3 Bestimmung der kritischen Mizellbildungskonzentration (CMC)

Die Messung der Oberflächenspannung in Abhängigkeit der Proteinkonzentration erlaubt die Bestimmung der kritischen Mizellbildungskonzentration (CMC). Hierfür die Oberflächenspannung gegen die Konzentration des Proteins auftragen. Für die Bestimmung der CMC aus den Messpunkten der Konzentrationsreihe zwei lineare Bereiche ermitteln. Die CMC ergibt sich dabei aus dem Schnittpunkt der Geraden für den konzentrationsabhängigen Bereich und für den konzentrationsunabhängigen Bereich (Piispanen 2002, Figura 2004).

Die Bestimmung der kritischen Mizellbildungskonzentration CMC (siehe Abb. 2-6) rechnerisch über Geradenschnittformel ermitteln (aus dem Schnittpunkt der beiden linearen Ausgleichsgeraden).

## 3.14 Trübungsmessung (photometrisch)

Die Trübungsmessung nach der Vorschrift von [Pearce und Kinsella \(1978\)](#) durchführen.

### *Chemikalien und Lösungen*

Phosphatpuffer nach Sörensen (pH = 6,1)

siehe [3.13](#)

Phosphatpuffer nach Sörensen (pH = 7,4)

siehe [3.13](#).

Hier 18,2 ml der Lösung A mit 81,8 ml der Lösung B vermischen.

Phosphatpuffer nach Sörensen (pH = 5,5)

siehe [3.13](#).

Hier 96,1 ml der Lösung A mit 3,9 ml der Lösung B vermischen.

Natriumdodecylsulfat (SDS) 0,1 %

1 g SDS in einen 1 l Maßkolben einwiegen und mit bidestilliertem Wasser auffüllen.

Proteinlösungen

siehe [3.13](#)

### 3.14.1 Herstellen der Emulsion

Zur Herstellung der Emulsionen 15 ml der Proteinlösung (0,1 g/l) und 5 ml Maiskeimöl in ein 30 ml Becherglas geben. Mit dem Ultra-Turax eine Minute lang mit einer Drehzahl von 12000 rpm emulgieren.

### 3.14.2 Messung der Trübung

Aus den frisch hergestellten Emulsionen im Abstand von einer Minute (0-10 min) Aliquote von 50  $\mu$ l entnehmen und mit 2,5 ml einer 0,1 % SDS-Lösung verdünnen.

Die Absorption der verdünnten Emulsionen in einer 1 cm-Küvette (Einmalküvette) photometrisch bei einer Wellenlänge von 500 nm gegen Wasser bestimmen.

### 3.15 Mikroskopische Untersuchung (Lichtmikroskopie)

Die lichtmikroskopischen Messungen erfolgten am Institut für Biochemie der Technischen Universität Dresden.

#### *Chemikalien und Lösungen*

Anfärbung des Maiskeimöls mit Sudanschwarz:

0,16 g Sudanschwarz zu etwa 70 g Maiskeimöl geben und mithilfe eines Magnetrührgerätes darin lösen.

Natriumdodecylsulfat (SDS) 0,1 %

siehe 3.14

Molkenproteinlösung unterschiedlichen Glykosylierungsgrades:

Zur Herstellung der Lösung mit einer Proteinkonzentration von 5 g/l die unter 3.13 beschriebenen Stammlösungen im Verhältnis 1:1 mit Phosphatpuffer (pH = 6,1) verdünnen.

Natriumcaseinatlösung mit Lactose modifiziert:

Zur Herstellung der Lösung mit einer Proteinkonzentration von 5 g/l die unter 3.13 beschriebenen Stammlösungen entsprechend mit Phosphatpuffer (pH = 6,1) verdünnen.

#### *Durchführung der Lichtmikroskopie*

Zunächst eine Emulsion aus 10 ml der hergestellten Proteinlösung (5 g/l) und 1 ml gefärbten Maiskeimöl herstellen, wobei mit einem Ultra-Turax zwei Minuten lang bei einer Drehzahl von 12000 rpm homogenisieren. Sofort nach dem Emulgieren ein Aliquot der Emulsion entnehmen und mit 0,1 % SDS-Lösung im Verhältnis 1:100 verdünnen. Etwa 5  $\mu$ l dieser Lösung in eine Neubauerkammer zur mikroskopischen Untersuchung überführen.

Die (digitalen) Photographien der Präparate mithilfe geeigneter Bildbearbeitungssoftware manuell auswerten.

Mikroskop: Vergrößerung 1:400

## 3.16 Herstellung der Modellschmelzkäsezubereitung

Die Modell-Schmelzkäsezubereitung unter Zusatz von unterschiedlich glykosylierten Proteinen hergestellt. Hierfür das Protein mit gewünschten Glykosylierungsgrad einsetzen. Die Butter (nach NIZO-Verfahren hergestellt) sowie Blockkäse der Sorte Chester sind von der Hochland AG, die Schmelzsalze Trinatriumorthophosphat (N53-40) als auch das langkettige Polyphosphat (N16-63) von der Budenheim KG zur Verfügung gestellt worden. Die Zutaten (siehe Tab. 3-4) für einen 500 g-Ansatz miteinander vermischen und in einem Thermomix TM21 (Vorwerk) auf Stufe 1 für 1 min homogenisieren. Anschließend erfolgt eine indirekte Erhitzung auf Stufe 4 für 7 min. Die Temperatur je nach Fragestellung zwischen 80, 85, 90, 100 °C variieren. Abschließend heiß in 30 ml-Becher einfüllen und nach dem Erkalten mit Aluminiumfolie verschliessen. Lagerung bei 6 °C.

**Tab. 3-4:** Rezeptur zur Herstellung einer Modellschmelzkäsezubereitung; mit langkettigen Polyphosphat\* und Trinatriumorthophosphat\*\* als Schmelzsalze

Zutaten	Chester- käse	Wasser	Butter	Protein (Milei 60)	N16-63 *	Koch- salz	N53-40 **	Natrium- citrat
in [%]	40	31,1	13	12,8	1,6	0,7	0,4	0,4
500 g -Ansatz	200	155,5	65	64	8	3,5	2	2

## 3.17 Bestimmung des NPN-Wertes

Die Bestimmung des NPN-Wertes nach der Praktikumsvorschrift der Professur für Lebensmittelchemie an der Technischen Universität Dresden durchführen.

Zehn Blöcke von jeweils ca. 200 g Chester-Käse (siehe 3.16) je bei 6 °C und 20 °C für einen Zeitraum von 0-10 Wochen lagern und in einem Abstand von 7 Tagen jeweils eine Probe (ca. 10 g) zur Bestimmung des Nicht-Protein-Stickstoffs (NPN) entnehmen. Bei jeder Probennahme einen gesonderten Käseblock verwenden.

Trichloressigsäure 12 %

12 g Trichloressigsäure einwiegen und auf 100 ml mit dest. Wasser auffüllen.

Trichloressigsäure 48 %

48 g Trichloressigsäure einwiegen und auf 100 ml mit dest. Wasser auffüllen.

Katalysatormisch nach Wieninger, Natronlauge 10 %, Borsäure 2 %, Schwefelsäure 0,1 N, Mischindikator nach Tashiro siehe 3.3.

#### *Probenvorbereitung*

Je 2,0 g Probe (Chester-Käse) in 50 ml-Maßkolben einwiegen und unter Umschwenken mit je 7 ml Wasser sowie je 2 ml 48 %-ige Trichloressigsäure versetzen. Für den Blindwert 7,5 g Wasser mit 2 ml 48 %-ige Trichloressigsäure versetzen. Die Kolben verschließen und ca. 10 min zum Lösen der Probe ins Ultraschallbad stellen sowie anschließend 20 min bei 30-35 °C im Wasserbad temperieren. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur mit 12 %-ige Trichloressigsäure bis zur Marke auffüllen. Die Proben durch einen trockenen Filter filtrieren und je 25 ml in Kjeldahlkolben überführen.

#### 3.17.1 Durchführung der Bestimmung

Zu allen Kjeldahlkolben je eine Spatelspitze Katalysatormisch nach Wieninger und 15 ml Schwefelsäure zugeben. Der Aufschluss erfolgt im Aufschlussblock. Dieser ist beendet, wenn die Lösung klar erscheint. Nach dem Abkühlen der Kolben unter Zusatz von 15 ml Wasser mit seinem gesamten Inhalt zur automatischen Destillation an der Destillationapparatur Büchi B-324 einsetzen. Das Destillat in einer Borsäurelösung (2 %) auffangen und direkt im Anschluss mit 0,1 N Schwefelsäure gegen Tashiro-Indikator titrieren. Die Titration mittels Dosierautomat bis zum Farbumschlag von grün nach violett durchführen.

Auf gleiche Weise zur Bestimmung der Wiederfindung mit Ammoniumsulfat vorgehen, wobei den Feststoff direkt in den Aufschlusskolben einwiegen. Für den Blindwert analog verfahren, jedoch ohne Probeneinwaage.

#### *Destillationseinstellung*

Wasser	15 ml
Natronlauge	75 ml
Borsäure	50 ml

Delay	3 s
Destillationsdauer	4 min
Dampf	100 %
ASPIR	OFF

### 3.17.2 Berechnung des NPN-Wertes

Der Gehalt an Nicht-Protein-Stickstoff nach der Formel (3-1) berechnen:

$$N = \frac{(a - b) \cdot 1,4007 \cdot 2}{E} \text{mg / g} \quad (3-1)$$

mit

N	Stickstoffgehalt in [mg / g]
a	Verbrauch Maßlösung (0,1 N H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ) Hauptversuch in [ml]
b	Verbrauch Maßlösung (0,1 N H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ) Blindversuch in [ml]
1,4007	1 ml Maßlösung entspricht 1,4007 mg Stickstoff
2	Umrechnungsfaktor der verschiedenen Volumina
E	Einwaage in [g]

## 3.18 Texture Analyser (Festigkeitsmessung)

Die Messungen erfolgten am Institut für Lebensmittel- und Bioverfahrenstechnik der Technischen Universität Dresden.

Die Texture-Analyser ist speziell zur Untersuchung der Textur von Lebensmitteln entwickelt worden. Dabei wird ein Meßstempel mit einer bestimmten Geschwindigkeit auf oder in die zu testende Probe gepreßt. Die Messung beginnt mit der Berührung der Probenoberfläche unter einem definierten Kraftaufwand und endet mit dem Erreichen einer vorher festgesetzten Eindringtiefe. Im Ergebnis wird ein Kraft-Weg-Diagramm aufgenommen, welches die Festigkeit der Probe charakterisieren soll.

### *Probenvorbereitung*

Die Proben 24 Std vor der Messung auf 22 °C equilibrieren. Die Messung direkt aus den 30 ml-Bechern mit einem Stempel (Durchmesser von 6 mm) durchführen.

#### *Messparameter des Textur Analysers*

Gerät	Textur Analysers TA-XT2i, Stable Micro Systems, Surrey, UK
Test Art	Messung der Kraft in Druckrichtung
Meßstempel	Durchmesser 6 mm
Wegauflösung	Höhe
Meßdauer	bis Eindrigtiefe von 10 mm erreicht wird
Auslösewert	0,1 N bzw. 0,01 N
Bruchweg	4,00 mm
Kraft	0,98 N
Zeit	5 s
Geschwindigkeit	Vor 1 mm / s Test 1 mm / s Rück 2 mm / s
Einheiten	Kraft in [N], Weg in [mm]
Meßdatenreihe	pps: 25,00
Meßzelle	50-1 kg
Stopp Aufzeichnung	bei Ziel

### 3.19 Penetrometer (Festigkeitsmessung)

Die Messungen erfolgten am Institut für Lebensmittel- und Bioverfahrenstechnik der Technischen Universität Dresden.

Um die Druckfestigkeit des Lebensmittels pro Flächeneinheit bestimmen zu können, werden sogenannte Penetrometer eingesetzt. Diese bestehen in der Regel aus einem in einer vertikalen Führung beweglich gelagerten Stempel und einer Meßuhr bzw. Meßskala, die das Messen einer Wegstrecke erlaubt. Zur Messung wird der Stempel des Penetrometers in das jeweilige Lebensmittel eingedrückt und die dabei zurückgelegte Strecke mit der Mess-

vorrichtung aufgenommen.

Die Proben 24 Std vor der Messung auf 22 °C equilibrieren. Die Messung direkt aus den 30 ml-Bechern mit einem Konus durchführen.

#### *Messparameter des Penetrometers*

Gerät	Penetrometer PNR 10, Petrotest Instruments, Dahlewitz
Messung	Eindringtiefe in [mm]
Prüfkörper	Konus
Einstechdauer	5 s
Pause	0,2 s

## 3.20 Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)

Die Probenvorbereitung, Präparatabdruck und Bedampfen der Proben sowie die transmissionselektronenmikroskopische Analyse erfolgte durch die Fr. Dr. Schrader an der Bundesforschungsanstalt für Ernährung und Lebensmittel (BfEL), Institut für Chemie und Technologie der Milch, Standort Kiel.

### 3.20.1 Probenvorbereitung für die TEM

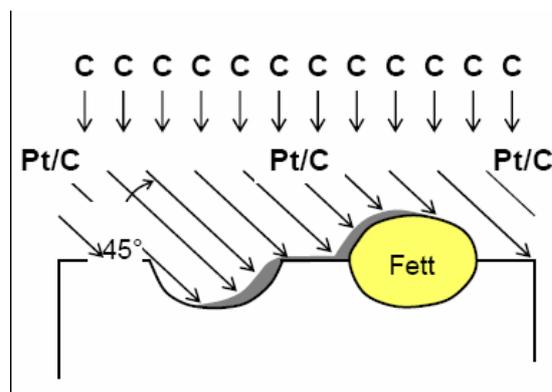
#### *Einfrieren der Proben*

Die Modellschmelzkäseproben in Glycerin einlegen, um die Bildung von Eiskristallen zu vermeiden. Nach einer Standzeit von 1 Std sehr dünne (0,1  $\mu\text{m}$ ) und im Vakuum beständige Präparate herstellen und diese auf ein Goldträgernetzchen (0,7  $\mu\text{m}$  dick, 3,05 mm Durchmesser, Gilder Netzchen, BAL-TEC, Witten) aufbringen sowie schließlich auf ein kupfernes Trägerplättchen (flache Oberfläche, 4,5 mm x 3 mm, 0,6 mm hoch, BAL-TEC, Witten) platzieren. Mit einem zweiten Trägerplättchen (mit Vertiefung, 4,5 mm x 3 mm, 0,6 mm hoch, BAL-TEC, Witten) dieses „Präparat-Sandwich“ oben abschließen, anschließend in den Probenhalter einsetzen und in das Jet-Gefriergerät (JFD 030, Balzers, Lichtenstein) überführen. Die Proben in Freon (R22) einfrieren (-180 °C) und bis zur Analyse in flüssigen Stickstoff

aufbewahren.

#### *Herstellung des Präparatabdrucks (Gefrierbruchtechnik)*

Jeweils drei der in flüssigen Stickstoff gelagerten Sandwich-Präparate in eine vorgekühlte Doppelabdruckeinrichtung (BAL-TEC, Witten) einführen. Die Abdruckeinrichtung mit den drei Proben in die Vakuumkammer einer Hochvakuum-Gefrierätzanlage (BA 360 M, Balzers, Lichtenstein) setzen und befestigen, die Kammer schließen und ein Hochvakuum aufbauen. Bei einer Temperatur von  $-120\text{ }^{\circ}\text{C}$  die Doppelabdruckeinrichtung aufreißen lassen, so dass die eingefrorenen Proben gebrochen werden (die Brechung der Probe erfolgte entlang innerer Oberflächen). In Abbildung 3-1 ist beispielhaft ein Überblick der erzeugten Strukturen durch die Gefrierbruchtechnik abgebildet.



**Abb. 3-1:** Bedampfung der Proben nach Gefrierbruch (Pt/C = Platin/Kohlenstoff; C = Kohlenstoff), aus [Borcherding \(2004\)](#)

#### *Bedampfen der Proben*

Im Vakuum Platin und Kohlenstoff (Winkel  $45^{\circ}$ ) verdampfen wobei sich auf dem Objekt eine dünne Schicht niederschlägt (Abb. 3-1). Zur Verstärkung mit Kohlenstoff (Winkel  $90^{\circ}$ ) beschatten. Nach dem Aufdampfen der Abdruckschicht die Vakuumanlage belüften die Kupferträger mit den Goldträgernetzchen und den bedampften Bruchstücken entnehmen, in destilliertes Wasser geben und somit die Abdruckschicht isolieren. Um weitere Objektreste von der Kohle-Platin-Schicht zu entfernen, den Abdruck 30 Minuten in Chlorbleichlauge, wieder in destilliertes Wasser, Aceton und nochmals in destilliertes Wasser geben sowie anschließend die Probe auf ein Kupfer-Netz legen und auf Papier trocknen.

### 3.20.2 Durchführung der TEM

Die mit Hilfe der Gefrierbruchtechnik hergestellten Präparate mit einem Transmissionselektronenmikroskop untersuchen.

#### *Messparameter des Transmissionselektronenmikroskops*

Bedampfung	Platin / Kohlenstoff
TEM-Gerät	FEI Company, Philips, Niederlande mit Gefrieranlage Jet-Gefriergerät JFD 030 und Hochvakuum-Gefrierätzanlage, BA 360 M, Balzers, Lichtenstein
Vergrößerung	1:11100 (Übersicht) 1:37500 (Detail)
Beschleunigungsspannung	80 kV
Bilderfassung	Planfilm (Kodak)

## 3.21 Rasterelektronenmikroskopie (REM)

### *Chemikalien und Lösungen*

Glutaraldehydlösung 2,5 %

25 %-ige Glutaraldehydlösung im Verhältnis 1:10 mit dest. Wasser verdünnen.

Ethanol 10-100 %

Ethanol mit dest. Wasser entsprechend verdünnen.

Chloroform

### *Probenvorbereitung*

Die Proben der Modellschmelzkäsezubereitung mit einer Rasierklinge dünn schneiden (ca. 1 cm x 1 cm x 0,1 cm) sowie anschließend in 2,5 %-iger Glutaraldehydlösung über Nacht bei 6 °C fixieren.

Anschließend die Proben für je 10 min in aufsteigender Ethanolreihe dehydrieren (in 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 % Ethanol). Nach der Dehydrierung Entfetten, wobei die Proben für je 30 min unter gelegentlichen umschütteln 3mal in Chlo-

roform legen. Abschließend erfolgt die Waschung in reinen Ethanol sowie die Gefriertrocknung der Proben. Die so vorbereiteten Proben schließlich auf einen Standard-Objektträger für Rasterelektronenmikroskope kleben.

### 3.21.1 Durchführung der REM

Die Rasterelektronenmikroskopische Analyse erfolgte durch die Fr. Dipl.Ing. Kern am Institut für Physikalische Chemie und Elektrochemie der Technischen Universität Dresden.

#### *Messparameter des Rasterelektronenmikroskops*

Bedampfung	Gold / Paladium mit AGAR Manual Sputter Coater B7340, Agar Scientific Ltd., Stansted, Essex, England
REM-Gerät	DSM 982 GEMINI mit thermischer Feldemissionskathode, Carl Zeiss, Oberkochen
Vergrößerung	1:2000, 1:5000, 1:10000
Beschleunigungsspannung	2 kV und 4 kV

## 3.22 Sensorische Untersuchungen

Das sensorische Prüfpanel bestand aus 16 bis 20 Mitarbeitern bzw. Diplomanden der Professur für Lebensmittelchemie an der Technischen Universität Dresden (5 männlich, 11 bis 15 weiblich; Alter 23-45). Eine Dreiecksprüfung (Triangel-Test) gemäß DIN ISO 4120, erweitert durch eine Hedonische Prüfung mit Entscheidungsbegründung durchführen.

Als Prüfproben dienten Modellschmelzkäsezubereitungen mit unterschiedlichen Glykosylierungsgraden des eingesetzten Molkenpulvers. Die Proben (zwei identische und eine abweichend) von ca. 5 g jeweils in einer verschlossenen Petrischale reichen.

Der Test fand im Sensorik-Labor der Professur für Lebensmittelchemie der Technischen Universität Dresden statt.

## 3.23 Bestimmung der Geruchsschwellenwerte

### Verwendete Aromastoffe

- 2,5-Dimethyl-4-hydroxy-3(2H)-furanone (= Furaneol)  
CAS: 3658-77-3; Summenformel:  $C_6H_8O_3$ ; molare Masse: 128,13 g/mol
- Butylmethylketon (= 2-Hexanon)  
CAS: 591-78-6; Summenformel:  $C_6H_{12}O$ ; molare Masse: 100,1 g/mol
- Butan-2,3-dion (= Diacetyl)  
CAS: 431-03-8; Summenformel:  $C_4H_6O_2$ ; molare Masse: 86,09 g/mol
- 5-Hydroxydecansäurelacton (=  $\delta$ -Decalacton)  
CAS: 705-86-2; Summenformel:  $C_{10}H_{18}O_2$ ; molare Masse: 170,25 g/mol
- Dimethyltrisulfid  
CAS: 3658-80-8; Summenformel:  $C_2H_6S_3$ ; molare Masse: 126,26 g/mol

Das sensorische Prüfpanel bestand aus 20 Studenten der Lebensmittelchemie der Technischen Universität Dresden. Die Schulung des Panels erfolgte durch wiederholtes Abriechnen der ausgewählten Aromastoffe und diente dem Kennenlernen und Erkennen der Geruchsdeskriptoren.

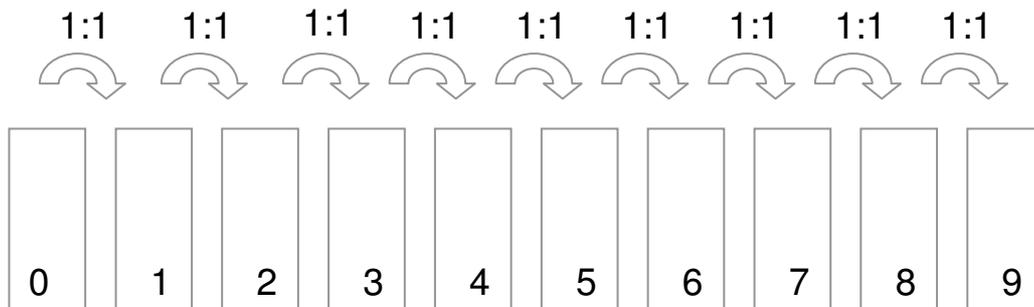
Es wurde die erweiterte Intensitätsprüfung nach DIN 10966 gewählt. Die von den Prüfern sensorisch wahrnehmbare Intensität der Aromastofflösung anhand einer Intensitätsskala (von 0 = nicht erkennbar bis 5 = dominierend; in Einer-Schritten) ausdrücken.

### 3.23.1 Geruchsschwellenwerte in Wasser

Nach Herstellen einer Stammlösung der jeweiligen Aromastoffe in dest. Wasser diese wie in der Abb. 3-2 dargestellt verdünnen.

Der Literaturgeruchsschwellenwert (eingerahmte Konzentration in der Tab. 3-5) sollte dabei in der hergestellten Verdünnungsreihe liegen.

Die Aromastofflösung vor dem Test 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubieren und in durchsichtigen, mit dreistelligen Zufallszahlen beschrifteten Plastikbechern (100 ml) reichen.



**Abb. 3-2:** Verdünnungsschema der Aromastoffe für die Bestimmung der Geruchsschwellenwerte

**Tab. 3-5:** Konzentrationen in [ppm] der Aromastoffe in destilliertem Wasser zur Bestimmung der Geruchsschwellenwerte

Aromastoff	Konzentration [ppm] in dest. Wasser									
Furaneol	0	0,015	0,03	0,06	0,125	0,25	0,5	1	2	4
Diacetyl	0	4,25	8,5	17	34	68	136	272	544	1088
2-Hexanon	0	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64
$\delta$ -Decalacton	0	0,05	0,1	0,2	0,4	0,8	1,6	3,2	6,4	12,8
Dimethyltrisulfid	0	0,01	0,02	0,04	0,08	0,16	0,32	0,64	1,28	2,56

### 3.23.2 Geruchsschwellenwerte in Molkenproteinlösungen

Nach Herstellen einer Stammlösung der jeweiligen Aromastoffe in 2 %-igen Lösungen unterschiedlich modifizierter Molkenproteine (4,6 %  $Lys_{mod}$  bzw. 16,7 %  $Lys_{mod}$ ) diese bis zum Erreichen der gewünschten Aromastoffkonzentration verdünnen. Verdünnungsschema analog Abb. 3-2

Die Aromastofflösung vor dem Test 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubieren und in durchsichtigen, mit dreistelligen Zufallszahlen beschrifteten Plastikbechern (100 ml) reichen.

**Tab. 3-6:** Konzentrationen in [ppm] der Aromastoffe in 2 %-iger Proteinlösung zur Bestimmung der Geruchsschwellenwerte

Aromastoff	Konzentration [ppm] in 2 %-iger Proteinlösung									
Furaneol	0	0,06	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16
Diacetyl	0	4,25	8,5	17	34	68	136	272	544	1088
2-Hexanon	0	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64
$\delta$ -Decalacton	0	0,05	0,1	0,2	0,4	0,8	1,6	3,2	6,4	12,8
Dimethyltrisulfid	0	0,01	0,02	0,04	0,08	0,16	0,32	0,64	1,28	2,56



## 4 Auswertung und Diskussion der Ergebnisse

Das Ziel der Arbeit war es, Molkenproteine in einem technologisch relevanten Produkt nichtenzymatisch zu glykosylieren. Anschließend sollte sowohl die Beschreibung des Denaturierungsverhaltens als auch der emulgierenden Eigenschaften von diesen Proteinen erfolgen. Ein maßgeblicher Betrachtungspunkt war dabei die Abhängigkeit der Ergebnisse hinsichtlich der unterschiedlichen Glykosylierungsgrade der Molkenproteine. Ein weiteres Ziel war die Untersuchung der Auswirkungen der nichtenzymatischen Glykosylierung in einer Modellschmelzkäsezubereitung hinsichtlich der Sensorik, Mikrostruktur und Festigkeit. Zusätzlich sollte die Erfassung der geänderten Geruchsschwellenwerte in unterschiedlich modifizierten Molkenproteinlösungen ermittelt werden.

### 4.1 Nichtenzymatische Glykosylierung

Durch die frühe Maillard-Reaktion kommt es zur kovalenten Bindung reduzierender Zucker an Lysinseitenketten. Mit Zunahme der Reaktionszeit erhöht sich das Ausmaß der Glykosylierung. Die Modifizierung mit Lactose findet vor allem an exponierten oder zumindest in oberflächennahen Bereichen statt. Hydrophobe, in der Tertiärstruktur des Moleküls vergrabene Regionen werden daher unwesentlich beeinflusst.

Die Bestimmung von Furosins ist eine geeignete sowie oft angewendete Methode zur Beurteilung der Wärmebehandlung und damit des nutritiven Wertes von Lebensmitteln, hauptsächlich Milchprodukten. Zudem erlaubt die Furosins-Methode Rückschlüsse auf in vivo stattfindende Glykosylierungsreaktionen. Für die Quantifizierung der blockierten Lysinseitenketten wurde Furosins, welches während der Säurehydrolyse aus den Amadoriprodukten des Lysins – N- $\epsilon$ -Lactulosyllysin bzw. N- $\epsilon$ -Fructosyllysin – gebildet wird, mittels Aminosäureanalyse bestimmt. Beruhend auf dieser Methode kann der relative Anteil des modifizierten Lysins (d. h. Glykosylierungsgrad) berechnet werden.

Um in späteren Inkubationsexperimenten Proteinpräparate mit relevanten Glykosylierungsgraden herstellen zu können, wurde zunächst das Ausmaß der frühen Maillard-Reaktion

**Tab. 4-1:** Grad der Lysinmodifizierung [%] ( $Lys_{mod}$ ) in kommerziell erhältlichen Molkenproteinpräparaten mit Angabe der Standardabweichung; bestimmt mit der Furososin-Methode

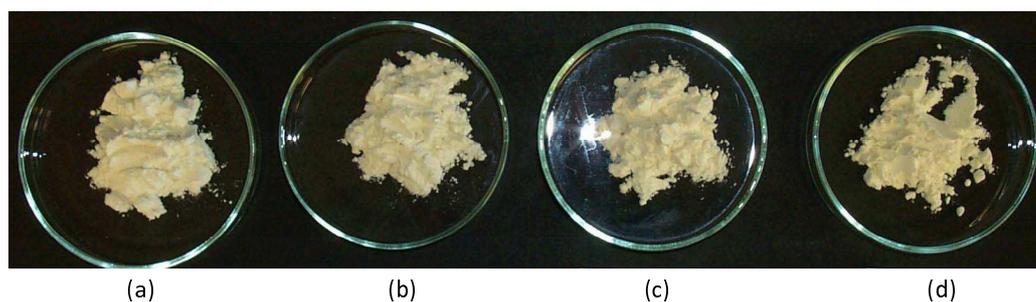
Probe	1	2	3	4	5	6	7	8	9
$Lys_{mod}$ [%]	2,2	4,0	7,6	9,0	10,8	12,5	14,0	14,6	19,5
	$\pm 0,1$	$\pm 0,3$	$\pm 0,2$	$\pm 0,4$	$\pm 0,6$	$\pm 0,4$	$\pm 0,7$	$\pm 1,0$	$\pm 1,5$

in einigen kommerziell erhältlichen Molkenproteinpräparaten unterschiedlicher Firmen bestimmt. Wie aus der Tab. 4-1 ersichtlich streuen die Glykosylierungsgrade der untersuchten Proben zwischen 2,2 % und 19,5 % für vergleichbare Produkte.

Auf Grundlage dieser Bestandsaufnahme sollten gezielt vergleichbare Glykosylierungsgrade für ein ausgewähltes Molkenproteinprodukt erreicht werden. In Analogie zu [Nacka et al. \(1998\)](#) und [Morgan et al. \(1999b\)](#) wurden sehr milde Bedingungen für die Maillard-Reaktion gewählt (trockene Erhitzung bei 60 °C) sowie die Erhitzungszeiten so variiert, dass gewünschte Modifizierungen erreicht werden konnten. Hierbei sollten vor allem niedrige Glykosylierungsgrade adäquat zu technologisch relevanten Proben (siehe Tab. 4-1) simuliert werden. Bei diesen Bedingungen läuft die „frühe“ Maillard-Reaktion ab und demnach hauptsächlich eine Kondensation von Lactose mit dem jeweiligen Protein. Es wurde ein kommerziell erhältliches Molkenpulver mit 60 % Protein, 25 % Lactose und 5 % Fett verwendet, um Praxisrelevanz zu gewährleisten. Nach Lactosylierung ergaben sich die in der Tab. 4-2 dargestellten Lysinmodifizierungen, die größtenteils – vor allem im Bereich zwischen 4,6 % und 22,4 % – mit den ausgewerteten Handelsproben übereinstimmen. Wie erwartet steigt die Lysinmodifizierung und damit die durchschnittliche Anzahl der blockierten Lysinreste mit der Erhitzungszeit. Die bestimmte Modifizierung von 4,6 % in der nicht-behandelten Probe (Erhitzungszeit = 0) weist auf eine mögliche Glykosylierung des  $\beta$ -

**Tab. 4-2:** Grad der Lysinmodifizierung [%] ( $Lys_{mod}$ ) des Molkenproteinpräparates in Abhängigkeit von der Erhitzungszeit [h] bei 60 °C (mit Standardabweichung); bestimmt mit der Furososin-Methode

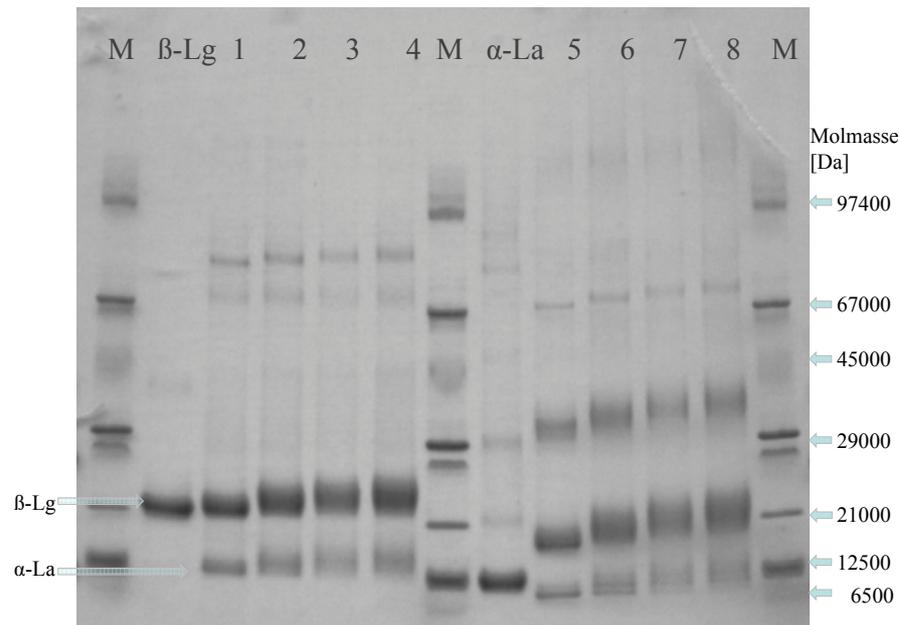
Erhitzungszeit [h]	0	6	12	18	24	60	96
$Lys_{mod}$ [%]	4,6	10,2	11,5	13,0	16,7	22,4	26,2
	$\pm 0,1$	$\pm 0,1$	$\pm 0,2$	$\pm 0,1$	$\pm 0,4$	$\pm 0,3$	$\pm 0,6$
mod. Lysinreste pro $\beta$ -Lg-Monomer	0,7	1,5	1,7	2,0	2,5	3,4	3,9



**Abb. 4-1:** Darstellung der unterschiedlich glykosylierten Molkenpulver; unerhitzt (a) bzw. erhitzt bei 60 °C für (b) 24, (c) 60 und (d) 96 Stunden

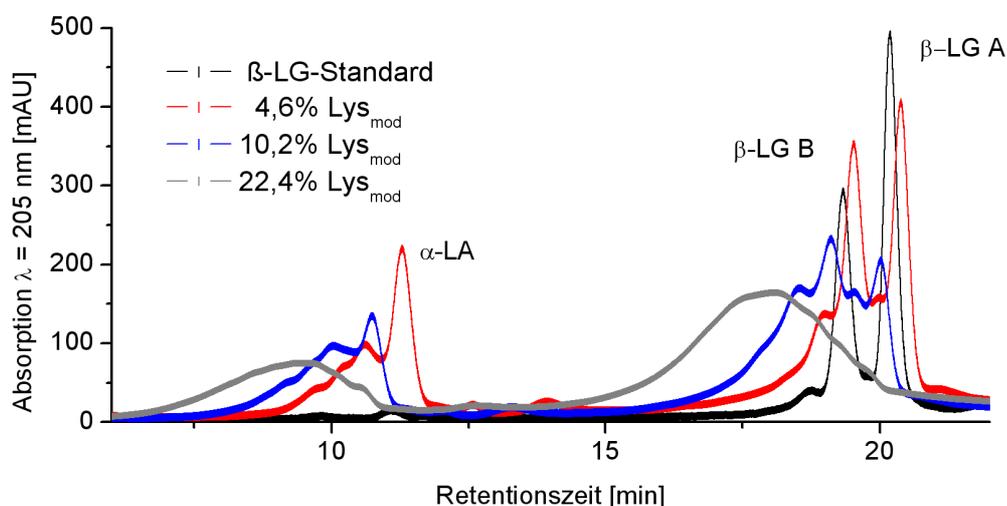
Lactoglobulins hin, welche bereits während der Herstellung und Lagerung des Molkenpulvers erfolgt. Dieser Effekt ist in der Literatur häufig beschrieben (Morgan et al. 1999b, Darewicz und Dziuba 2001). Die Farbe der Molkenpulver veränderte sich im Laufe der Glykosylierungsreaktion sehr geringfügig, was auf eine nur minimale Bräunungsreaktion zurückzuführen ist (siehe Abb. 4-1).

Die weitere analytische Charakterisierung der Molkenpulver erfolgte mittels Gelpermeationschromatographie (GPC), Elektrophorese (SDS-PAGE) sowie RP-HPLC. Die gewählten Bedingungen (trockene Erhitzung, 60 °C) führen zu keinen Oligomerisierungs- und Quervernetzungsreaktionen, sondern ausschließlich zu einer Lysinmodifizierung im Laufe der „frühen“ Maillard-Reaktion. Wie aus der SDS-PAGE ersichtlich (Abb. 4-2) sind keine Banden für quervernetzte Proteine mit steigender Glykosylierung im Gel sichtbar. Das Monomer-Oligomer-Verhältnis bleibt bei allen Proben nahezu konstant, was darauf hindeutet, dass mit der Glykosylierung keine Oligomerisierungsreaktionen einhergehen. Dieses Ergebnis konnte durch GPC-Messungen untermauert werden. Die während der Glykosylierung stattfindenden Änderungen in der molekularen Masse von  $\beta$ -Lg und  $\alpha$ -La-Derivaten in Molkenpulver wurden mittels SDS-PAGE abgeschätzt (Abb. 4-2). Die Verschiebung der Molmassen zu kürzeren Wanderungstrecken liegt in der Lactosylierung begründet und steigt mit der fortschreitenden Maillard-Reaktion. Der Grund liegt in der Erhöhung der molekularen Masse des  $\beta$ -Lg und  $\alpha$ -La mit jedem Molekül an kovalent gebundener Lactose. Die niedrigere elektrophoretische Mobilität und damit kürzere Wanderungstrecken für lactosyliertes  $\beta$ -Lactoglobulin (durchschnittlich 7,7 Lactosemoleküle pro  $\beta$ -Lg-Monomer) wurde ebenfalls von Morgan et al. (1999a) beschrieben. Diese Arbeitsgruppe erklärt es durch die erhöhte Molekülmasse der Proben.



**Abb. 4-2:** SDS-PAGE der lactosylierten Molkenproteinpräparate. M: Molgrößenmarker;  $\beta$ -Lg und  $\alpha$ -La unter reduzierenden Bedingungen; von links nach rechts Molkenpräparate mit steigender Lysinmodifizierung (4,6 %; 16,7 %; 22,4 %; 26,2 %) 1-4: reduzierende Bedingungen, 5-8: nicht-reduzierende Bedingungen

Zur qualitativen und quantitativen Charakterisierung der Proteine wurde die RP-HPLC benutzt. Die unterschiedlich glykosylierten Molkenproteinproben wurden gelöst und anschließend auf pH 4,6 angesäuert und zentrifugiert. Mittels analytischer RP-HPLC mit UV-Detektion konnte eine sehr gute Trennung der unterschiedlich glykosylierten Molkenproteine sowie des  $\alpha$ -La und der beiden genetischen Varianten von  $\beta$ -Lg erreicht werden (siehe Abb. 4-3). In der Probe mit 4,6 %  $Lys_{mod}$  ist bei der Retentionszeit zwischen 18 und 21 min die beiden genetischen Varianten A und B des  $\beta$ -Lactoglobulins sichtbar. Der beobachtete doppelte Elutionspeak des  $\beta$ -Lactoglobulins „verschwindet“ mit fortschreitender Lysinmodifizierung. Weiterhin sind deutliche Unterschiede im Chromatogramm zwischen den Molkenpulvern mit variierender Lysinmodifizierung zu erkennen. Mit steigender Glykosylierung zeigt sich jedoch eine immer stärkere Überschneidung der beiden Varianten des  $\beta$ -Lactoglobulins. Darüber hinaus wird eine allgemeine Peakverbreiterung beobachtet. Diese beiden Phänomene erklären sich durch die Häufigkeitsverteilung der beiden genetischen Varianten von  $\beta$ -Lg und deren bevorzugter Glykosylierung. Fenaille et al. (2004) ermittelten mittels massenspektrometrischer Methoden die favorisierte Reihenfolge der Anbindung von Zuckern an Lysinreste. Das  $Lys^{47}$  und  $Lys^{91}$  werden begünstigt und spezifisch



**Abb. 4-3:** HPLC-Chromatogramm der bei pH 4,6 löslichen Molkenproteine mit unterschiedlichen Glykosylierungsgraden [ $Lys_{mod}$ ] im Vergleich zum  $\beta$ -Lg-Standard

glykosyliert, da sie sich an der Moleküloberfläche befinden und dadurch sehr gute Zugänglichkeit für relevante Reaktionspartner bieten (siehe Abb. 4-11). Im weiteren Verlauf werden unspezifisch alle folgenden Lysinreste sowie die N-terminale Aminogruppe und  $Arg^{124}$  involviert. Morgan et al. (1999b) bestimmten die Reaktivität von verschiedenen Molekülbereichen des  $\beta$ -Lgs betreffend der Lactosylierung. Nach verschiedenen Erhitzungszeiten (2 - 12 Stunden) wurde  $\beta$ -Lg tryptisch verdaut und die erhaltenen Peptide massenspektrometrisch untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass unter den gewählten Bedingungen mit Fortschreiten der Glykosylierungsreaktion fast alle  $\epsilon$ -Aminogruppen, außer  $Lys^{101}$ , der Lactosylierung unterliegen.  $Lys^{101}$  befindet sich zentral im Protein und darüber hinaus in der Nähe der intramolekularen Disulfidbrücke ( $Cys^{106} - Cys^{119}$ ). Es ist daher aufgrund sterischer Hinderung nur schwer für Reaktionen zugänglich. Die bevorzugte Glykosylierung an den Lysinseitenketten  $Lys^{47}$  und  $Lys^{91}$  konnte ebenfalls durch diese Arbeitsgruppe bestätigt werden. Somit kommt es mit Fortschreiten der frühen Maillard-Reaktion zur Abnahme der Spezifität der reagierenden Lysinreste und infolgedessen zur Erhöhung der Anzahl der verschiedenen Varianten. Der Gesamtpeak des  $\beta$ -Lactoglobulins passt sich mit fortschreitender Glykosylierung der Gaußschen Form an, die Proteinmenge bleibt jedoch konstant. Zusätzlich kommt es zu einer zunehmenden Hydrophilisierung der Molkenproteine mit steigender Glykosylierungsreaktion. Dieser Sachverhalt wird anhand der deutlichen Verschiebung zu kürzeren Retentionszeiten sichtbar (Abb. 4-3). Durch die kovalente Anbindung

der polaren Lactose an die Oberfläche des Proteins können hydrophobe Gruppen abgeschirmt werden und nicht mehr mit dem Säulenmaterial wechselwirken. Somit kommt es zur Verschiebung der getrennten Proteine in hydrophile Bereiche und gleichzeitig zu einer vorzeitigen Elution. Der Trend der verkürzten Retentionszeiten wird ebenfalls beim  $\alpha$ -Lactalbumin (Retentionszeit 10-12 min) beobachtet. Hier kommt es mit steigender Lysinblockierung ebenfalls zur einer Hydrophilisierung. Unter den gewählten Bedingungen ( $60^{\circ}\text{C}$ ) reagieren neben dem  $\beta$ -Lactoglobulin dementsprechend auch das  $\alpha$ -Lactalbumin mit Lactose.

Durch die Ankopplung der Lactose während der frühen Maillard-Reaktion werden durchschnittlich zwischen 0,7 und 3,9 Lysinreste pro  $\beta$ -Lg-Monomer (siehe Tab. 4-2) bzw. zwischen 0,5 und 3,1 pro  $\alpha$ -La-Monomer glykosyliert. Hierbei wird nochmals deutlich, dass die Glykosylierungsreaktion nicht auf ein Protein bezogen werden kann und die dargestellten  $\text{Lys}_{mod}$  eine Abschätzung für beiden Molkenproteine darstellen. Somit ist die Ankopplung der Lactose an das  $\beta$ -Lg als auch  $\alpha$ -La in verkürzten Retentionszeiten beider Proteine sichtbar.

## 4.2 Auswirkung der nichtenzymatischen Glykosylierung auf das Denaturierungsverhalten von Molkenproteinen

Eines der Ziele dieser Arbeit war die Beschreibung des Denaturierungsverhaltens von nichtenzymatisch glykosylierten Molkenproteinen. Hierbei sollte geklärt werden, ob und in welchem Maße eine Lysinmodifizierung die Denaturierungsreaktion beeinflusst. Aus der Literatur ist bekannt, dass durch die hohe Modifizierung des Lysins mit Glucose ( $\text{Lys}_{mod} = 82\%$ ) die Denaturierungstemperatur des Proteins um  $5^{\circ}\text{C}$  erhöht wird (van Teeffelen et al. 2005). Allerdings gibt es keine Daten über das Denaturierungsverhalten niedrig modifizierter sowie kommerziell erhältlicher Molkenproteinepräparate.

Um das Denaturierungsverhalten von Proteinen untersuchen und vergleichen zu können, ist es nötig, den denaturierten Zustand zu charakterisieren und zu definieren. In dieser Arbeit wurden folgende Methoden verwendet: die Bestimmung der Löslichkeit bei einem pH-Wert von 4,6 mittels RP-HPLC, die Elektrophorese zur Charakterisierung des Oligomerisierungszustandes und der Proteinvernetzung, die dynamische Differenzkalorimetrie zur

Bestimmung der Denaturierungstemperatur von Proteinen sowie die Fluoreszenzanalytik zur Untersuchung der Fluoreszenzintensität im Zuge der Auffaltung während des Denaturierungsprozesses.

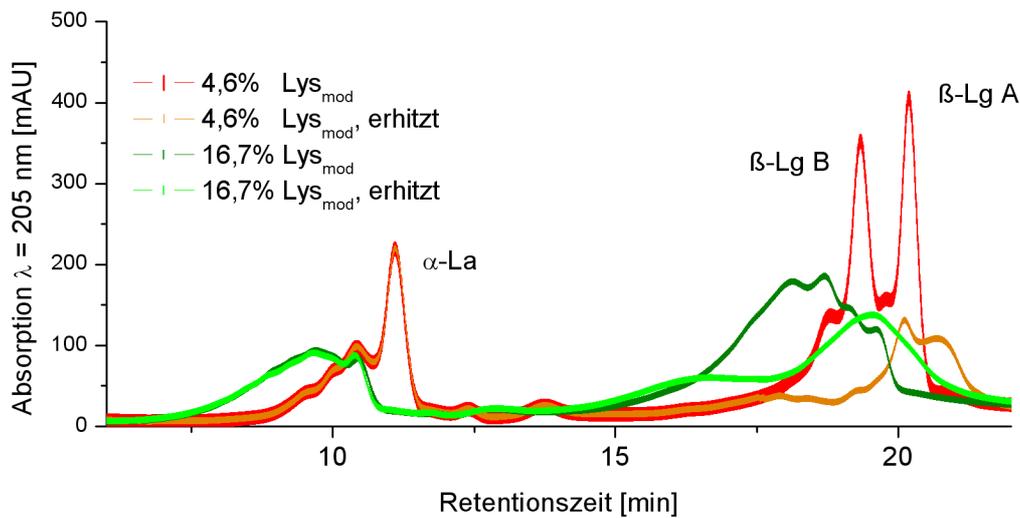
Das Hauptaugenmerk war die Abhängigkeit des Denaturierungsverhaltens vom Glykosylierungsgrad des  $\beta$ -Lactoglobulins. Die Untersuchungen wurden einerseits ohne vorherige Dialyse und andererseits nach Dialyse durchgeführt, um den Effekt der freien Lactose zu eliminieren. Um die Kältedenaturierung zu verhindern, wurde auf die Gefriertrocknung verzichtet, da es bei Temperaturen um  $-20^{\circ}\text{C}$  zu irreversiblen Konformationsänderungen des Proteins kommen kann (de Jongh et al. 2001).

#### 4.2.1 Charakterisierung mittels RP-HPLC

Aus der Denaturierung resultiert eine Veränderung der Sekundär- und Tertiärstruktur und deshalb auch ein Verlust der biologischen Aktivität, sowie eine Abnahme der Löslichkeit. Letzteres macht sich oft als „Ausflocken“ oder „Gerinnung“ bemerkbar. Die Untersuchung mit Hilfe der RP-HPLC berücksichtigt vor allem die Veränderungen im Löslichkeitsverhalten der Proteine nach Erhitzung. Eigenschaften, welche die Hydrophobizität des Proteins betreffen, werden sichtbar gemacht, und es können Rückschlüsse auf die Oberflächenbeschaffenheit getroffen werden.

Während der Erhitzung von Molkenproteinlösungen über  $70^{\circ}\text{C}$  kommt es zu Konformationsänderungen des  $\beta$ -Lactoglobulins, welche mit einer partiellen Entfaltung der Struktur und Exposition von Gruppen aus dem Molekülinneren verbunden sind. Dem teilweise reversiblen Schritt kann eine irreversible Aggregation folgen (Verheul et al. 1998). Während der Auffaltungsreaktion gelangen unpolare Aminosäuren an die Oberfläche und hydrophobisieren das gesamte Protein. Die Wechselwirkungen mit dem unpolaren Säulenmaterial der RP-HPLC nehmen zu. Folglich kommt es zur Verlängerung der Retentionszeit des erhitzten  $\beta$ -Lg im Vergleich zur nativen Form. Dieser Effekt wird anhand der Abb. 4-4 deutlich. Hier ist die Absorption der nicht erhitzten und erhitzten (10 min,  $80^{\circ}\text{C}$ ) Proben der bei pH 4,6 löslichen Molkenproteine als Funktion der Retentionszeit dargestellt.

Bei der Auswahl der Methode wurde die Löslichkeit bei pH 4,6 beurteilt, welche als Unterscheidungskriterium zwischen nativen und denaturierten Molkenproteinen dient. Die Messung des bei pH 4,6 löslichen  $\beta$ -Lg mittels RP-HPLC ist äquivalent zur der IDF-Standard-Methode 178 (IDF-Standard 1996, Renterghem und Block 1996, Block et al. 1998,

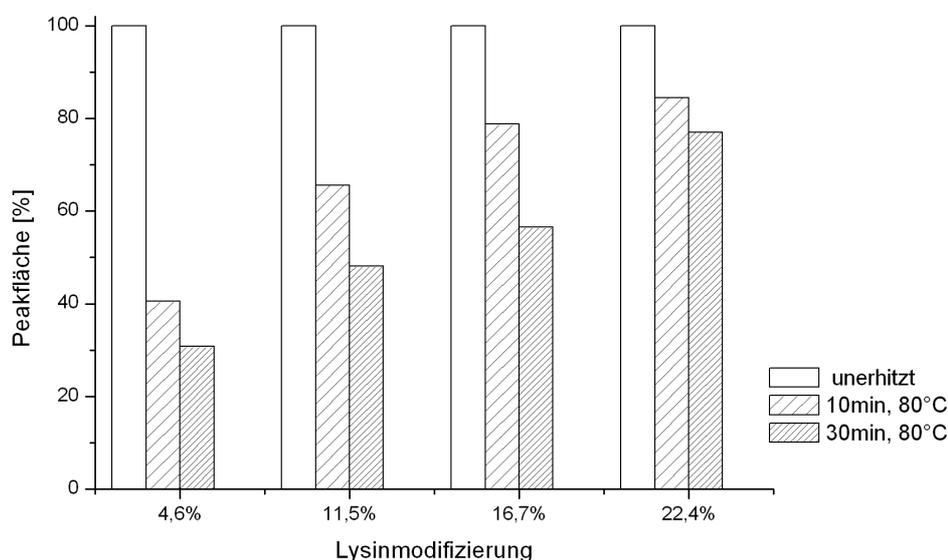


**Abb. 4-4:** HPLC-Chromatogramm der bei pH 4,6 löslichen Molkenproteine mit zwei unterschiedlichen Glykosylierungsgraden [ $\text{Lys}_{\text{mod}}$ ] vor und nach Erhitzung (10 min, 80 °C)

Clawin-Rädecker et al. 2000b, Morales et al. 2000). Hier ist das Löslichkeitsverhalten bei pH 4,6 der Trennungparameter und nicht der Denaturierungsgrad. Die Abnahme der Löslichkeit des  $\beta\text{-Lg}$ s bei pH 4,6 kann bereits nach Erhitzung der Proben optisch abgeschätzt werden. Nach einer starken Erwärmung bei 80 °C für 20 Minuten kann deutlich mehr Trübung als nach einer leichten Erwärmung (70 °C, 10 Minuten) festgestellt werden. Mit Zunahme der Lysinblockierung ist die Trübung der Lösungen einer Probenreihe stets verringert. Niedrig glykosylierte Molkenproteine bilden vermehrt große Aggregate. Gegenätzlich dazu zeigen hoch glykosylierte Proben unter gleichen Bedingungen eine feine Trübung ohne Aggregate. Beim Ansäuern der Lösungen wird dieser Trend noch deutlicher. Nach einer Erwärmung bei niedriger Temperatur für eine relativ kurze Zeit (75 °C, 10 min) ist keine Trübung der Molkenproteinproben erkennbar. Die Senkung des pH-Wertes bewirkt wiederum eine Zunahme der Trübung, die bei niedriger Glykosylierung größer ist als im Vergleich zu hohen Glykosylierungsgraden. Dementsprechend nimmt die Löslichkeit (Gesamtpeakfläche) der Molkenproteine mit steigender Lysinblockierung zu. Die Ergebnisse der RP-HPLC bestätigen diese Beobachtung. Wie erwartet, ist das Ausmaß der Denaturierung direkt proportional zur Intensität der Hitzebehandlung. Nach einer Hitzebehandlung bei 80 °C für 10 min kommt es zur einer graduellen Abnahme des  $\beta\text{-Lg}$ -Doppelpeaks. In Übereinstimmung mit Literaturdaten konnte für die genetischen Varianten des  $\beta\text{-Lactoglobulins}$  unterschiedliches Denaturierungsverhalten beobachtet werden. Während Manderson et al. (1998)

und Bikker et al. (2000) ein größere Hitzestabilität der Variante A ermittelten, stellten Anema et al. (1996) in Übereinstimmung mit Dannenberg und Kessler (1988a) den umgekehrten Effekt fest. Hierbei zeigte sich, dass die Konzentration der Variante B verglichen mit Variante A unabhängig von der Erhitzungstemperatur weniger stark abnimmt.

Die Molkenproteine mit verschiedener Lysinmodifizierung zeigen unterschiedliches Denaturierungsverhalten und damit veränderte Hitzeabhängigkeit. Die quantitative Bestimmung des bei pH 4,6 löslichen Überstandes zeigt eindeutig eine Abnahme des nativen  $\beta$ -Lg in Abhängigkeit von der Erhitzungszeit (siehe Abb. 4-5). Der Peak der säurelöslichen Molkenproteine nimmt mit der Erhitzung ab, jedoch ist die Abnahme für niedrig lactosylierte Proben höher und nimmt mit dem Glykosylierungsgrad ab. Dieses Verhalten deutet auf eine „Schutzwirkung“ der Lactose gegen die Denaturierungsreaktion hin. Die Probe mit 22,4 %  $Lys_{mod}$  hat die höchste Menge an säurelöslichem  $\beta$ -Lg in Vergleich zu niedrig glykosyliertem Protein. Dementsprechend wird eine signifikant geringere Abnahme der Fläche mit steigendem Glykosylierungsgrad ermittelt. Nach 30 minütiger Erhitzung bei 80 °C wird bei 4,6 %  $Lys_{mod}$  eine Verringerung des nativen  $\beta$ -Lactoglobulins um 70 % detektiert. Unter gleichen Bedingungen ist die lösliche Proteinmenge bei 22,4 %  $Lys_{mod}$  nur um ca. 22 % reduziert. Demzufolge ist die Abnahme der Peakfläche bei höher glykosylierten Proben



**Abb. 4-5:** Abhängigkeit der Löslichkeit bei pH 4,6 (definiert als Gesamtpeakfläche) für unterschiedlich glykosylierte Molkenproteine von der Erhitzungszeit für  $\beta$ -Lg

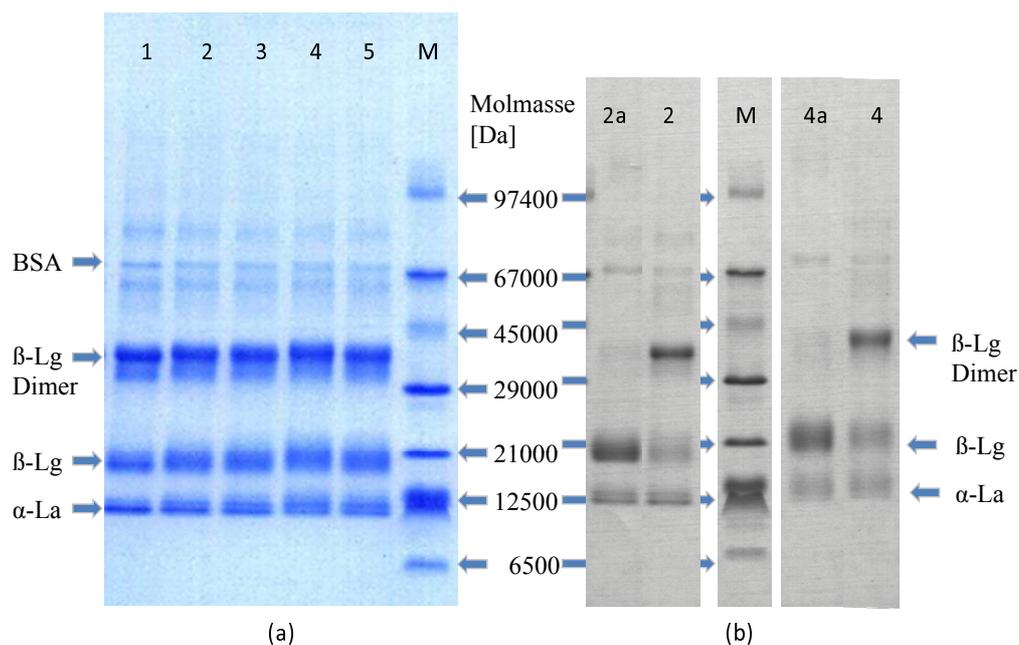
geringer als bei niedrigem Glykosylierungsgrad, wodurch mit steigender Glykosylierung mehr lösliches  $\beta$ -Lg in der Lösung bleibt. Daraus kann abgeleitet werden, dass die Denaturierungsreaktion bei glykosyliertem  $\beta$ -Lactoglobulin verzögert ist. Während der Maillard-Reaktion kommt es zur Bindung der Lactose an das Protein, welches zu erhöhter Polarität des Moleküls führt. Die Menge an gebundenem Zucker steigt mit Fortschreiten der Reaktion und verbessert so die Löslichkeit bei pH 4,6 für die Proben mit höherer Lysinmodifizierung. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Denaturierungsreaktion des  $\beta$ -Lactoglobulins in kommerziellem Molkenpulver stark von der Glykosylierung abhängt. Mit steigender Lysinmodifizierung kommt es zur Verlangsamung dieser Reaktion. Bouhallab et al. (1999) berichten über Lactose- $\beta$ -Lg-Konjugate mit verbesserter Löslichkeit bei pH 4,6 im Vergleich zu unmodifiziertem Protein. Hier steigt der lösliche Anteil nach einer Erhitzung bei 80 °C für 10 min mit der Erhöhung des molaren Verhältnisses des Protein zu Lactose, was mittels GPC beobachtet wurde.

Auffällig ist weiterhin, dass Konzentration und Retentionszeit von  $\alpha$ -Lactalbumin (Retentionszeit ca. 10-12 min) unter den gewählten Bedingungen (10 min, 80 °C) im Gegensatz zu  $\beta$ -Lactoglobulin kaum verändert sind. Sowohl bei den Studien von Dannenberg und Kessler (1988a) als auch von Anema et al. (1996) wurden Geschwindigkeitskonstanten der Denaturierung für  $\alpha$ -La im betrachteten Temperaturbereich ermittelt, welche deutlich unter den Werten für  $\beta$ -Lg liegen. Damit verläuft die Denaturierungsreaktion des  $\alpha$ -La langsamer. Analytisch ist die partielle Entfaltung dieses Proteins nur schwer fassbar, da die Struktur durch die Bindung von Calciumionen stabilisiert wird und die Löslichkeit nicht entscheidend verringert ist. Weiterhin erfolgt keine Änderung der Oberflächenhydrophobizität nach Erhitzung, wodurch es zur keiner Verschiebung der Retentionszeiten im Chromatogramm kommt. Das Löslichkeitsverhalten des  $\alpha$ -Lactalbumins wurde in einem separaten Produkt (Arlafoods Pulver: 98 %  $\alpha$ -La) nach einer Erhitzung bei 80 °C und 90 °C für je 60 Minuten mittels RP-HPLC beobachtet. Mit steigender Temperatur und Zeit erfolgt ebenfalls ein Abfall des löslichen Proteinanteils jedoch nicht mit vergleichbarer Geschwindigkeit wie beim  $\beta$ -Lg. Eine Reduktion des nativen  $\alpha$ -La um 70 % bei 4,6 %  $Lys_{mod}$  konnte erst nach 60 minütiger Behandlung bei 90 °C erreicht werden. Damit wurden die niedrigen Geschwindigkeitskonstanten für die Denaturierungsreaktion des  $\alpha$ -La, welche durch Dannenberg und Kessler (1988a) sowie Anema et al. (1996) beobachtet wurden, bestätigt. Weiterhin zeigte sich für dieses Molkenprotein keine signifikante Abhängigkeit der Löslichkeit von der Lysinblockierung.

### 4.2.2 Charakterisierung mittels Elektrophorese

Die RP-HPLC Methode nach IDF-Standard beruht hauptsächlich auf Löslichkeitsunterschieden der Molkenproteine bei pH 4,6, während bei der Elektrophorese der Prozess der Oligomerisierung von Bedeutung ist. Hierbei soll das Verhältnis der Monomeren zu Dimeren Form des Proteins als weiteres Kriterium für den „Denaturierungsgrad“ bestimmt werden.

Für die Ermittlung der nach der Hitzedenaturierung auftretenden Veränderungen wurden die unterschiedlich glykosylierten Molkenproteinlösungen elektrophoretisch untersucht. Abb. 4-6 zeigt die Veränderungen der Proteine nach Erhitzung (80 °C, 10 min) in Abhängigkeit des Glykosylierungsgrades. Auffällig ist, ähnlich den verbreiteten Peaks im HPLC-Chromatogramm, eine Verbreiterung der Banden mit steigender Glykosylierung. Eine zunehmende Unschärfe ist dabei auf die zahlreichen Formen mit unterschiedlichem Gehalt an

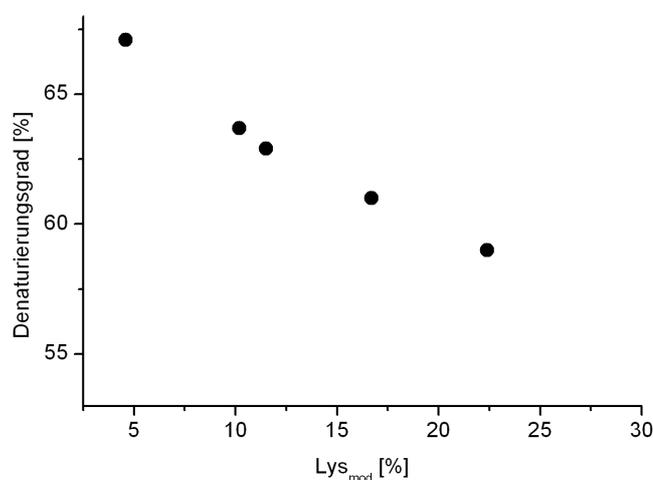


**Abb. 4-6:** Elektrophoretische Trennung von Molkenproteinen mit unterschiedlichen Glykosylierungsgraden, nicht-reduzierende Bedingungen (a) nach Erhitzung bei 80 °C, 10 min. M: Marker; von links nach rechts Molkenpräparate mit steigender Lysinmodifizierung: 1: 4,6 %; 2: 10,2 %; 3: 13,0 %; 4: 16,7 %; 5: 22,4 %. (b) Vergleich zweier Molkenpräparate vor und nach Erhitzung (80 °C, 10 min). M: Marker, Molkenpräparate mit unterschiedlicher Lysinmodifizierung, 2a: 10,2 % vor Erhitzung; 2: 10,2 % nach Erhitzung; 4: 22,4 % vor Erhitzung; 4: 22,4 % nach Erhitzung

gebundener Lactose zurückzuführen und gilt sowohl für  $\beta$ -Lg als auch für  $\alpha$ -La. Des Weiteren sind  $\alpha$ -Lactalbumin und Rinderserumalbumin (BSA) auch nach Erhitzung feststellbar. Ebenfalls mittels RP-HPLC konnte beobachtet werden, dass nach Hitzeeinwirkung unter den gewählten Bedingungen die Menge an  $\alpha$ -La kaum abnimmt. Dies resultiert aus der guten Löslichkeit des Proteins nach partieller Entfaltung. Gegensätzlich dazu kann mittels SDS-PAGE für  $\beta$ -Lactoglobulin eine deutliche Veränderung durch Hitzedenaturierung ermittelt werden. Die Menge des  $\beta$ -Lg-Dimers ist stark erhöht, woraus folglich eine Abnahme der monomeren Form resultiert. Die Auswertung der Ergebnisse zeigte, dass die Umsatzrate in den ersten 10 Minuten der Erhitzung am größten ist. Dies bestätigt die Ergebnisse der RP-HPLC, wobei die Abnahme der Peakflächen sowie die Verschiebung der Retentionszeiten infolge der Hydrophobisierung nach einer kurzen Erhitzungszeit am deutlichsten hervortreten. Das Verhältnis der monomeren zur dimeren Form des  $\beta$ -Lg ist bei der SDS-PAGE das Kriterium für den „Denaturierungsgrad“, welcher mittels der Gleichung (4-1) berechnet

$$\text{Denaturierungsgrad}[\%] = \frac{\beta - Lg_{Dimer}}{\beta - Lg_{Dimer} + \beta - Lg_{Monomer}} \quad (4-1)$$

werden kann. Die untersuchten Dimere sind Produkte des Denaturierungsprozesses. Mit der elektrophoretischen Methode werden die Banden nach Scannen des Gels densitometrisch ausgewertet. Die erhitzten Molkenproteinlösungen weisen einen mittleren Denaturierungsgrad (nach Formel (4-1)) von 60 % für 26,2 %  $Lys_{mod}$  bis 67 % für 4,6 %  $Lys_{mod}$  (Abb. 4-7). Mittels SDS-PAGE kann mit steigender Glykosylierung eine verzögerte Oligomerisierung festgestellt werden und somit ein „anderer“ Denaturierungsgrad als bei der RP-HPLC. Die Beobachtungen stimmen mit den Ergebnissen von [Manderson et al. \(1998\)](#) überein, welche mittels SDS-PAGE einen Denaturierungsgrad von 45 % für die  $\beta$ -Lactoglobulinvariante A und 70 % für  $\beta$ -Lg B nach Erhitzung (85 °C, 12,5 min) ermittelt haben. Die Oligomerisierung des  $\beta$ -Lactoglobulins erfolgt über Disulfid-Austauschreaktionen, wobei sich besonders Modifikationen im Bereich Cys<sup>66</sup> – Cys<sup>160</sup> auf die Aggregatbildung auswirken. Vermutlich verschlechtert die an der Oberfläche kovalent gebundene Lactose die Zugänglichkeit der Disulfidbrücke durch sterische Hinderung und elektrostatische Wechselwirkungen ([Nacka et al. 1998](#)). Dies bedingt wiederum die Beeinflussung der Oligomerisierung während der Hitzedenaturierung. Das kann mittels elektrophoretischer Analyse bestätigt werden. Hier wird bei quantitativer Auswertung der Trend zu geringeren Denaturierungsgraden mit steigender Lysinmodifizierung sichtbar (Abb. 4-7). Die Ergebnisse belegen dass es zur einer



**Abb. 4-7:** Mittelwerte der Denaturierungsgrade (= Verhältnis Dimer zu Monomer) des  $\beta$ -Lg nach Erhitzung (80 °C, 10 min) in Abhängigkeit der Lysinmodifizierung

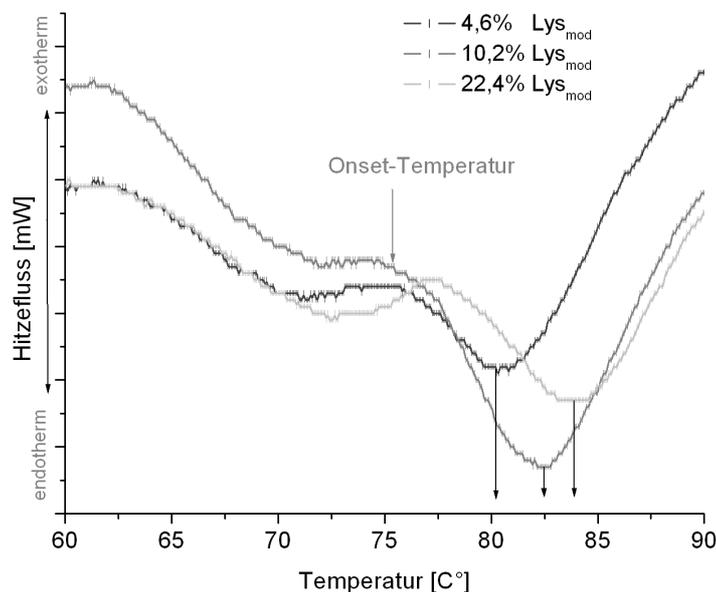
verbesserten Hydratation der Molkenproteine durch die Bindung der Lactose kommt. Dies resultiert bei der Elektrophorese in verkürzten Wanderungsstrecken mit steigender Glykosylierung, welche auf eine verringerte elektrophoretische Mobilität mit der Zunahme des hydrodynamischen Radius durch die Bindung der Lactose zurückzuführen ist (Manderson et al. 1998).

Da die Proteinlöslichkeit nach der Exposition der hydrophoben Gruppen während der Umfaltung und Aggregation abnimmt, zeigt sich der Effekt der Lactosylierung erst nach Erhitzung. Möglicherweise ist der Einfluss auf die Löslichkeit der gebildeten Dimere besonders hoch und überlagert, wie bei der pH 4,6 löslichen Fraktion, den gleichzeitig wirkenden Effekt der Auffaltungsverzögerung. Grund für den steigenden Denaturierungsgrad dieser Fraktion mit steigender Glykosylierung ist wahrscheinlich die verbesserte Hydratisierung der gebildeten Dimere.

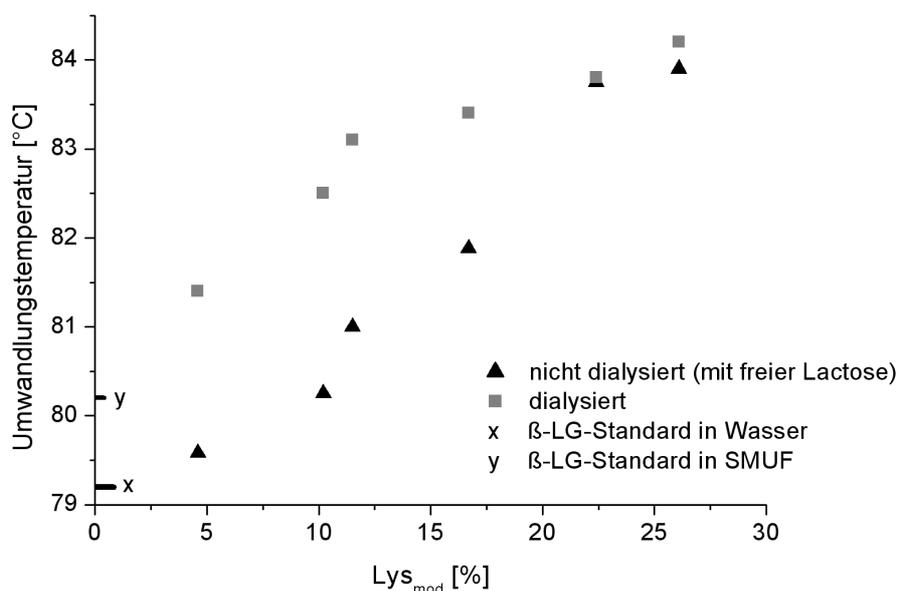
### 4.2.3 Charakterisierung mittels der Differential-Scanning-Calorimetrie

Neben der Bestimmung des Denaturierungsgrades mittels RP-HPLC sowie SDS-PAGE sollte nun die dynamische Differenzkalorimetrie (DSC) zur Ermittlung von thermodynamischer Daten über den Denaturierungsprozess eingesetzt werden.

Die Arbeitsgruppe um [van Teeffelen et al. \(2005\)](#) ermittelten einen Anstieg der Denaturierungstemperatur um  $5^{\circ}\text{C}$  bei einem reinen  $\beta$ -Lg, welcher zu 82 % mit Glucose modifiziert wurde. [Broersen et al. \(2004\)](#) zeigten Erhöhung der Denaturierungstemperatur um  $4,5$  sowie  $6^{\circ}\text{C}$  für fructosyliertes bzw. glucosyliertes  $\beta$ -Lg-Präparat. In der Literatur bislang nicht beschrieben ist das Denaturierungsverhalten niedrig modifizierter sowie kommerziell erhältlicher Molkenproteinpräparate. Dementsprechend sollte in dieser Arbeit der Einfluss der Lactosylierung auf die thermische Stabilität der Molkenproteine im kommerziellen Präparat ermittelt und die Umwandlungstemperatur (= Denaturierungstemperatur) gemessen werden. Die Abhängigkeit der Ergebnisse von dem Grad der Lysinmodifizierung sollte im Mittelpunkt stehen. Hierbei wurden die unterschiedliche glykosylierten Molkenproteinproben der DSC zugeführt. Dabei kommt es während der Messung infolge der Wärmekapazität sowie der Phasenänderung der Probe, wie z. B. Schmelzen zur Temperaturänderungen. Die Denaturierungstemperaturen für drei unterschiedlich glykosylierte Molkenproteinproben sind aus der [Abb. 4-8](#) ersichtlich. Es wurden Werte von  $79,6^{\circ}\text{C}$  für 4,6 %  $\text{Lys}_{\text{mod}}$  über  $80,3^{\circ}\text{C}$  für 10,2 %  $\text{Lys}_{\text{mod}}$  bis  $83,8^{\circ}\text{C}$  für 22,4 %  $\text{Lys}_{\text{mod}}$  bestimmt. Die bei dieser Untersuchung ablaufenden Reaktionen im Protein werden allgemein als Umwandlung be-



**Abb. 4-8:** DSC-Thermogramme dreier unterschiedlich glykosylierter Molkenproteine, nach Dialyse (normiert)

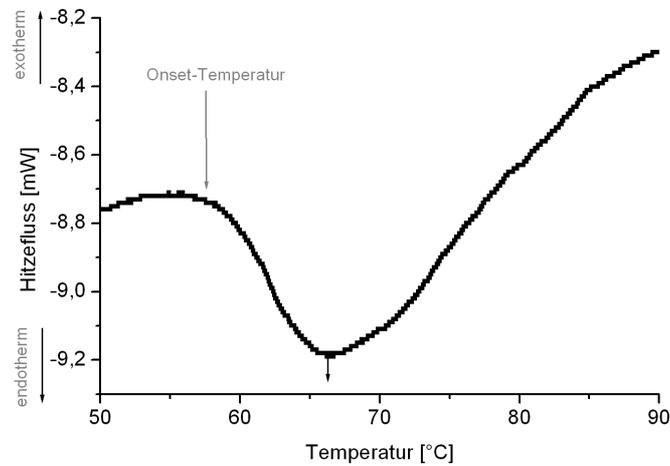


**Abb. 4-9:** Umwandlungstemperatur des  $\beta$ -Lg in Abhängigkeit von der Lysinmodifizierung mit und ohne freie Lactose; ermittelt mittels DSC

zeichnet, da zwischen Entfaltungs- und Aggregationsvorgängen nicht unterschieden werden kann. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen von [Jou und Harper \(1996\)](#) konnte verglichen mit dem Standard von  $\beta$ -Lg eine deutliche Verbreiterung des Molkenproteinpeaks beobachtet werden, was auf die unterschiedlichen Einflüsse der Einzelkomponenten der Lösung zurückzuführen ist. Die Bestimmung der Umwandlungstemperaturen für alle Proben erfolgte durch den Vergleich der Peakminima. Es konnte gezeigt werden, dass die Denaturierungstemperatur der Molkenproteine unter gleichen Milieubedingungen und im Vergleich zum  $\beta$ -Lg-Standard mit steigendem Glykosylierungsgrad zunimmt ([Abb. 4-8](#) und [4-9](#)).

Die breite „Peakschulter“ im Bereich von  $67^{\circ}\text{C}$  bis  $77^{\circ}\text{C}$  wird auf die Denaturierungsprozesse des  $\alpha$ -Lactalbumins zurückgeführt, welches in geringen Mengen im verwendeten Molkenpulver vorhanden ist. Um diese Aussage zu untermauern wurde ein Proteinpräparat (Arla-Pulver) mittels DSC untersucht, welches ca. 98 %  $\alpha$ -La enthält. In der [Abb. 4-10](#) ist das Thermogramm mit der Umwandlungstemperatur dieses Proteins bei  $65,5^{\circ}\text{C}$  dargestellt. Somit können die Denaturierungstemperaturen im Bereich von  $67^{\circ}\text{C}$  bis  $77^{\circ}\text{C}$  für  $\alpha$ -La sowie im Bereich von ca.  $80^{\circ}\text{C}$  bis  $84^{\circ}\text{C}$  für  $\beta$ -Lg ermittelt werden.

Auf Grund zu geringer Mengen an  $\alpha$ -La in den untersuchten Molkenpulver Milei 60 konnte

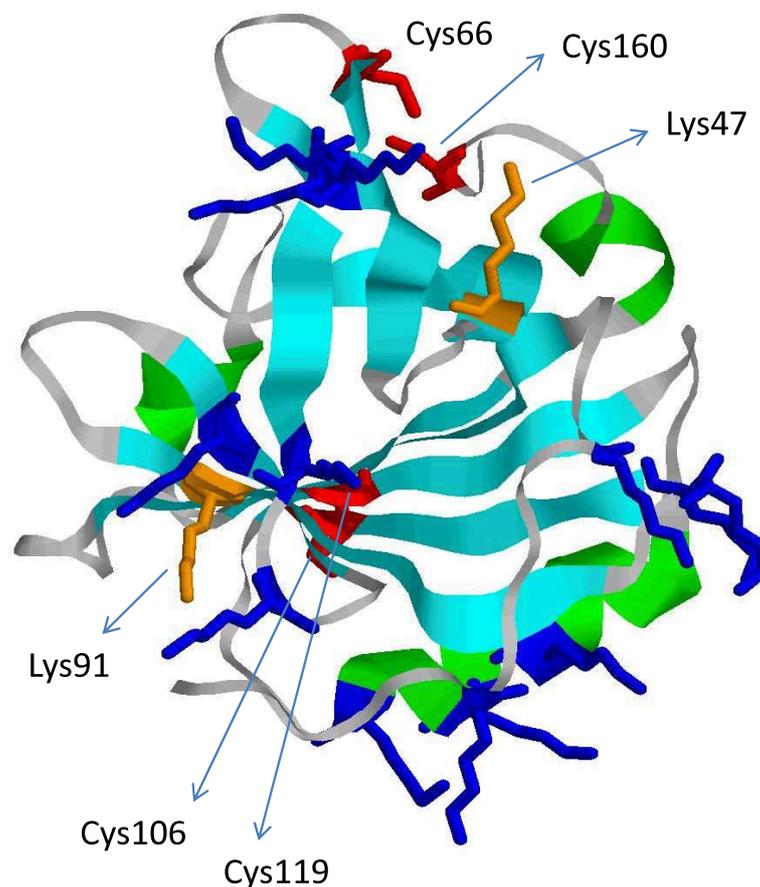


**Abb. 4-10:** DSC-Thermogramm mit Umwandlungstemperatur des  $\alpha$ -Lactalbumins in „Arla“-Proteinpulver

keine Auswertung der Umwandlungstemperatur des  $\alpha$ -La mittels DSC und deren Abhängigkeit vom Glykosylierungsgrad erfolgen. Wie oben beschrieben wird neben dem  $\beta$ -Lg ebenfalls das  $\alpha$ -La lactosyliert. Die in dieser Arbeit bestimmte Denaturierungstemperatur für einen  $\beta$ -Lactoglobulin-Standard gelöst in synthetischem Milchultrafiltrat (SMUF, pH 6,8) wurde bei 80,2 °C ermittelt (siehe Abb. 4-9). Jou und Harper (1996) fanden eine Denaturierungstemperatur für einen  $\beta$ -Lg von 78,8 °C. Die erhöhte Umwandlungstemperatur im Vergleich zur Literatur ist auf unterschiedliche Milieubedingungen zurückzuführen. Dabei wirken sich der pH-Wert von 6,8 sowie die Pufferung durch das Lösungsmittels positiv auf die Proteinestabilität aus. Nach Lösen des  $\beta$ -Lg-Standards (ohne Lactose) in destilliertem Wasser verringerte sich die Umwandlungstemperatur auf einen Wert von 79,2 °C (Abb. 4-9). Die Differenz zwischen den Umwandlungstemperaturen, welche für  $\beta$ -Lg in An- oder Abwesenheit von Lactose ermittelt wurden (vor und nach Dialyse), zeigte sich neben dem Standard auch bei den Proben (Abb. 4-9). Der Unterschied in den Denaturierungstemperaturen für das  $\beta$ -Lactoglobulin zwischen 4,6 %  $Lys_{mod}$  und 26,1 %  $Lys_{mod}$  beträgt rund 2,8 °C für die Proben ohne freie Lactose (nach Dialyse und Gefriertrocknung). Die Tendenz zu höheren Umwandlungstemperaturen mit steigender Glykosylierung ist deutlich sichtbar und wird bei den nicht dialysierten Proben noch eindeutiger. Hier beträgt der Anstieg der Umwandlungstemperatur 4,3 °C zwischen der niedrig und der stark glykosylierten Molkenproteinprobe. Wie aus den Abb. 4-9 und 4-8 ersichtlich, ist der Anstieg der Umwandlungstemperatur des  $\beta$ -Lg sehr gut reproduzierbar. Bei der Messreihe der dialysierten Proben

lässt sich eine verringerte Geradensteigung im Bereich höher glykosylierter Proteine beobachten. Diese Verzögerung der Umwandlung könnte auf die bevorzugt lactosylierten Aminosäuren – Lys<sup>47</sup> und Lys<sup>91</sup> – zurückzuführen sein (siehe Abb. 4-11). Da sich die beiden Lysinreste in exponierter Lage befinden, wird durch deren Reaktion eine starke Veränderung der Oberflächenladung und -hydrophilie des Gesamtmoleküls erreicht. Zudem sind die beiden Aminosäuren jeweils in der Nähe einer Disulfidbrücke lokalisiert (siehe Abb. 4-11), was die Aggregation entscheidend beeinflussen kann.

Eine weiterer Grund für die Unregelmäßigkeit der dialysierten und gefriergetrockneten Proben könnte eine Kältedenaturierung sein. Hier kann eine teilweise Konformationsänderung mit der Offenlegung hydrophober Bereiche erfolgen. Aminosäuren, welche an der Ober-



**Abb. 4-11:** Das  $\beta$ -Lactoglobulin Molekül mit den beiden Disulfidbrücken (rot), 15 Lysinresten (blau); gesondert gekennzeichnet Lys<sup>47</sup> und Lys<sup>91</sup> (orange). (dargestellt mit dem Programm RasMol 2.6)

fläche des  $\beta$ -Lactoglobulinmoleküls angeordnet sind und deren inter- und intramolekulare Wechselwirkungen zeigen maßgebliche Auswirkungen auf die Stabilität und das Lösungsverhalten des Proteins.

Bei den nicht dialysierten Proben spielt die Schutzwirkung freier Saccharide bezüglich Denaturierung eine Rolle (Spiegel 1999). Die erniedrigten Werte der lactosehaltigen Proben werden zum größten Teil auf die veränderten Milieubedingungen der Untersuchungslösung zurückgeführt. Durch die Lösung der Proben in destilliertem Wasser resultiert ein pH-Wert (6,0 - 6,3) welcher durch die Aminosäuren des Molkenpulvers bestimmt wird. Verheul et al. (1998) beobachteten einen Anstieg der Umwandlungstemperatur in Richtung niedriger pH-Werte, wobei das Stabilitätsmaximum im Bereich von pH 3 bis 4 liegt. Die gegen SMUF (pH 6,8) dialysierten Proben – welche erhöhte Umwandlungstemperaturen aufweisen – erreichen einen höheren pH-Wert, woraus kein Stabilitätsgewinn gegenüber nicht dialysierten Proben erwartet wird. Die Differenz zwischen den Umwandlungstemperaturen nach bzw. vor Dialyse könnte durch die Ionenstärke verursacht werden. Nach Gefriertrocknung der gegen SMUF dialysierten Proben resultiert eine 25 %-ige Lösung mit einer weit höheren Ionenstärke und Pufferkapazität, wodurch eine Zunahme der Konformationsstabilität erreicht wird (Relkin 1994). Bei Verwendung von destilliertem Wasser statt SMUF wird die Umwandlungstemperatur des  $\beta$ -Lactoglobulin-Standards um ca. 1 °C gesenkt (siehe Abb. 4-9).

Die Ergebnisse bezüglich der Denaturierungstemperatur, welche mittels DSC ermittelt wurden, sind mit Studien in der Literatur vergleichbar. Jou und Harper (1996) wiesen einen Anstieg der Denaturierungstemperatur um bis zu 4 °C bei Zusatz von Lactose zur Proteinlösung nach. Eine Erhöhung der Denaturierungstemperatur des reinen  $\beta$ -Lactoglobulin A nach Glucosylierung (Glykosylierungsgrad von ca. 82 %) um 5 °C sowie eine Reduktion der Wärmekapazität ( $\Delta C_p$ ) um 60 % wurde von van Teeffelen et al. (2005) nachgewiesen. Broersen et al. (2004) berichten, dass die Umwandlungstemperatur für glucosyliertes bzw. fructosyliertes  $\beta$ -Lg im Vergleich zum unmodifizierten Protein um 6 °C bzw. 4,5 °C erhöht wurde.

Folglich kann die thermische Stabilität eines Proteins durch die Reaktion mit reduzierenden Zuckern verändert werden. Die kovalente Bindung eines Zuckers kann die Proteinaggregation durch die erhöhte Nettoladung oder die vergrößerte sterische Behinderung unterdrücken. Mit dieser Arbeit konnte erfolgreich bewiesen werden, dass die nichtenzymatische Glykosylierung von kommerziellem Molkenpulver die Denaturierung direkt beeinflusst und

zwar in Abhängigkeit vom Glykosylierungsgrad. Eine höhere Lysinmodifizierung induziert eine langsamere Denaturierung.

#### 4.2.4 Charakterisierung mittels Fluoreszenzanalytik

Die Fluoreszenzanalytik ist eine vielfältig zur Untersuchung des Denaturierungsverhaltens von Molkenproteinen genutzte Methode. Hierbei wird vor allem die Zunahme der Fluoreszenzintensität oder der Fluoreszenzlebenszeit im Zuge der Auffaltung während der Denaturierung bestimmt. Die Ermittlung des Emissionsmaximums lässt Schlüsse auf die Umgebungspolarität der fluoreszierenden Gruppen und damit deren Lösungsmittelzugänglichkeit zu. Demnach lassen sich Aussagen bezüglich der Entfaltung der Tertiärstruktur treffen. Im nativen Molekül des  $\beta$ -Lactoglobulins stellt Trp<sup>19</sup> das Hauptfluorophor dar. Nach vollständiger Auffaltung ist der Beitrag der beiden Tryptophanreste (Trp<sup>19</sup> und Trp<sup>61</sup>) zur Gesamtfluoreszenzintensität gleich (Manderson et al. 1999). Die gemessene Intensitätserhöhung ist daher stets ein Indiz für die Veränderung im Bereich der Disulfidbrücke Cys<sup>66</sup> – Cys<sup>160</sup>. Zusätzlich wird nach der Denaturierung des  $\beta$ -Lactoglobulins eine Verschiebung des Emissionsspektrums zu längeren Wellenlängen beobachtet, was aus der Zunahme der Umgebungspolarität des Trp<sup>19</sup> beim Übergang aus dem Proteininneren in das Lösungsmittel während der Auffaltung resultiert (Manderson et al. 1999, Palazolo et al. 2000). Das Fluoreszenzmaximum von Tryptophan in apolarer Umgebung und damit bei starker Abschirmung der Lösungsmiteleinflüsse wird mit 332 nm angegeben (Lotte 2004).

Die Fluoreszenzanalytik wurde angewandt um die bereits mittels RP-HPLC, SDS-PAGE und DSC erhaltenen Ergebnisse abermals zu untermauern. Für die Charakterisierung des Denaturierungszustandes von Molkenproteinen, wurden diese in Phosphatpuffer (pH 6,8) gelöst und das Fluoreszenzspektrum bei konstanter Anregungswellenlänge von 295 nm zwischen 300 und 400 nm aufgenommen. Hierbei können die Änderungen des Fluorophors (Tryptophanreste in Protein) oder seiner Umgebung verfolgt werden. Die Fluoreszenz der Tryptophanreste ist stark von der Polarität der Umgebung abhängig, welche sich bei der Denaturierung ändert. Somit kann aus der Fluoreszenz das Verhältnis des nativen zu denaturierten Protein bestimmt werden.

Nach Hitzedenaturierung wurde eine Zunahme der Fluoreszenzintensität aller untersuchten Molkenproteinlösungen beobachtet. Diese betrug für den  $\beta$ -Lg-Standard ca. 22 % sowie für die Molkenproteine zwischen 3 % und 9 % (Tab. 4-3). Zusätzlich zeigt der Standard ei-

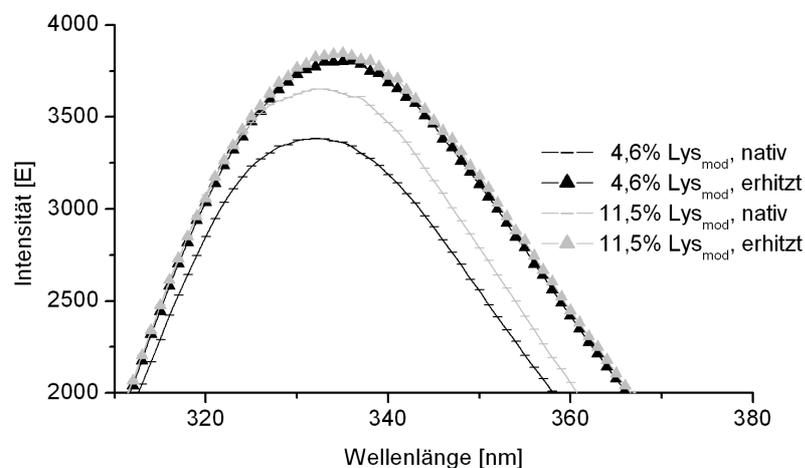
**Tab. 4-3:** Ergebnisse der Hitzedenaturierung in  $\beta$ -Lactoglobulin-Standard und in Molkenproteinlösungen vor und nach Erhitzung (85 °C, 10 min)

<b>Lys<sub>mod</sub> [%]</b>	<b><math>\beta</math>-Lg-Std</b>	<b>4,6</b>	<b>10,2</b>	<b>11,5</b>	<b>16,7</b>	<b>22,4</b>	<b>26,1</b>
$E_{max}$ , nativ [nm]	333	332	332	332	332	333	332
$E_{max}$ , erhitzt [nm]	334	337	336	335	335	335	334
Rotshift [nm]	1	5	4	3	3	2	2
Intensität [E]	4689	3683	3849	3839	3490	3463	3325

ne geringe Rotverschiebung von 1 nm im Gegensatz zu den Molkenproteinproben, welche eine Rotverschiebung von 2 bis 5 nm aufweisen (Tab. 4-3, Rotshift). Dieses Verhalten wird mit den Änderungen während einer Gefriertrocknung des Standards erklärt, wie z. B. einer partiellen Exposition der im Molekülinneren befindlichen Bereiche.

Die typischen Fluoreszenzspektren von Molkenproteinlösungen vor und nach Erhitzung sind aus Abb. 4-12 ersichtlich. Manderson et al. (1999) ermittelten eine Rotverschiebung von 6 bis 8 nm nach Erhitzung des  $\beta$ -Lactoglobulins in Abhängigkeit von den genetischen Varianten und vom pH-Wert. Allerdings erfolgte dort die Hitzedenaturierung über einen Zeitraum von vier Tagen, so dass der resultierende Denaturierungsgrad erheblich höher ist. Des Weiteren konnten Unterschiede zwischen den Molkenproteinproben mit variierenden Glykosylierungsgraden festgestellt werden (Tab. 4-3). Die Molkenproteine tendieren mit steigender Lysinmodifizierung zu geringerer Rotverschiebung. So kann auch mit dieser Methode ein Zusammenhang zwischen der Anzahl der gebundenen Lactose und dem Denaturierungsgrad der Molkenproteine ermittelt werden. Vermutlich binden hydrophobe Aminosäuren im entfalteten Zustand des Proteins an die vorhandene Lactose und verhindern damit ihre Exposition zum Lösungsmittel (van Teeffelen et al. 2005). Die geringe Zunahme der Wellenlänge lässt vermuten, dass der Eintritt der Fluorophore in die polare Umgebung während der Hitzedenaturierung nicht vollständig ist. So kann die Konformation nur teilweise entfaltet werden.

Weiterhin wird eine Zunahme der Fluoreszenzintensität am Emissionsmaximum nach Erhitzung der Molkenproteinproben beobachtet (Unterschied  $E_{max}$ , nativ zu  $E_{max}$ , erhitzt; siehe Tab. 4-3). Dabei ist der Anstieg bei den geringer lactosylierten Proben höher, was auf eine Abnahme der Denaturierungswirkung im Bereich der Disulfidbrücke mit steigender Lysinmodifikation weist. Damit wird die Aggregation des  $\beta$ -Lactoglobulinmoleküls durch die



**Abb. 4-12:** Fluoreszenzspektren von zwei Molkenproteinlösungen mit unterschiedlichem Glykosylierungsgrad vor und nach Erhitzung (85 °C, 10 min)

Bindung der Lactose beeinflusst. Das während der frühen Maillard-Reaktion gebildete Lactuloselysin blockiert möglicherweise die Zugänglichkeit der Disulfidbrücke Cys<sup>66</sup> – Cys<sup>160</sup> und behindert bzw. verlangsamt folglich die Aggregation. Bei der räumlichen Betrachtung des  $\beta$ -Lactoglobulinmoleküls (Abb. 4-11) befindet sich der bevorzugt lactosylierter Lysinrest (Lys<sup>47</sup>) tatsächlich in relativer Nähe zu Cys<sup>66</sup> – Cys<sup>160</sup>.

#### 4.2.5 Zusammenfassung der Denaturierungsstudien

Nach Auswertung der Ergebnisse wird deutlich, dass der „Denaturierungsgrad“ nicht als solcher definiert werden kann. Es muss stets eine Angabe der verwendeten Messmethode erfolgen, da jeweils unterschiedliche Eigenschaften bewertet werden. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass es mit steigender Lysinmodifizierung zur Erhöhung der bei pH 4,6 löslichen Molkenprotein-Fraktion kommt, wie durch RP-HPLC-Messungen gezeigt werden konnte. Eine Verlangsamung der Oligomerisierung und des Aggregationsprozesses konnte mittels SDS-PAGE beobachtet werden. Die Denaturierungstemperatur des  $\beta$ -Lactoglobulins in kommerziellen Molkenpulvern erhöht sich mit steigender Glykosylierung signifikant, wie mittels DSC ermittelt. Die Werte der Fluoreszenzanalytik weisen auf eine verzögerte Entfaltung der Molkenproteine mit Lysinblockierung hin.

Durch die kovalente Bindung der Lactose wird eine Polarisierung der Oberfläche erreicht, welche zu einer verbesserten Hydratisierung und Löslichkeit des Moleküls führt. Die pola-

**Tab. 4-4:** Zusammenfassung der Auswirkungen der Glykosylierung auf die Denaturierungseigenschaften der Molkenproteine

Methoden	RP-HPLC	SDS-PAGE	DSC	Fluoreszenz
Ergebnis	erhöhte Polarität, und Löslichkeit bei pH 4,6	verlangsamte Oligomerisierung	erhöhte Denaturierungstemperatur	verzögerte Entfaltung

ren Zuckerreste könnten zum einen die Ausbildung verstärkter intermolekularer Wechselwirkungen über Wasserstoffbrücken bewirken, welche die Assoziation zur dimeren Formen der nativen Proteine begünstigen. Hierdurch wird die Dissoziation in die Monomere eingeschränkt, die einen entscheidenden Schritt des Denaturierungsprozesses darstellt. Zum anderen wird vermutlich die Zugänglichkeit der Disulfidbrücken für Thiol- / Disulfidaustauschreaktionen und damit verbundene kovalente Aggregation durch sterische Abschirmung der Lactosemoleküle erschwert. Dieser Effekt spielt bereits bei niedriger Lysinblockierung eine wichtige Rolle, da die bevorzugt glykosylierten Lysinreste sich in der unmittelbaren Umgebung der Disulfidbrücken befinden.

Mit der Lactosylierung einher geht eine verbesserte Hydratisierung des bereits aggregierten Proteins, welche sich besonders auf die Löslichkeit am isoelektrischen Punkt auswirkt.

### 4.3 Auswirkung der nichtenzymatischen Glykosylierung auf die Emulgiereigenschaften von Molkenproteinen

Eines der Ziele dieser Arbeit war es, die emulgierenden Eigenschaften von Molkenproteinen in Abhängigkeit von der Glykosylierung zu charakterisieren. Anschließend soll festgestellt werden inwiefern die emulgierenden Eigenschaften der untersuchten Molkenproteine durch unterschiedlich stark ausgeprägte Modifizierung mit Lactose beeinflusst und eventuell verbessert werden können. Zusätzlich sollen Aussagen über den Transfer der Ergebnisse von Molkenproteinlösungen zu molkenproteinstabilisierten Emulsionen getroffen werden. Um Aussagen über das Emulgiervermögen treffen zu können, wurden folgende Methoden verwendet: die Oberflächenspannung und die daraus resultierende kritische Mizellbildungskonzentration zur Bestimmung der Grenzflächeneigenschaften in Proteinlösun-

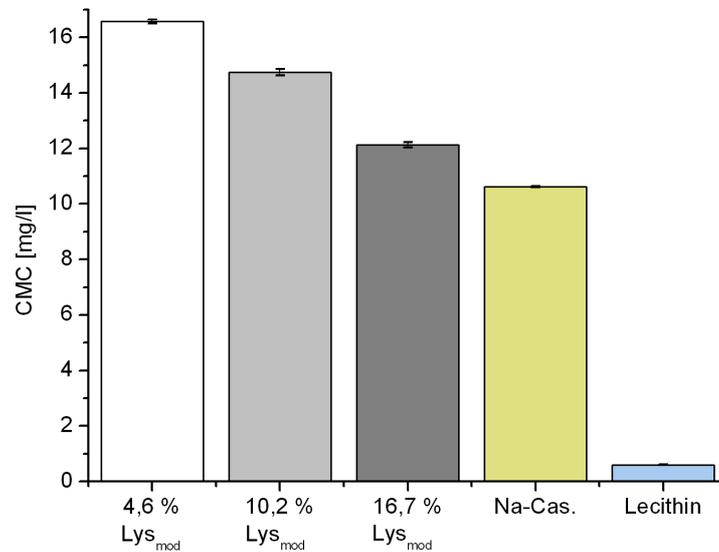
gen, die Trübungsmessung zur Bestimmung der Emulgieraktivität und Emulsionsstabilität in frisch hergestellten Emulsionen sowie die Lichtmikroskopie zur Charakterisierung der Fetttropfchengröße und -verteilung in Emulsionen.

#### 4.3.1 Oberflächenspannung und kritische Mizellbildungskonzentration (CMC)

Die Bestimmung der Oberflächenspannung erfolgte über die Vertikalplattenmethode nach Wilhelmy. Die Wilhelmy-Plattenmethode liefert sehr genaue, reproduzierbare und mit der Literatur (Nylander et al. 1999) vergleichbare Ergebnisse und kann ohne Kenntnis der Dichte von Lösungen durchgeführt werden. Die Messung der Grenzflächenspannung über die Zeit gibt wichtige Hinweise zum Emulgierverhalten der eingesetzten Proteine (Eugster-Meier 2001).

Es wurde der Abfall der Oberflächenspannung in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration (siehe 3.13) bestimmt und die kritische Mizellbildungskonzentration (CMC) graphisch ermittelt. Der Abfall der Oberflächenspannung geht dabei mit der Verbesserung der Grenzflächeneigenschaften einher.

Betrachtet man die Abhängigkeit der Mizellbildungskonzentration (CMC) vom Glykosylierungsgrad in Abb. 4-13, so wird deutlich, dass ein Zusammenhang zwischen den beiden Parametern besteht. So kommt es mit steigender Lysinmodifizierung zum Absinken der Oberflächenspannung und damit zum Abfall der CMC vom 16,5 mg/l für 4,6 %  $Ly_{smod}$  auf 12,1 mg/l für 16,7 %  $Ly_{smod}$  (siehe Abb. 4-13). Dementsprechend steigt die Grenzflächenaktivität mit der Modifizierung der Molkenproteine und nähert sich dem Natriumcaseinat an, welches als ein wesentlich grenzflächenaktiveres Protein bekannt ist. Der Vergleich zum kommerziellen Emulgator Lecithin soll hier nur zur Einschätzung des Emulgiervermögens dienen. Phosphatidylcholine bilden schon bei niedrigen Konzentrationen Mizellen und gelten als natürliche Tenside. Aufgrund der Molekülgröße vermögen Proteine die Grenzflächenspannung niemals so stark zu reduzieren wie niedermolekulare Emulgatoren (Lecithin), da diese eine höhere Packungsdichte an der Phasengrenze erreichen. Die gefundenen Werte für Lecithin stimmen mit den Literaturwerten überein (Tausk et al. 1974, Smith und Tanford 1972). Niedrige Grenzflächenspannungen, enge Partikelgrößenverteilungen und möglichst kleine Tröpfchen tragen grundsätzlich dazu bei, Emulsionen zu stabilisieren.



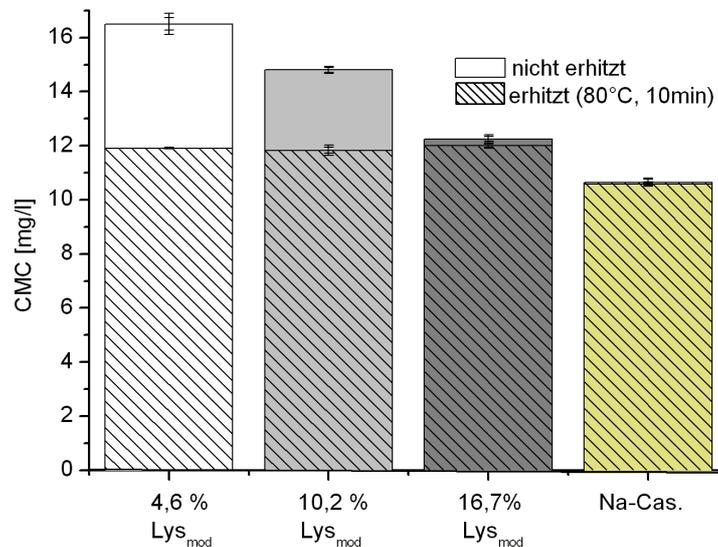
**Abb. 4-13:** Abhängigkeit der Mizellbildungskonzentration (CMC) vom Glykosylierungsgrad der Molkenproteine im Vergleich zu Natriumcaseinat und Lecithin; bestimmt nach der Wilhelmy-Plattenmethode mittels Tensiometrie bei pH 6,1

Dass Caseine hydrophober als Molkenproteine sind, wird anhand des niedrigeren CMC-Wertes bestätigt. Vergleichbare Ergebnisse sind bei [Krägel et al. \(1998\)](#) beschrieben. [Krägel et al. \(1998\)](#) geben eine Konzentration von mehr als 180 mg/l für  $\beta$ -Lg und 140 mol/l für  $\beta$ -Casein an um eine Sättigung der Grenzfläche zu erreichen. Die bei dieser Arbeit um Faktor 10 niedrigeren Werte ergeben sich aus der Bestimmung der CMC in einem Molkenpräparat, wohingegen [Krägel et al. \(1998\)](#) reine Substanzen untersuchten. Daraus resultiert ein niedrigerer CMC-Wert für Casein im Vergleich zu  $\beta$ -Lg. Das Ergebnis lässt sich mit der für Caseine üblichen Mizellbildung in Einklang bringen. Caseine aggregieren ab einer bestimmten Konzentration zu Mizellen ([Cheftel et al. 1992](#), [Belitz et al. 2001](#)), während  $\beta$ -Lactoglobulin im untersuchten pH-Bereich als Dimer vorkommt, wobei keine echte Mizellbildung bekannt ist. Die Beobachtung der sinkenden kritischen Mizellbildungskonzentration mit Glykosylierung der Molkenproteine überrascht, da hohe CMC-Werte auf hydrophile grenzflächenaktive Substanzen hinweisen und umgekehrt ([Menger und Keiper 2000](#), [Piispanen 2002](#)). Die Hydrophilie der Molkenproteine steigt mit Glykosylierung, d. h. mit Anbindung von polaren Lactosemolekülen, wie bereits mittels RP-HPLC bestätigt (siehe [Abb. 4-3](#)) und ist damit im Widerspruch zu den Messungen am Tensiometer. Inwiefern sich

der Gehalt an freier Lactose in Molkenproteinlösungen auf die Ergebnisse der Oberflächenspannung auswirkt, wurde nicht untersucht. Da Zucker die Trockenmasse und Viskosität der kontinuierlichen Phase erhöhen, kann es zur Änderung der Oberflächenspannung kommen. Zuckermoleküle und somit Lactose besitzen keine hydrophoben Molekülbereiche und gelten als oberflächeninaktiv, was gleichzeitig zur Erhöhung der Oberflächenspannung führt. Sie besitzen eine Hydrathülle und halten sich deshalb nicht unmittelbar an der Phasengrenze auf. Im Gegensatz dazu gelten z. B. Proteine als grenzflächenaktive Substanzen, reichern sich speziell an der Phasengrenze an und setzen die Oberflächenspannung herab. Hier sind die hydrophoben und hydrophilen Bereiche über das gesamte Molekül verteilt. Da beim nativen Molkenprotein mehr freie Lactose vorhanden ist als im glykosylierten Protein, könnte es ein Grund für die höheren Werte der Oberflächenspannung bei niedrigeren Lysinmodifikationen sein.

Eine weitere Erklärung für das Phänomen könnte aus den möglicherweise verbesserten Mizellbildungseigenschaften der Molkenproteine mit steigender Glykosylierung resultieren. Eine ungleiche Verteilung von Zuckermolekülen am Protein führt eventuell zu mizellaren Aggregaten. Je mehr Zucker gebunden ist, desto mehr kommt es bei den Protein-Zucker-Konjugaten zu einer Art Mizellbildung, welche normalerweise beim Molkenprotein eher zurücktritt.

Die Messung der Oberflächenspannung sowie der damit verbundenen kritischen Mizellbildungskonzentration erfolgte ebenfalls nach Erhitzen der Molkenproteinlösungen (Abb. 4-14) bei unterschiedlichen Variationen der Temperatur und Zeit. Hierbei sollte der Einfluss der Denaturierung der glykosylierten Molkenproteine auf die Emulgierereigenschaften dargestellt werden. Die Lösungen der unterschiedlich glykosylierten Molkenproteine wurden bei 80 °C, 10 min erhitzt, sowie anschließend die CMC-Werte nach Bestimmung der Oberflächenspannung ermittelt. Wie aus der Abb. 4-14 ersichtlich kommt es zu keiner Beeinflussung der Emulgierereigenschaften nach Hitzedenaturierung für glykosylierte Molkenproteine, was anhand der gleichbleibenden Werte zu erkennen ist. Dabei wird deutlich, dass der Effekt der verbesserten Grenzflächeneigenschaften mit steigender Glykosylierung nur bei „nativen“, also nicht denaturierten Molkenproteinen zum Ausdruck kommt. Der Einfluss der erhöhten Hydrophibizität durch die Denaturierung ist möglicherweise größer als der Einfluss der gebundenen Lactose, die nun in den Hintergrund tritt. Die kritische Mizellbildungskonzentration zwischen einzelnen nicht erhitzten und erhitzten Molkenproteinen fällt. Grund für diese Beobachtung ist die erhöhte Oberflächenhydrophobizität, welche aus der



**Abb. 4-14:** Abhängigkeit der CMC von dem Glykosylierungsgrad vor und nach Erhitzung im Vergleich zu Natriumcaseinat (Na-Cas.); bestimmt nach der Wilhelmy-Plattenmethode mittels Tensiometrie bei pH 6,1

Erhitzung resultiert. Niedrige CMC-Werte weisen auf hydrophobe grenzflächenaktive Substanzen hin (Menger und Keiper 2000, Piispanen 2002). Bei der Denaturierung kommt es zur Konformationsänderung des  $\beta$ -Lactoglobulins mit einer partiellen Entfaltung der Struktur und Exposition der hydrophoben Gruppen aus dem Molekülinneren nach außen. Die denaturierten Molkenproteine aggregieren bereits bei geringeren Konzentrationen zu mizelartigen Strukturen, da hydrophobe Kräfte die Mizellbildung beschleunigen (Menger und Keiper 2000). Der Abfall der CMC ist dabei umso größer, je niedriger das Protein glykosyliert wurde. Dies hängt mit der verbesserten Thermostabilität und der damit verzögerten Denaturierung mit steigender Glykosylierung zusammen.

Caseine sind aufgrund des Fehlens einer Tertiärstruktur sehr hitzestabil und damit nicht denaturierbar. Dies begründet, dass der CMC-Wert für Natriumcaseinat sowohl vor als auch nach Erhitzung unbeeinflusst bleibt.

Eine Glykosylierung im niedrigen, praxisrelevanten, Bereich ändert die Grenzflächeneigenschaften nativer Molkenproteine. Nach einer Hitzedenaturierung ist dieser Effekt nicht mehr gegeben.

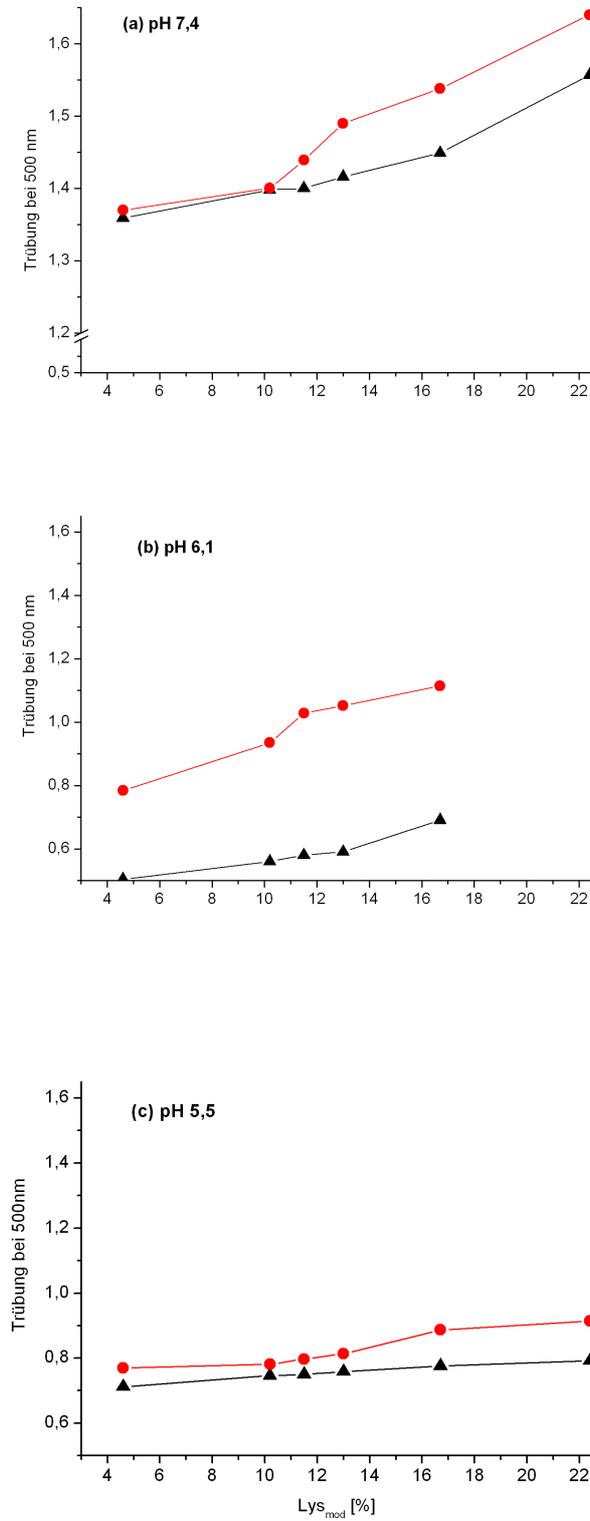
### 4.3.2 Trübungsmessung

Diese Untersuchungen sollten Aussagen über die Konsequenzen der Glykosylierung auf die Emulgierereigenschaften der Molkenproteine in einer Emulsion liefern.

Die Bestimmung der Emulgieraktivität (EA) und der Emulsionsstabilität (ES) erfolgte durch Trübungsmessung bei 500 nm nach der Methode von [Pearce und Kinsella \(1978\)](#). Für die Durchführung der Messung wurden Emulsionen, bestehend aus Öl und 0,01 %-iger Proteinlösung (1:3 (v/v)), frisch hergestellt sowie anschließend die Trübung in Abhängigkeit der Zeit ermittelt. Dabei gilt, je größer die Trübung desto höher die Emulgierwirkung. Da es sich bei den hergestellten Emulsionen um polydisperse Systeme handelt, bei welchen große Teilchen die Streuintensität vieler kleiner Teilchen überlagern können, müssen die Messbedingungen konstant gehalten werden, um auswertbare Ergebnisse zu erhalten und um Vergleiche der Proteineigenschaften bezüglich des Glykosylierungsgrades treffen zu können.

Die Emulgieraktivität (EA) entspricht der Trübung der frisch hergestellten Emulsion bei 0 min. Für die unterschiedlich glykosylierten Molkenproteine ist diese in der [Abb. 4-15](#) dargestellt (schwarze Graphen). Die EA und damit die Emulgierwirkung steigt mit der Glykosylierung für alle untersuchten pH-Werte und ist mit der erhöhten Hydrophilie durch Anbindung der Lactose zu erklären. Bei einem pH-Wert von 6,1 erhöhte sich die Emulgieraktivität um ca. 37 % zwischen 4,6 %  $Lys_{mod}$  und 16,7 %  $Lys_{mod}$ , bei pH 5,5 um ca. 10 %. Die Bestimmung der Emulgieraktivität erfolgte ebenfalls nach Erhitzen der Proteinlösungen und anschließender Emulsionsherstellung. In der [Abb. 4-15](#) ist die Emulgieraktivität nach Erhitzen (rote Graphen) in Abhängigkeit von der Glykosylierung für drei unterschiedliche pH-Werte dargestellt. Denaturierte Molkenproteine zeigen eine verbesserte Emulgierwirkung im Vergleich zu nicht denaturierten Proben. Zudem zeigt sich eine deutliche Abhängigkeit der EA von der Glykosylierung bei allen untersuchten pH-Werten und damit eine Verbesserung der Emulgierwirkung mit steigender Lysinblockierung.

Der Zerfall der Emulsion ist eine Reaktion 1. Ordnung. Dabei entspricht die Emulsionsstabilität (ES) der Halbwertszeit der Anfangstrübung. Die Ergebnisse der Bestimmung der ES über die Trübungsmessung sind in der [Tab. 4-5](#) (1. Teil) dargestellt. Die Wirkung des verwendeten Proteins als Emulgator lässt sich in Abhängigkeit von der Lysinblockierung deutlich erkennen. Eine Proteinmodifizierung von 16,7 % im Vergleich zur unbehandelten Probe führt bei einem pH-Wert von 5,5 zur einer eindeutigen Verbesserung der Eigenschaften als Emulgator für O/W - Emulsionen. Ähnliche Effekte sind in der Literatur für  $\beta$ -Casein beschrieben. So wirkt sich eine Glykosylierung des Proteins von ca. 50 % stabilitätserhöhend



**Abb. 4-15:** Abhängigkeit der Emulgieraktivität von der Lysinmodifizierung vor und nach Erhitzen bei drei unterschiedlichen pH-Werten; erhitzt bei 80 °C, 10 min, schwarz: vor Erhitzung, rot: nach Erhitzung

**Tab. 4-5:** Abhängigkeit der Emulsionsstabilität von der Lysinblockierung; dargestellt für drei ausgewählte pH-Werte, vor und nach Erhitzung (80 °C, 10 min)

	Emulsionsstabilität [min]		
	pH 7,4	pH 6,1	pH 5,5
4,6 % $Ly_{Smod}$	21,9 ± 0,5	15,5 ± 0,6	12,2 ± 0,4
16,7 % $Ly_{Smod}$	6,6 ± 0,2	15,4 ± 1,4	30,4 ± 1,6
4,6 % $Ly_{Smod}$ , erhitzt	9,1 ± 0,5	9,7 ± 0,5	11,4 ± 0,9
16,7 % $Ly_{Smod}$ , erhitzt	15,1 ± 0,6	14,8 ± 0,7	18,9 ± 1,2

auf Emulsionen aus (Darewicz et al. 1998). Der pH-Wert von 5,5 liegt nahe dem isoelektrischen Punkt der Molkenproteine (pI: 5,1 - 5,3), wo die Nettoladung gleich Null ist. Für eine erhöhte Emulsionsstabilität der Konjugate wirken die nach außen gerichteten, also zur Lösung orientierten Zuckermoleküle, welche über sterische Effekte eine gewisse Abschirmung emulgierter Fetttröpfchen voneinander begünstigen. Die amphiphilen Konjugate adsorbieren besser an der O/W - Oberfläche mit den hydrophoben Ketten, welche sich zur Ölphase orientieren und den hydrophilen Resten in Richtung Wasser. Zusätzlich wurde eine Verkleinerung der Fetttröpfchen mit Glykosylierung erreicht, die mit verbesserten Emulgierereigenschaften einhergeht (siehe 4.3.3). Der pH-Wert von 5,5 ist besonders für die Problemstellung relevant und herrscht in dem für diese Arbeit ausgesuchten Lebensmittel (Schmelzkäsezubereitung) vor. Bei einem pH-Wert von 6,1 zeigt sich kein Einfluss der Lysinblockierung auf die Emulsionsstabilität. Bei pH 7,4 wird ein umgekehrter Effekt beobachtet. Hier sinkt die Emulsionsstabilität mit der Glykosylierung. In der Literatur wird von einer Instabilität der durch Molkenproteine stabilisierten Emulsionen bei Annäherung des pH-Wertes berichtet, wenn der pH-Wert sich dem isoelektrischen Punkt nähert (Onsaard et al. 2006, Metwalley 2004, Chanamai und McClements 2002, Pearce und Kinsella 1978). Dies wird mit der relativ niedrigen elektrostatischen Repulsion zwischen den emulgierten Tröpfchen erklärt. Bei niedrigem pH-Wert haben die meisten der Aminosäuregruppen eine positive Ladung ( $-NH_3^+$ ) während die meisten Carboxylgruppen neutral sind ( $-COOH$ ). Mit Erhöhung des pH-Wertes kommt es zur Verringerung des Ausmaßes der positiven Ladung von Emulsi-

onströpfchen, teilweise begründet durch einsetzende negative Ladung der Carboxylgruppen ( $-\text{COO}^-$ ) und das Neutralwerden der Aminogruppen ( $-\text{NH}_2$ ) (Chanamai und McClements 2002, Onsaard et al. 2006). Die positive Ladung des Proteins trägt zur elektrostatischen Repulsion bei (Metwally 2004).

Die Emulsionsstabilität für erhitzte Proben steigt mit Glykosylierung bei allen untersuchten pH-Werten, wie aus der Tab. 4-5 (2. Teil) ersichtlich. Die hydrophoben Reste im Proteinmolekül sind während der Ausbildung der Emulsion in den Öltröpfchen verankert. Die Zuckerreste orientieren sich nach der Emulsionsausbildung in die wässrige Phase und beschleunigen die Bildung einer dicken sterischen Schicht um diese und unterdrücken dadurch die Koaleszenz der Öltröpfchen. Grund für die erhöhte Emulsionsstabilität könnte die erhöhte Oberflächenhydrophobizität sein, welche aus der Erhitzung resultiert. Wegen der erhöhten Flexibilität und Oberflächenhydrophobizität adsorbieren die denaturierten Proteine besser an der Öl-in-Wasser-Oberfläche, mit den „ausgestellten“ hydrophoben Resten in Kontakt mit der Ölphase.

Eine denaturierte niedrig glykosylierte Molkenproteinprobe (4,6 %  $\text{Lys}_{mod}$ ) zeigt nach Erhitzung geringere ES-Werte als vor Erhitzung. Dies überrascht, da nach Ibrahim et al. (1993) das  $\beta$ -Lg bei 80 °C signifikant bessere Emulgiereigenschaften zeigte. Bei dieser Arbeit trifft diese Aussage nur für die Emulgieraktivität, nicht jedoch für die Emulsionsstabilität zu. Allerdings wurde bei Ibrahim et al. (1993) keine Glykosylierung berücksichtigt.

### 4.3.3 Lichtmikroskopische Untersuchungen

Die lichtmikroskopischen Untersuchungen eignen sich zur Abschätzung der Tröpfchengröße des emulgiertes Fettes. Um die emulgierten Tröpfchen eindeutig zu identifizieren wird die Fettphase in den frisch hergestellten Emulsionen (siehe 4.3.2) mit Sudanschwarz angefärbt. Zur Größenabschätzung der Tröpfchen wird eine Neubauerkammer verwendet, in der ein feststehendes Raster mit definiertem Abstand einzelner Quadrate eingearbeitet ist. Auf dieser Grundlage kann ein Maßstab mithilfe der Bildbearbeitungssoftware ermittelt und zur Größenbestimmung eingesetzt werden.

Es zeichnet sich eine Abhängigkeit der Größenverteilung der dispersen Phase vom Glykosylierungsgrad des eingesetzten Proteins ab, wobei mit zunehmender Modifizierung das Verhältnis der kleinen Tröpfchen relativ zu den größeren erhöht wird. Durch die Abnahme der Anzahl großer Fetttröpfchen lassen sich positive Effekte hinsichtlich der Emulgierwir-

kung für modifiziertes Molkenprotein ableiten. Abb. 4-16 zeigt digitale Aufnahmen nach lichtmikroskopischer Untersuchung von Molkenprotein-stabilisierten Emulsionen. Abb. 4-17 zeigt eine Zusammenstellung der Tröpfchengrößenverteilung von Emulsionen mit glykosylierten Molkenproteinen.

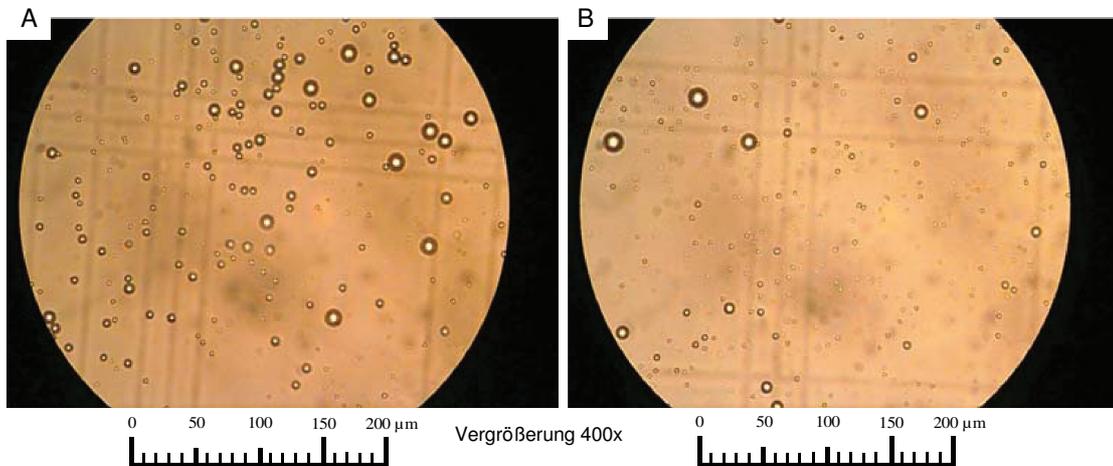
Zur Abschätzung der Verteilung der Tröpfchengröße wurde mittels Neubauer-Kammer ein Maßstab ermittelt und die Teilchendurchmesser in drei Klassen eingeteilt („klein“:  $d < 5 \mu\text{m}$ , „mittel“:  $5 < d < 10 \mu\text{m}$ , „groß“:  $d > 10 \mu\text{m}$ ). Mit steigender Glykosylierung kann beobachtet werden, dass der Anteil „großer“ und „mittlerer“ Tröpfchen zugunsten der „kleinen“ abnimmt. Nach Durchführung einer einfachen Varianzanalyse sowie eines *Tukey*-Tests ergeben sich für Molkenprotein-stabilisierte Emulsionen, signifikante Unterschiede innerhalb der Größenklassen „bis  $5 \mu\text{m}$ “ und „ $5 < d < 10 \mu\text{m}$ “. Für die Tröpfchenklasse „ $> 10 \mu\text{m}$ “ sind die Unterschiede nicht signifikant. Somit tritt eine Abhängigkeit zwischen der Glykosylierung und den emulgierenden Eigenschaften des Proteins zu Tage, da die Reduktion der Teilchendurchmesser der dispersen Phase eine Erhöhung der Emulsionsstabilität bedingt. Die Tröpfchengröße dient häufig als Qualitätsparameter zur Charakterisierung der emulgierenden Eigenschaften eingesetzter Proteine. Die Verkleinerung des Teilchendurchmessers ( $r$ ) der dispersen Phase bedeutet nach dem *Stoke*'schen Gesetz (4-2) ein höheres Maß an Stabilität der Emulsion gegenüber Aufrahmung bzw. Sedimentation, da sich die Geschwindigkeit ( $v$ ) direkt proportional zum Quadrat des Tröpfchenradius ( $r$ ) verhält.

$$v = \frac{2 \cdot r^2 \cdot g \cdot \Delta\rho}{9 \cdot \eta} \quad (4-2)$$

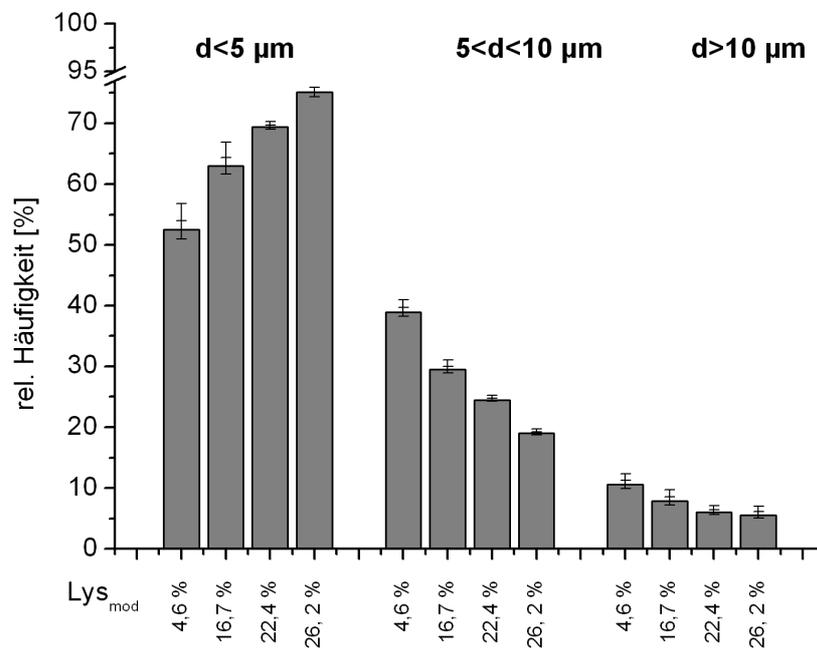
mit

$v$	Aufrahmungsgeschwindigkeit
$r$	Radius
$g$	Fallbeschleunigung ( $9,81 \text{ m/s}^2$ )
$\Delta\rho$	Dichteunterschied
$\eta$	Viskosität

Der Anteil an „kleinen“ Tröpfchen ist bei jeder Probe am größten. Dieser Effekt ist auf die Durchführung der Untersuchungen zurückzuführen, da durch die Mikroskopie bedingt nur eine Ebene des Präparates dargestellt werden kann. Deshalb werden die kugelförmigen



**Abb. 4-16:** Lichtmikroskopische Aufnahmen zum Vergleich der Tröpfchengröße zwischen Molkenprotein mit 4,6 %  $Lys_{mod}$  (A) und 16,7 %  $Lys_{mod}$  (B)



**Abb. 4-17:** Tröpfchengrößenverteilung der dispersen Phase der mit Molkenprotein stabilisierten Emulsionen, nach lichtmikroskopischer Untersuchung

Tröpfchen als Kreise abgebildet, wobei ein Querschnitt durch diese Kugel nicht zwangsläufig durch deren Mittelpunkt sondern an beliebiger Stelle erfolgt. Somit ist die Wahrscheinlichkeit am größten, dass die im Lichtmikroskop sichtbaren Kreisdurchmesser kleiner sind als die Durchmesser der kugelförmigen Tröpfchen. Hierbei ergibt sich eine Größenverteilung, die zu niedrigeren Durchmessern verschoben wird.

Die emulgierende Fähigkeit des höher modifizierten Molkenproteins (26,2 %  $Lys_{mod}$ ) entspricht etwa der Emulgierwirkung von Natriumcaseinat-stabilisierten Emulsionen (Ergebnisse nicht dargestellt).

#### 4.3.4 Zusammenfassung der Emulgierereigenschaften

Einen positiven Einfluss der Modifizierung von Molkenprotein mit Lactose auf die Emulgierereigenschaften zeigen die Ergebnisse der Oberflächenspannungsmessung und der daraus abgeleiteten kritischen Mizellbildungskonzentration (CMC). Hier ist eine deutliche Abnahme der CMC in Abhängigkeit von der Lysinblockierung festzustellen. Die modifizierten Proteine aggregieren bereits bei niedrigeren Konzentrationen zu Mizellen. Dieser Umstand korreliert mit einer Verbesserung der Grenzflächen- und damit der Emulgierereigenschaften. Nach Erhitzen der Molkenproteinlösungen kommt es zu keiner Beeinflussung der CMC für glykosylierte Molkenproteine. Der Einfluss der erhöhten Hydrophibizität durch die Denaturierung ist möglicherweise größer als der Einfluss der gebundenen Lactose. Der Abfall der CMC ist dabei umso größer je weniger das Protein glykosyliert wurde. Dies liegt an der verbesserten Thermostabilität und der damit verzögerten Denaturierung mit steigendem Glykosylierungsgrad.

Daneben kommt es ebenfalls zur Erhöhung der Emulgieraktivität sowohl vor als auch nach Erhitzen der glykosylierten Molkenproteinlösungen, wie mittels Trübungsmessung gezeigt werden konnte. Die Emulsionsstabilität variiert stark in Abhängigkeit des untersuchten pH-Bereiches und wird bei einem pH von 5,5 vor Erhitzung sowie in allen untersuchten pH-Bereichen nach Erhitzung mit steigender Glykosylierung erhöht.

Die Ergebnisse der Tröpfchengrößenverteilung der dispergierten Fettphase, bestimmt mittels lichtmikroskopischer Untersuchungen, bestätigt die bisher formulierten Aussagen hinsichtlich einer Verbesserung der emulgierenden Eigenschaften in Abhängigkeit von der Proteinmodifizierung. Mit steigender Lysinblockierung kommt es zur Abnahme der Tröpfchengröße. Über den gesamten Bereich des Glykosylierungsgrades kann eine stetige Verbesserung der Emulgierereigenschaften von Molkenproteinen beobachtet werden.

**Tab. 4-6:** Zusammenfassung der Auswirkungen der Glykosylierung auf die Emulgierereigenschaften der Molkenproteine

Methode	Tensiometrie CMC	Trübung EA	Trübung ES	Lichtmikroskopie
Ergebnis	verbesserte Grenzflächen- eigenschaften	erhöhte Emulgier- aktivität	pH-abhängig	reduzierte Fetttröpfchen- größe
Ergebnis nach Erhitzung	kein Effekt	erhöhte EA	erhöhte ES	- -

Die Ergebnisse der Bestimmung der CMC und die Tröpfchengrößenverteilung deuten darauf hin, dass dabei die Eigenschaften glykosylierter Molkenproteine bezogen auf die Fähigkeit Emulsionen zu bilden und zu stabilisieren, denen unbehandelter Natriumcaseinate ähneln. Somit werden die modifizierten Molkenproteine „casein-ähnlich“.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass eine nichtenzymatische Glykosylierung die emulgierenden Eigenschaften von Molkenproteinen beeinflusst, wie über Oberflächenspannungs- (mit CMC) und Trübungsmessung gezeigt werden konnte. Mikroskopische Untersuchungen bestätigen diese Ergebnisse über den gesamten Bereich des Modifizierungsgrades für frisch hergestellte Emulsionen. Ein Transfer der Ergebnisse bezüglich der Emulgierereigenschaften von Molkenprotein-Lösung (Tensiometrie) auf Molkenprotein-Emulsion (Trübung, Lichtmikroskopie) ist somit gelungen. Die Schlussfolgerung, dass die Emulgierereigenschaften mit zunehmender Glykosylierung von Molkenproteinen verbessert werden, steht im Einklang mit der Literatur ([Chevalier et al. 2001](#), [Nacka et al. 1998](#), [Groubet et al. 1999](#)).

#### 4.4 Nichtenzymatische Glykosylierung und ihre Auswirkungen im Lebensmittel (Beispiel: Schmelzkäsezubereitung)

Um die bisher gewonnenen Ergebnisse auf ein echtes Lebensmittel übertragen zu können, wurde eine standardisierte Modell-Schmelzkäsezubereitung im Labormaßstab hergestellt und der Einfluss der Zugabe von unterschiedlich nichtenzymatisch glykosylierten Molken-

**Tab. 4-7:** Rezeptur einer standardisierten Schmelzkäsezubereitung

Chester- käse	Wasser	Butter	Molken- pulver	Koch- salz	langkettiges Poly- phosphat	Trinatrium- ortho- phosphat	Natrium- citrat
40 %	31,1 %	13 %	12,8 %	0,7 %	1,6 %	0,4 %	0,4 %

proteinen auf das Endprodukt untersucht. Hierbei handelt es sich um ein komplexes Lebensmittel, welches entsprechend der verwendeten Rohware u. a. Protein, Milchfett und seine Fettbegleitstoffe sowie Lactose enthält. Die zugesetzten Schmelzsätze haben primär die Aufgabe, die Phasentrennung des Käses in Lipide, Eiweiß und Wasser zu verhindern, d. h. sie dienen der Stabilisierung der Emulsion Schmelzkäse. Schmelzkäse und -zubereitungen sind Milchprodukte mit dem höchsten Veredlungsgrad, bevor sie den Konsumenten erreichen. Daher sind sie lebensmittelwissenschaftlich eines der interessantesten, aber auf Grund ihrer Komplexität unvollständig erforschten Milchprodukte (Berger et al. 1989).

Zur Herstellung einer Modell-Schmelzkäsezubereitung werden die Zutaten (Käse, Wasser, Butter, Molkenpulver, Kochsalz und Schmelzsätze) miteinander homogenisiert und anschließend bei einer vorgewählten Zeit- und Temperaturführung geschmolzen (siehe 3.16). Hierbei handelt es sich um ein streichfähiges Produkt, das über mehrere Monate haltbar ist. Der Modell-Schmelzkäsezubereitung wurden 12,8 % Molkenpulver in unterschiedlichen Glykosylierungsstufen zugesetzt und jeweils dreimal eine Modell-Schmelzkäsezubereitung hergestellt. Tabelle 4-7 zeigt die Zusammensetzung dieses Lebensmittels. Um die Auswirkungen der nichtenzymatischen Glykosylierung in dieser Modell-Schmelzkäsezubereitung bestimmen zu können, müssen relativ hohe Mengen an Protein zugesetzt werden. Zur Charakterisierung des Einflusses der Lysinblockierung werden die Festigkeit, die Mikrostruktur und die sensorischen Eigenschaften des Endproduktes ermittelt.

#### 4.4.1 Festigkeit

Die Festigkeit der Schmelzkäsezubereitungen wurde jeweils mehrfach (5-7 mal) mittels Texture Analyser (TA) sowie mit einem Penetrometer (PNR) bestimmt. Die Auswertung der Ergebnisse zeigt, dass die Festigkeit der Schmelzkäsezubereitung nicht nur vom Glykosylierungsgrad beeinflusst wird, sondern ebenfalls starke Abhängigkeit von weiteren Parametern, wie Schmelztemperatur oder Alter der eingesetzten Rohware (Käse), erkennbar

waren.

Um für die Problemstellung relevante Ergebnisse zu erhalten, wurde eine systematische Planung der Untersuchungen zur Gewinnung von analytischen Daten durchgeführt. Ziel der statistischen Versuchsplanung und der anschließenden Auswertung ist es, ein empirisches Modell zu erhalten, das den Zusammenhang zwischen den untersuchten Einflussgrößen und den Zielgrößen quantitativ beschreibt. Bei der Optimierung bestand zunächst die Aufgabe, die Zielgröße und die zu variierenden Einflussgrößen in geeigneter Art und Weise festzulegen. Da für die Untersuchung aufgrund der großen Anzahl von Faktoren ein vollständig faktorieller Versuchsplan sich als zu aufwendig erwies, wurde nach einem Box-Behnken-Plan gearbeitet. Dies ist ein aus vollfaktoriellen  $3^n$ -Plänen durch Reduktionen abgeleiteter Versuchsplan. Hierfür sind 13 Versuche sowie zusätzlich zwei Wiederholungen des Zentralspunktes erforderlich. Die Verwendung von Box-Behnken-Versuchsplänen ermöglicht es weiterhin, nichtlineare Zusammenhänge zwischen den einzelnen Faktoren zu erkennen. Diese sind entscheidend, wenn die Lage eines Maximums oder eines Minimums gesucht wird. Die Auswahl der Faktor-Stufen-Kombinationen wurde so optimiert, dass Zwei-Faktor-Wechselwirkungen bestimmt werden können. Somit wird jede Kombinationsmöglichkeit zweier Faktoren berücksichtigt.

## 1. Studie

Als Zielgröße wurde die Festigkeit gewählt, als Einflussparameter die Schmelztemperatur, der Glykosylierungsgrad der eingesetzten Molkenproteine sowie das „Käsealter“, ausgedrückt als NPN-Wert (siehe Tab. 4-8). Der NPN-Wert (NPN: Nicht-Protein-Stickstoff) stellt den in Trichloressigsäure löslichen Stickstoff einer Käseprobe dar und steigt mit fortschreitender Proteolyse und damit mit dem Alter des Käses. Es sollte untersucht werden, ob und in welchem Maße die gewählten Parameter die Festigkeit der Schmelzkäsezubereitung beeinflussen.

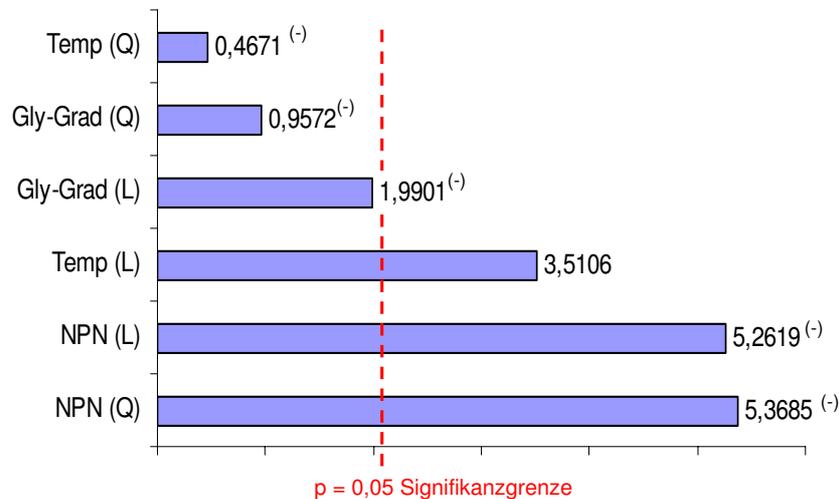
Die Auswertung des Box-Behnken-Plans erfolgte mittels multipler Varianzanalyse (analysis of variance, ANOVA), womit die Auswirkung verschiedener Faktoren auf die Mittelwerte der beobachteten Variablen untersucht werden konnten. Dabei ist vorrangig, ob die Einflussfaktoren einen statistisch signifikanten Effekt haben oder ob die Beobachtungen sich nur zufällig voneinander unterscheiden.

Die erzielten Ergebnisse zeigen, dass der NPN-Wert sowie die Schmelztemperatur einen signifikanten Einfluss auf die Festigkeit des Endproduktes haben, wie aus der Abb. 4-18

**Tab. 4-8:** Box-Behnken-Plan für drei Faktoren zur Bestimmung der Festigkeitseinflüsse. Schmelztemperatur, Glykosylierungsgrad ( $Lys_{mod}$ ) und NPN-Wert als Einflussparameter.

Versuch	Temperatur [°C]	$Lys_{mod}$ [%]	NPN [mg/g]
1	80	4,6	2,3
2	90	4,6	2,3
3	80	16,7	2,3
4	90	16,7	2,3
5	80	10,2	0,9
6	90	10,2	0,9
7	80	10,2	3,9
8	90	10,2	3,9
9	85	4,6	0,9
10	85	16,7	0,9
11	85	4,6	3,9
12	85	16,7	3,9
13	85	10,2	2,3
14	85	10,2	2,3
15	85	10,2	2,3

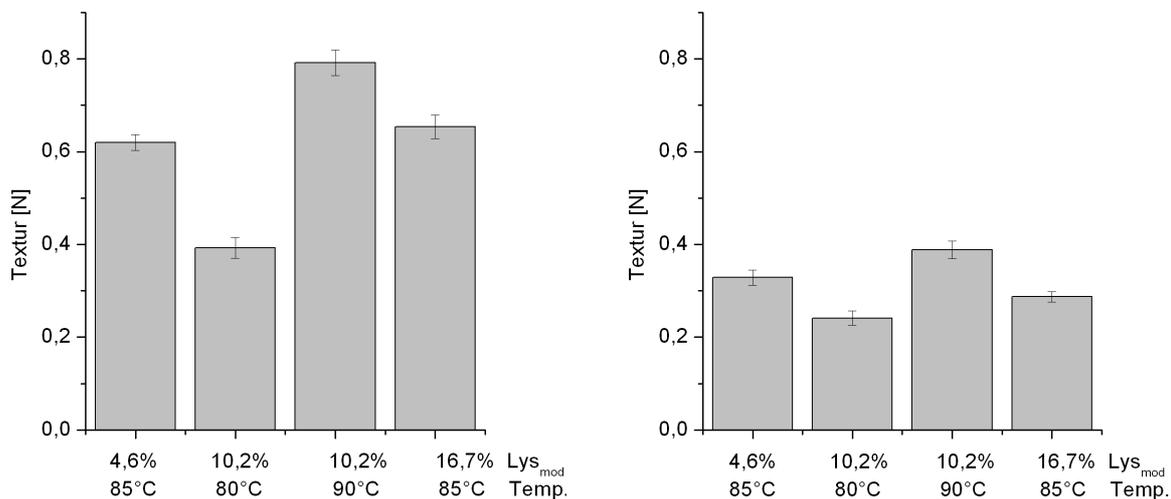
ersichtlich. Hierbei zeigt sich für das „Käsealter“ sowohl eine lineare als auch quadratische Abhängigkeit. Das heißt, dass sich die signifikanten Zusammenhänge für die Einzelwerte mittels quadratischer sowie linearer Funktion beschreiben lassen. Diese hochsignifikante Abhängigkeit bedeutet, dass mit steigendem NPN-Wert (= Alter des eingesetzten Käses) die Festigkeit negativ beeinflusst wird, d. h. das Endprodukt wird weicher. Für die Schmelztemperatur zeigte sich dagegen nur eine lineare Abhängigkeit. Der Glykosylierungsgrad zeigt einen Einfluss, der allerdings unter der Signifikanzgrenze liegt. Die zweidimensionale Darstellung der die Festigkeit (bestimmt mittels TA) beeinflussenden Faktoren zeigt nochmals die Effekte des NPN-Wertes und der Temperatur für die drei Glykosylierungsgrade (Abb. 4-19). NPN zeigt den größten Einfluss auf die Festigkeit. Zu erkennen ist tendenziell eine Erweichung des Endproduktes (negative Festigkeit) mit steigendem NPN-Wert des Käses in allen untersuchten Temperaturbereichen sowie Glykosylierungsgraden. Bei einem „jungen Käse“ (NPN: 0,9 mg/g) ist die Temperatur die entscheidendste Einflussgröße. Beim „mit-



**Abb. 4-18:** Pareto diagramm des Box-Behnken-Versuches; Zielgröße: Festigkeit (Temp: Temperatur, Gly-Grad: Glykosylierungsgrad, (L) linearer Zusammenhang, (Q) quadratischer Zusammenhang und (-) negative Festigkeit

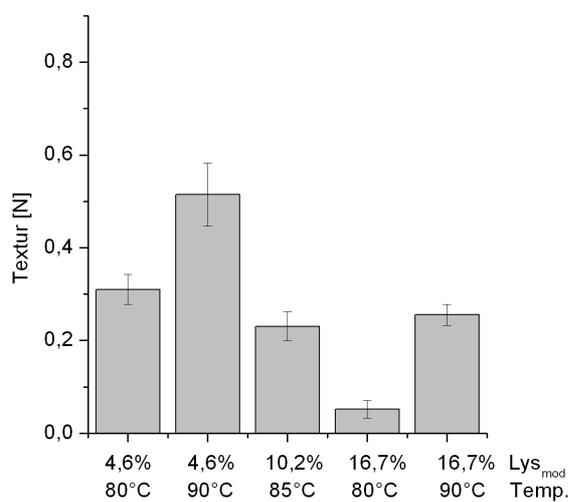
telalten Käse“ (NPN: 2,3 mg/g) handelt es sich möglicherweise um ein stabiles Netzwerk, in dem stärkste Beeinflussung durch die Glykosylierung eine Rolle spielt. Ein „alter Käse“ (NPN: 3,9 mg/g) wird weder von der Schmelztemperatur noch vom Glykosylierungsgrad beeinflusst, da hier wegen starker Proteolyse die erwähnten Auswirkungen unbedeutend werden. Ebenfalls ist zu erkennen, dass steigende Schmelztemperatur zur Erhöhung der Festigkeit der Schmelzkäsezubereitung führt. Für den Glykosylierungsgrad zeigte sich nur tendenziell eine (lineare) Abhängigkeit. Der Einfluss auf die Zielgröße ist vorhanden, allerdings ist dieser keinesfalls signifikant. Vor allem bei einem mittleren NPN-Wert (2,3 mg/g) wird der Einfluss der Lysinblockierung sichtbar (Abb. 4-19 (c)). Hier wird die Tendenz erkennbar, dass die steigende Lysinmodifizierung einen erweichenden Effekt hat.

Eine dreidimensionale Darstellung der Zusammenhänge zwischen der Festigkeit und der Schmelztemperatur sowie der Lysinblockierung zeigt Abb. 4-20. Auch hier ist eine eindeutige Erhöhung der Festigkeit mit steigender Temperatur zu erkennen. Ebenfalls ist ein erweichender Effekt bei zunehmender Glykosylierung sichtbar.



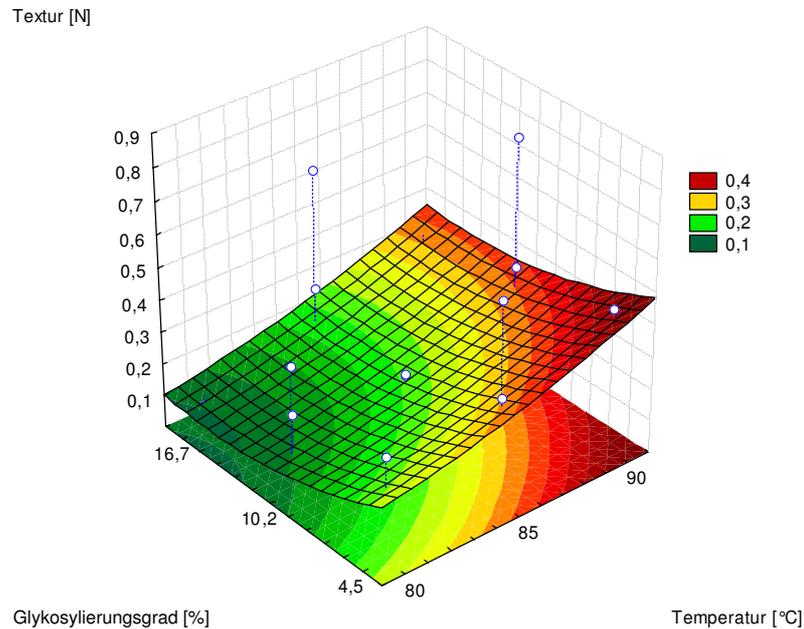
(a) NPN = 0,9 mg/g

(b) NPN = 3,9 mg/g



(c) NPN = 2,3 mg/g

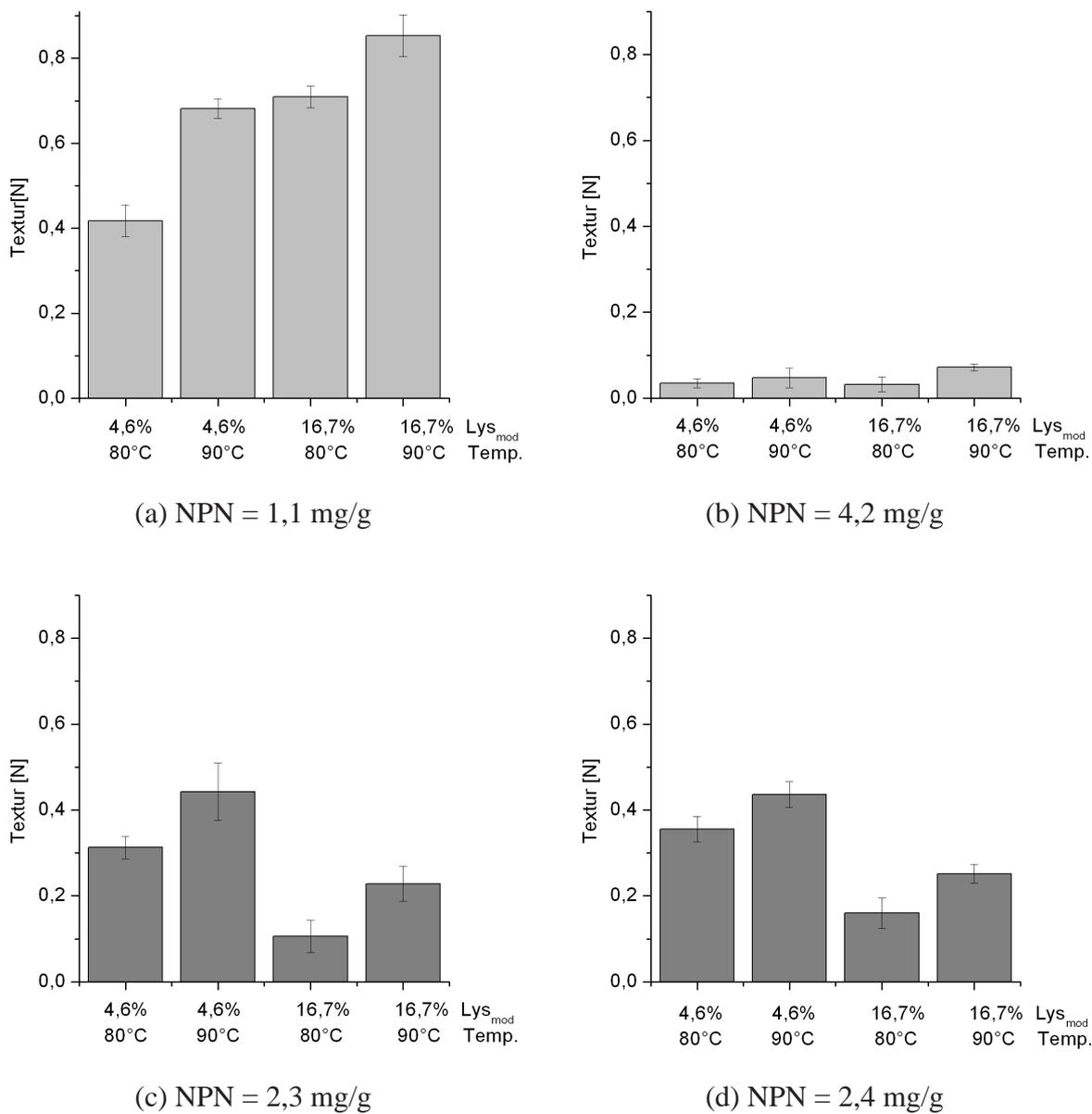
**Abb. 4-19:** Darstellung der Auswirkungen der Einflussgrößen (Lys<sub>mod</sub>, NPN, Temperatur) auf die Zielgröße Festigkeit; bestimmt mittels Texture Analyser



**Abb. 4-20:** Dreidimensionale Darstellung der Zusammenhänge Festigkeit-Schmelztemperatur-Glykosylierungsgrad

## 2. Studie

Zum Nachweis der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse wurden die Box-Behnken-Versuche in reduziertem Umfang abermals durchgeführt. In der 2. Studie sollte der Einfluss der Glykosylierung auf die Festigkeit (erweichender Effekt) bei einem mittleren NPN-Wert wiederholt und gegebenenfalls bestätigt werden. Neben dem mittleren „Käsealter“ als Parameter sollten die beiden Eckdatenpunkte („junger“ und „gereifter“ Käse) ebenfalls mitgeführt werden. Für dieses Experiment wurden Schmelzkäsezubereitungen mit jeweils zwei Glykosylierungsgraden der Molkenproteine ( $Lys_{mod}$  4,6 % und 16,7 %) und bei zwei Schmelztemperaturen (80 und 90 °C) hergestellt. Um den Einfluss des Käsealters noch genauer zu verifizieren wurde die Schmelzkäsezubereitung unter Zusatz von Käse mit vier unterschiedlichen NPN-Werten (NPN: 1,1; 2,3; 2,4 und 4,2 mg/g) produziert. Bei allen Proben wurde nach ihrer Herstellung die Festigkeit mittels Texture Analyser (Abb. 4-21) sowie Penetrometer bestimmt. Aus der Abbildung 4-21 wird sichtbar, dass es im mittleren NPN-Bereich (2,3 mg/g und 2,4 mg/g) tendenziell zu einem erweichenden Effekt (= verringerter Wert) mit Glykosylierung für beide Schmelztemperaturen kommt. Bei einem jungen Käse (NPN: 1,1 mg/g) ist die Temperatur, bei höheren NPN-Werten (3,9 mg/g) die Proteolyse die ent-



**Abb. 4-21:** Festigkeit in Abhängigkeit von Schmelztemperatur und von Lysinmodifizierung für Schmelzkäsezubereitungen mit unterschiedlichen NPN-Werten [mg/g]

scheidende Einflussgröße.

Aus der Literatur ist ebenfalls bekannt, dass der Proteolysegrad des eingesetzten Käses einen großen Einfluss auf die rheologischen Eigenschaften des Schmelzkäses hat und zur Erweichung der Produkte mit steigender Proteolyse führt (Caric und Kaláb 1993, Piska und Stetina 2004, Mulsow et al. 2007). Die Herstellungstemperatur wird ebenfalls als Einflussfaktor beschrieben, wobei es mit Erhöhung der Prozesstemperatur zur Erhöhung der Festigkeit kommt (Lee et al. 1981, Kaláb et al. 1987, Dimitreli und Thomareis 2004). Der Einfluss des Glykosylierungsgrades wurde bisher in der Literatur noch nicht beschrieben.

Bei der Betrachtung der Ergebnisse wird deutlich, dass kleinste Änderungen bei der Auswahl der Rohware (Molkenpulver, Käse) sowie der Herstellungsbedingungen (Schmelztemperatur) einen signifikanten Einfluss auf die Festigkeit des Endproduktes haben.

#### 4.4.2 Mikrostruktur

Zur Überprüfung des Einflusses der Glykosylierung auf die Mikrostruktur im Lebensmittel wurden elektronenmikroskopische Untersuchungen durchgeführt. Sowohl Raster- als auch Transmissionselektronenmikroskopie werden in der Forschung zur Erfassung der Mikrostruktur des Lebensmittels Schmelzkäse verwendet. Folgende Studien betrachten generell die Verteilung der in einer kontinuierlichen Proteinmatrix eingebetteten Fettkugeln im Schmelzkäse: Heertje et al. (1981), Lee et al. (1981), Kaláb et al. (1987), Klostermeyer und Buchheim (1988), Berger et al. (1989), Savello et al. (1989), Kaláb (1995), Marchesseau et al. (1997).

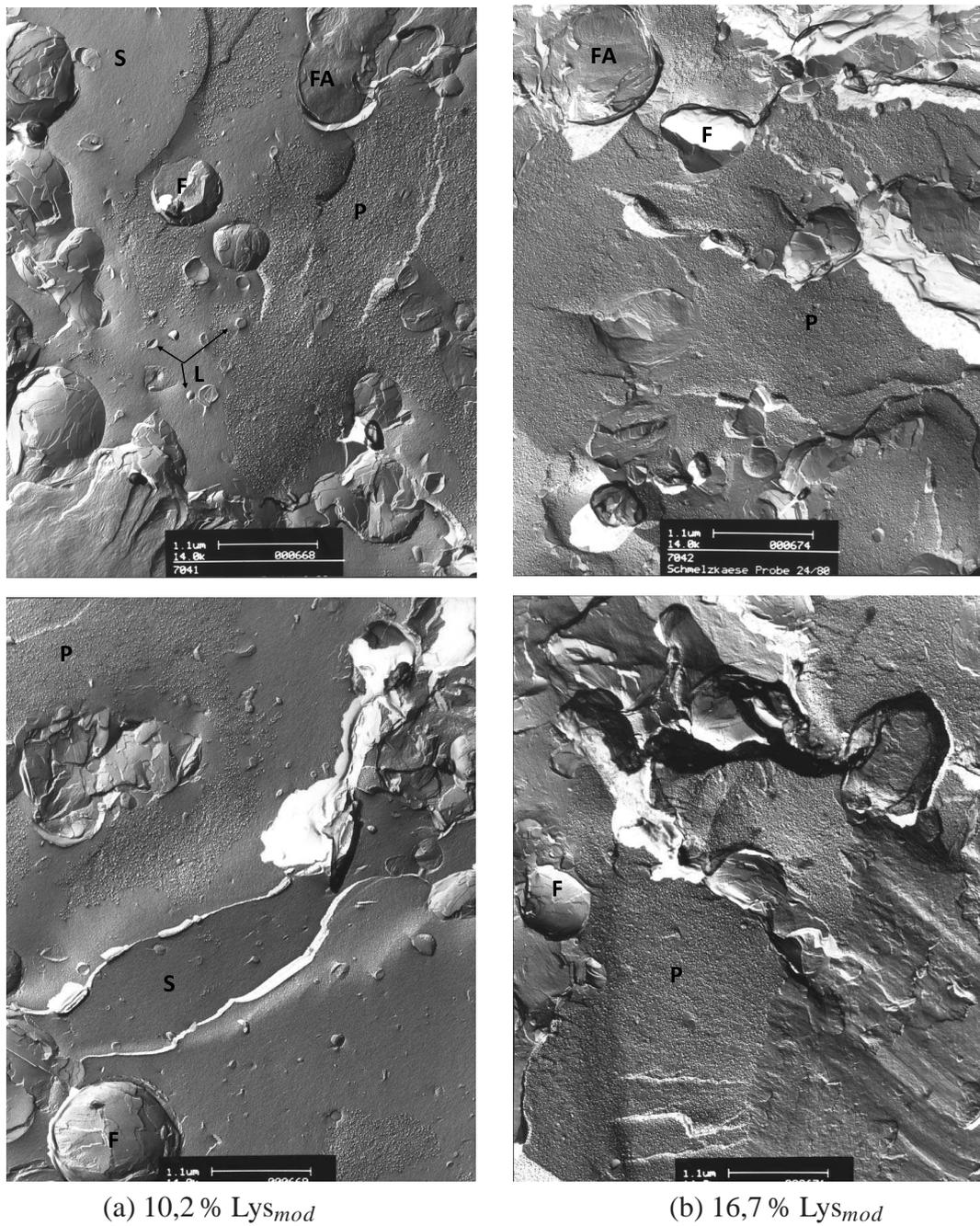
In der vorliegenden Arbeit wurde die Rasterelektronenmikroskopie (REM) sowie die Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) nach Gefrierbruch verwendet. Mit beiden Methoden wurde die Mikrostruktur der Modell-Schmelzkäsezubereitungen nach Zusatz unterschiedlich glykosylierter Molkenpulver untersucht. Hierbei sollten vor allem die Auswirkungen der Lysinblockierung auf die Proteinmatrix im Lebensmittel betrachtet werden. Um zu gewährleisten, dass die gezogene Probe das Endprodukt in seiner Gesamtheit repräsentiert, wurde eine Dreifachuntersuchung durchgeführt sowie zusätzlich jede Probe an mehreren Stellen des Lebensmittels analysiert. Die Festigkeitsunterschiede, welche in Abhängigkeit des Glykosylierungsgrades festgestellt wurden (siehe 4.4.1) waren die Auswahlkriterien für die untersuchten Proben.

Mit Hilfe von Literaturangaben und bisherigen Erfahrungen am Institut für Physikalische Chemie der Technischen Universität Dresden bzw. der Bundesforschungsanstalt für Ernährung und Lebensmittel (BfEL) in Kiel konnten in der sehr aufwändigen REM (Abb. 4-24, 4-25) bzw. TEM-Bildanalyse (Abb. 4-22, 4-23) die für das Gefüge von Schmelzkäsezubereitungen wichtigen Strukturen (Fett und Protein) erkannt werden. Dabei entspricht die TEM-Aufnahme 4-22 der REM-Aufnahme 4-24 und die TEM-Aufnahme 4-23 der REM-Aufnahme 4-25. Mit beiden Methoden ist ein Proteingefüge mit darin eingebetteten Fettkugeln bzw. Fettaggregaten zu erkennen. Mittels TEM ist es möglich eine Abbildung des Ist-Zustandes darzustellen, da die Lebensmittelprobe nicht verändert wird. Die Auflösung beträgt bei dieser Technik 0,1 nm.

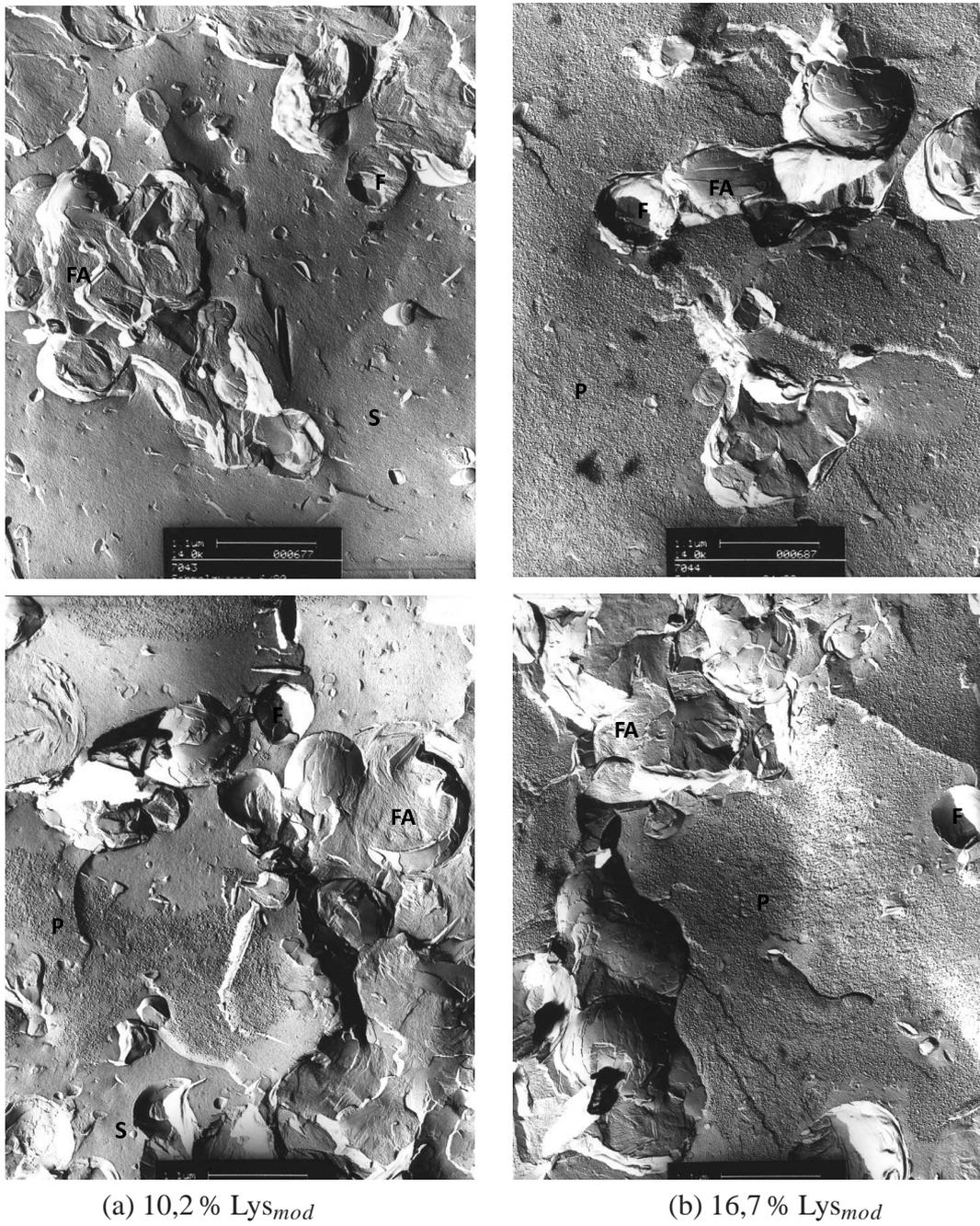
Die erste TEM-Abbildung (Abb. 4-22) stellt die Mikrostruktur zweier Standard-Modellschmelzkäsezubereitungen dar, die einerseits mit einem Molkenpulver mit 10,2 %  $Lys_{mod}$  ((a), zwei Aufnahmen untereinander) sowie andererseits mit 16,7 %  $Lys_{mod}$  ((b), zwei Aufnahmen untereinander) unter gleichen Bedingungen hergestellt wurden.

Zwischen den Proben mit den Glykosylierungsgraden von 10,2 % bzw. 16,7 % können Unterschiede erkannt werden. Während die mit dem niedrig glykosylierten Protein hergestellte Schmelzkäsezubereitung in der Nähe des Fettes große Bereiche zeigt, in denen keine Proteinmatrix zu finden ist (Serum), gibt es diese Bereiche bei den 16,7 %-Proben kaum. Daraus kann abgeleitet werden, dass mit steigender Glykosylierung die Homogenität der Proteinmatrix zunimmt. Dieser Effekt ist unabhängig von der gewählten Schmelztemperatur. Die vorhandenen Serumbereiche bei niedrig glykosylierten Proben sind sowohl bei der Herstellungstemperatur von 80 °C (siehe Abb. 4-22) als auch 90 °C (siehe Abb. 4-23) eindeutig zu erkennen. Vermutlich wird hier die Emulgatorwirkung der Proteine mit steigender Lysinmodifizierung deutlich. Während für die niedrig modifizierten Proteine das Emulgatorvermögen noch nicht ausreicht, um die Phasen miteinander zu verbinden (Serumbereiche vorhanden), so wird das mit steigender Glykosylierung aufgehoben. Die Emulgatorwirkung der höher glykosylierten Proteine zeigt sich durch die homogene Verteilung der Proteinmatrix, ohne Unterbrechung durch die Serumbereiche. Somit hat die Proteinmodifizierung positive Auswirkungen auf gewünschte physikalische Eigenschaften, wie Emulgierwirkung sowie Homogenität der Proteinmatrix der Schmelzkäsezubereitung, zur Folge.

Mit Hilfe der zweiten Methode (Rasterelektronenmikroskopie) sollten die mittels TEM getroffenen Aussagen überprüft sowie bestätigt werden. Da bei der Probenaufarbeitung die



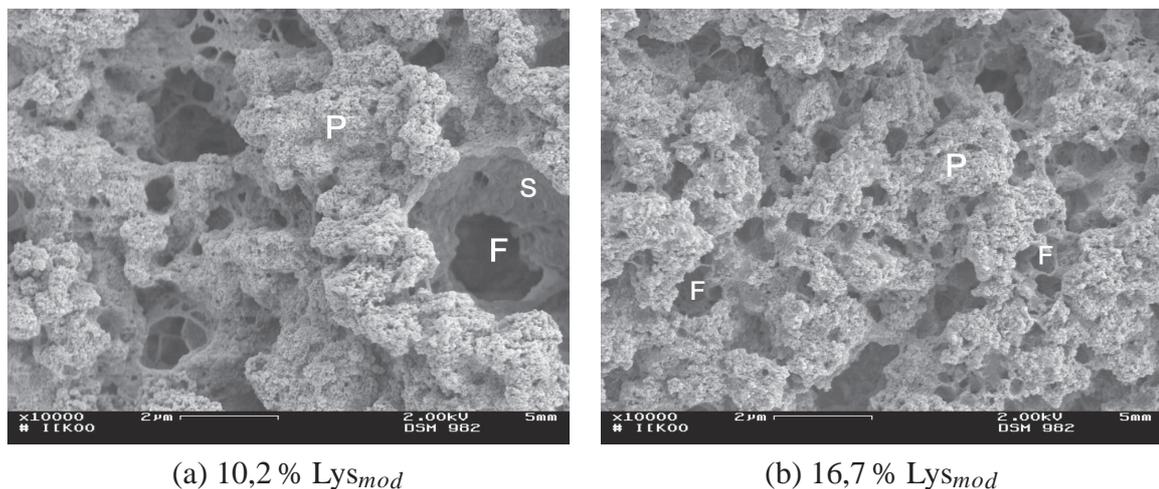
**Abb. 4-22:** Transmissionsmikroskopische Aufnahmen von zwei Schmelzkäsezubereitungen, hergestellt bei 80 °C unter Einsatz von Molkenprotein (a) mit je 10,2 %  $Lys_{mod}$  (Festigkeit = 0,3 N) (b) mit je 16,7 %  $Lys_{mod}$  (Festigkeit = 0,1 N). (S: Serum, P: Proteinmatrix, F: Fettkugel, FA: Fettaggregat, L: liposomartige Fetteilchen)



**Abb. 4-23:** Transmissionmikroskopische Aufnahmen von zwei Schmelzkäsezubereitungen, hergestellt bei 90 °C unter Einsatz von Molkenprotein (a) mit je 10,2 %  $Lys_{mod}$  (Festigkeit = 0,45 N) (b) mit je 16,7 %  $Lys_{mod}$  (Festigkeit = 0,23 N). (S: Serum, P: Proteinmatrix, F: Fettkugel, FA: Fettaggregat)

Proben entwässert und entfettet wurden, können in REM-Aufnahmen die Fettkugeln nur als Hohlräume dargestellt werden (siehe Abb. 4-24, 4-25). Demzufolge stellt die REM-Analyse keine Abbildung des Ist-Zustands dar, lässt jedoch Rückschlüsse auf den Ist-Zustand zu. Es können Aussagen über das Struktur-Netzwerk sowie den Zustand nach Behandlung (Entwässerung, Entfettung) getroffen werden. Die Auflösung beträgt 1 nm.

Die Abbildung 4-24 stellt die Mikrostruktur zweier Standard-Modellschmelzkäsezubereitungen dar, die einerseits mit einem Molkenpulver mit 10,2 %  $Lys_{mod}$  (a) sowie andererseits mit 16,7 %  $Lys_{mod}$  (b) unter gleichen Bedingungen hergestellt wurden. Somit ist diese Aufnahme direkt mit der Abb. 4-22 vergleichbar. Ebenfalls mittels REM konnten die Serumbereiche in niedrig glykosylierten Proben identifiziert werden. Diese sind bei höherer Modifizierung nicht mehr erkennbar. Zudem ist auffallend, dass die Fettkugeln mit steigender Glykosylierung kleiner werden, wie schon mittels Lichtmikroskopie beobachtet. Damit kann bestätigt werden, dass mit Fortschreiten der „frühen“ Maillard-Reaktion die Emulgatorwirkung der eingesetzten Proteine verstärkt wird. Die Modell-Schmelzkäsezubereitung mit 16,7 %  $Lys_{mod}$  (Abb. 4-24 (b)) besitzt eine homogenere Proteinmatrix, weniger große Fettkugeln sowie ein gleichmäßigere schaumartige Proteinstruktur im Vergleich zu Abb. 4-24 (a). Die Reduktion der Fettkugelgröße sowie verbesserte Homogenität der Proteinmatrix mit steigender Glykosylierung ist ebenfalls bei höheren Herstellungstemperaturen (90 °C) der Schmelzkäsezubereitung zu erkennen (Abb. 4-25).



**Abb. 4-24:** Rasterelektronische Aufnahmen von zwei Schmelzkäsezubereitungen, hergestellt bei 80 °C unter Einsatz von Molkenprotein (a) mit 10,2 %  $Lys_{mod}$ , (b) mit 16,7 %  $Lys_{mod}$  (S: Serum, P: Proteinmatrix, F: Fettkugel)



Die Festigkeit des Endproduktes (Modell-Schmelzkäsezubereitung) wird von der nichtenzymatischen Glykosylierung der eingesetzten Molkenproteine beeinflusst. Es kommt tendenziell zur „Erweichung“ der Schmelzkäsetextur mit steigender Lysinblockierung, wenn gleichzeitig ein „mittelalter“ Käse bei der Herstellung eingesetzt wird. Einen signifikanten Einfluss auf die Endfestigkeit des Produktes haben zusätzlich die gewählte Schmelztemperatur sowie der Proteolysegrad der eingesetzten Rohware.

Die mittels Elektronenmikroskopie dokumentierte Lebensmittelmikrostruktur zeigt eine verbesserte Homogenität der Proteinmatrix mit steigender Glykosylierung. Zusätzlich konnte die Abnahme der Fettkugelgröße mit Lysinblockierung neben der Lichtmikroskopie auch mit Elektronenmikroskopie dargestellt werden. Die beiden Phänomene weisen auf verbesserte Emulgiereigenschaften der eingesetzten Molkenproteine mit steigender Glykosylierung hin.

## 4.5 Orientierende Untersuchungen zur Aromabindung in Abhängigkeit vom Glykosylierungsgrad

Der Arbeit liegt die Hypothese zugrunde, dass die nichtenzymatische Glykosylierung von Proteinen deren Oberflächeneigenschaften und damit eventuell auch die Bindung von Aromastoffen beeinflusst. Demzufolge sollte der Einfluss der Lysinmodifizierung in Modell-Schmelzkäsezubereitungen und damit gegebenenfalls eine in Abhängigkeit von der Glykosylierung veränderte Aromastoffwahrnehmung mit geeigneten Methoden erfasst werden. Zusätzlich sollte der Einfluss der Glykosylierung auf die Geruchsschwellenwerte einzelner Aromastoffe in Molkenproteinlösungen überprüft werden.

### 4.5.1 Beschreibende Sensorik

Für die sensorische Studie wurden Modell-Schmelzkäsezubereitungen gewählt, denen Molkenpulver mit unterschiedlichen Glykosylierungsgraden zugesetzt wurden und diese zusätzlich bei zwei unterschiedlichen Temperaturen hergestellt worden sind. In einem Triangeltest (Dreieckstest) wurden die Lebensmittelproben von 16-20 Probanden (siehe 3.22) sensorisch beurteilt. Bei dem gewählten Test sollte aus drei Proben, von denen zwei identisch und eine abweichend war, die abweichende Probe erkannt werden. Anschließend sollte die durch die Probanden bevorzugte Probe und eine Begründung angegeben werden (zusätzliche subjek-

**Tab. 4-9:** Triangeltest zur Bestimmung der abweichenden Probe (Kriterium:  $Lys_{mod}$  bzw. Herstellungstemperatur); \* Probe von Modellschmelzkäsezubereitung unter Einsatz von Molkenproteinpulvern mit unterschiedlichem Glykosylierungsgraden (=  $Lys_{mod}$ ).  $\alpha > 0,05$  nicht signifikant;  $\alpha = 0,01$  hoch signifikant;  $\alpha = 0,001$  sehr hoch signifikant

Probe* $Lys_{mod}$ [%]	Herstellungs- temperatur [°C]	abweichende Probe erkannt	Signifikanz- niveau	Bevorzugung höher glyk. Probe
4,6 vs. 16,7	80 / 80	75 %	$\alpha = 0,01$	88 %
4,6 vs. 11,5	90 / 90	88 %	$\alpha = 0,01$	58 %
4,6 vs. 10,2	90 / 90	81 %	$\alpha = 0,01$	54 %
10,2 vs. 10,2	80 / 90	94 %	$\alpha = 0,001$	-
13,0 vs. 16,7	90 / 90	50 %	$\alpha > 0,05$	75 %
16,7 vs. 16,7	80 / 90	63 %	$\alpha = 0,01$	-

tive Entscheidung).

Die Ergebnisse dieser sensorischen Einschätzung sind in der Tab. 4-9 zusammengestellt. Hier wird deutlich, dass fünf von sechs sensorischen Studien signifikante Unterschiede bei den Kriterien Glykosylierungsgrad bzw. Herstellungstemperatur zeigen. Bei jedem Probenatz wurde die abweichende Probe erkannt sowie zusätzlich die höher glykosylierte Schmelzkäsezubereitung, sofern diese angeboten wurde, bevorzugt. In der charakterisierenden Beurteilung wurde die gewählte Probe gegenüber der Vergleichsprobe folgendermaßen beschrieben: weicher, cremiger, bessere Konsistenz, kräftiger im Geschmack, käseartiger, intensiverer Geruch, gutes Mundgefühl.

Nach der Auswertung der Ergebnisse, die eindeutig die veränderten sensorischen Eigenschaften nach der Zugabe von glykosylierten Proteinen zur Schmelzkäsezubereitung zeigen, stellte sich die Frage, ob eine unterschiedliche Aromawahrnehmung ebenfalls in Molkenproteinlösungen abhängig vom Glykosylierungsgrad ist.

#### 4.5.2 Studien zur Interaktion der Molkenproteine mit Aromastoffen

Zur Untersuchung der Beeinflussung der Aromawahrnehmung in Abhängigkeit unterschiedlich glykosylierter Molkenproteine in einem vereinfachten Modell wurden Untersuchungen

**Tab. 4-10:** Literaturdaten zu Geruchsschwellen- und Hydrophobizitätswerten von ausgewählten Aromastoffen

Aromastoff	Summenformel	Geruchsschwelle in Wasser *	Hydrophobizität [logP <sub>O/W</sub> ] **
Diacetyl (2,3-Butandion)	C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub>	17 ppm	- 1,4
Furaneol (2,5-Dimethyl-4-hydroxy-3(2H)-furanon)	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	0,03 ppb	1,1
2-Hexanon (Butylmethylketon)	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O	0,93 ppm	1,4
Dimethyltrisulfid	C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> S <sub>3</sub>	0,01 ppm	2,2
δ-Decalacton	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O <sub>2</sub>	0,1 ppm	2,4

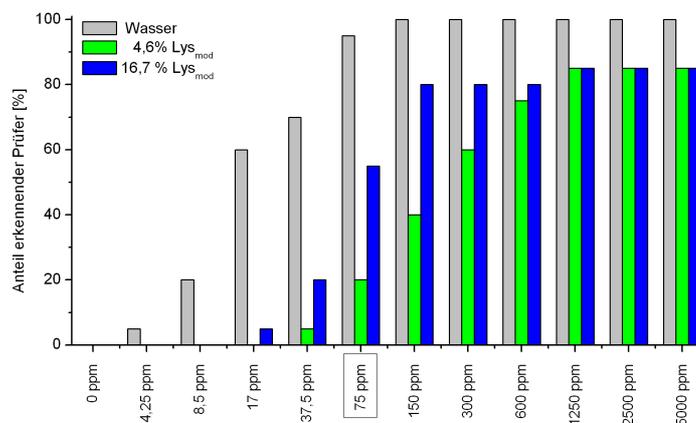
\* nach Belitz et al. (2001)

\*\* bestimmt mit ChemDraw Ultra 6.0.1

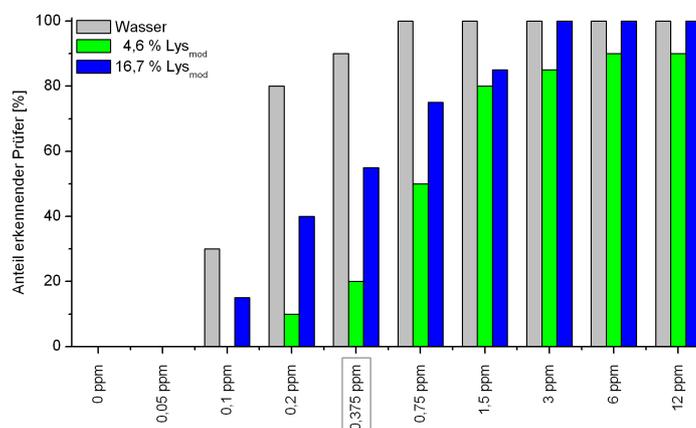
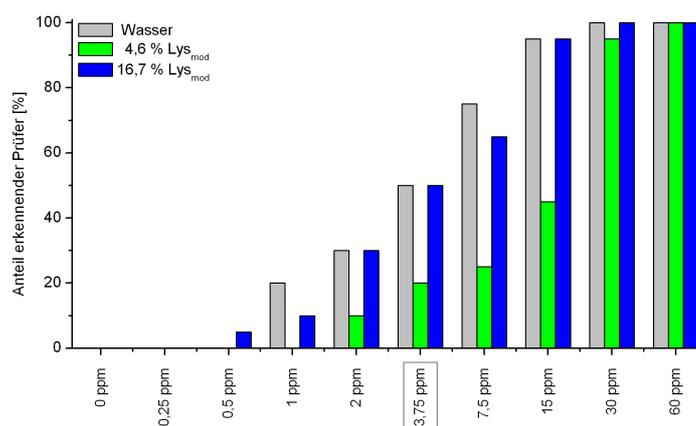
zur Interaktion der Molkenproteine mit ausgewählten Aromastoffen in Proteinlösungen mit unterschiedlicher Glykosylierung durchgeführt. In diesen orientierenden Studien soll geklärt werden, ob sich der Glykosylierungsgrad auf die Schwellenwerte einzelne Aromastoffe auswirkt. Dementsprechend sind fünf natürlich in Cheddar-Käse vorkommende Aromastoffe (Diacetyl, 2-Hexanon, δ-Decalacton, Dimethyltrisulfid, Furaneol) ausgewählt worden. Mit den entsprechenden Aromastoffstandards erfolgte die Bestimmung der Geruchsschwellenwerte sowohl in Wasser als auch in Lösungen mit unterschiedlich glykosylierten Molkenproteinen. Die Tabelle 4-10 informiert über die aus der Literatur entnommenen Geruchsschwellenwerte der ausgewählten Aromastoffe in Wasser.

Die Abbildungen 4-26 und 4-27 geben einen Überblick über die gefundenen Schwellenwerte am Beispiel von 2-Hexanon, Diacetyl, δ-Decalacton und Dimethyltrisulfid (DMTS). Die Konzentration einer Verbindung, die gerade noch zur Erkennung ihres Geruches ausreicht, bezeichnet man als Geruchsschwelle (Erkennungsschwelle). Anhand der Schwellenkonzentration kann die Aromawirksamkeit von Inhaltsstoffen verglichen werden.

Die Schwellenwerte der Aromastoffe in Wasser stimmen mit den in der Literatur angegebenen größtenteils überein. Der Wert für Furaneol wird bei den Probanden nicht erreicht und liegt – verglichen mit Literaturwerten – um das doppelte höher (0,06 ppm). Die Ge-

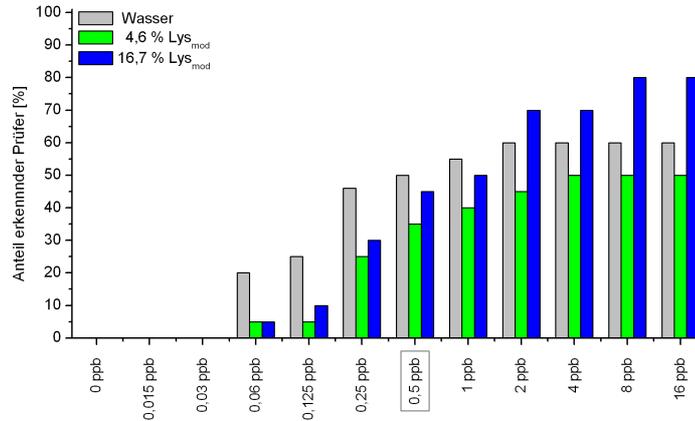


(a) Diacetyl

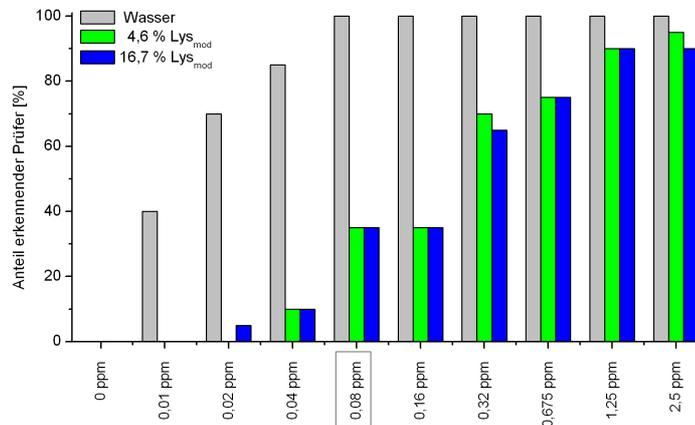
(b)  $\delta$ -Decalacton

(c) 2-Hexanon

**Abb. 4-26:** Geruchsschwellenwerte für (a) Diacetyl, (b)  $\delta$ -Decalacton und (c) 2-Hexanon in Wasser (grau), 4,6% Lys<sub>mod</sub> (grün) und 16,7% Lys<sub>mod</sub> (blau) Molkenproteinlösung.



(a) Furanol



(b) Dimethyltrisulfid

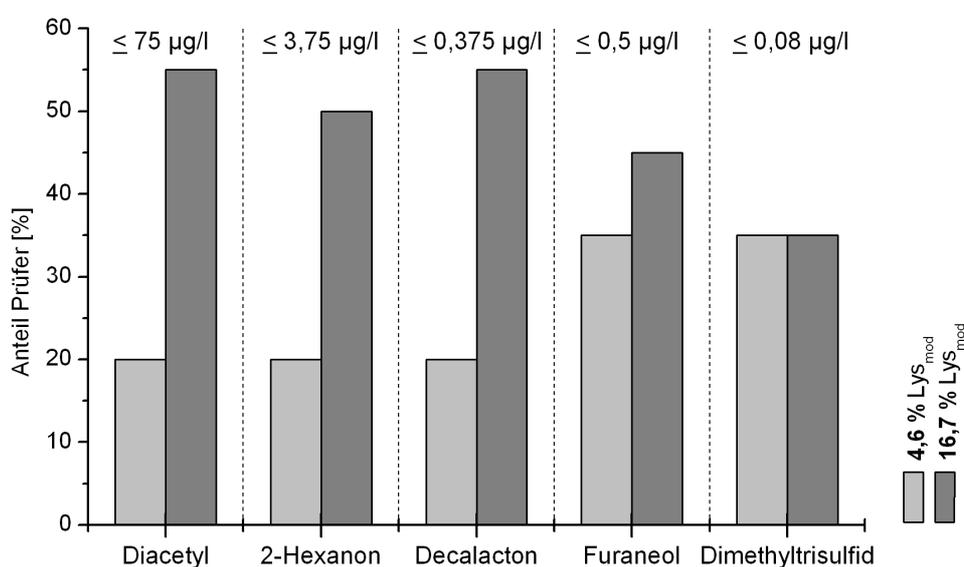
**Abb. 4-27:** Geruchsschwellenwerte für (a) Furanol und (b) Dimethyltrisulfid in Wasser (grau), 4,6 %  $Lys_{mod}$  (grün) und 16,7 %  $Lys_{mod}$  (blau) Molkenproteinlösung.

Geruchsschwellenwerte aus der Literatur werden mit den Methoden der Gaschromatographie / Olfaktometrie bestimmt und können mit den hier ermittelten nicht immer verglichen werden.

Anhand der Beispiele (Abb. 4-26 und 4-27) wird deutlich, dass sich Unterschiede in der Aromastoffwahrnehmung Wasser zu Molkenproteinlösungen ergeben. Während die Wahrnehmung eines Aromastoffes im Wasser von den Probanden relativ früh erfolgt, wird dieser in Molkenproteinlösung verzögert erkannt. Allgemein liegen die Geruchsschwellen der untersuchten Aromastoffe in beiden Molkenproteinlösungen über den Werten in Wasser und sind mit der Bindung an das Protein (Guichard und Langourieux 2000) bzw. durch den

Eigengeruch der Molkenlösungen zu erklären. Die Schwellenwerte ändern sich nach Zugabe von nativem bzw. glykosyliertem Molkenprotein und zeigen einen Trend zu niedrigeren Geruchsschwellenwerten mit höherer Lysinmodifizierung für die Aromastoffe Diacetyl, 2-Hexanon und  $\delta$ -Decalacton (siehe Abb. 4-26) sowie Furaneol (Abb. 4-27 (a)). Die Schwellenwerte des Dimethyltrisulfids (Abb. 4-27 (b)) zeigen keine Abhängigkeit von der Glykosylierung. Durch einen gesonderten Test wurden reine Molkenproteinlösungen in einer Dreiecksprüfung untersucht, wobei die Geruchsunterschiede zwischen den Molkenlösungen mit unterschiedlich modifizierten Proteinen ausgeschlossen werden konnten. Dementsprechend sind alle Ergebnisse nur auf den Glykosylierungsgrad der Molkenproteine zurückzuführen.

Die Zusammenstellung der Geruchsschwellenwerte für die ausgewählten Standardsubstanzen der Aromastoffe in Molkenlösungen mit 4,6 %  $\text{Lys}_{\text{mod}}$  sowie 16,7 %  $\text{Lys}_{\text{mod}}$  ist aus der Abb. 4-28 ersichtlich. Dargestellt sind jeweils Geruchsschwellenwerte, bei denen die Aromastoffe eindeutig durch mindestens 20 % der Prüfer (= 4 Probanden) in beiden Testlösungen erkannt wurden. Es wird deutlich, dass die Geruchsschwellenwerte mit steigendem Glykosylierungsgrad tendenziell abnehmen. Wird beispielsweise beim  $\delta$ -Decalacton



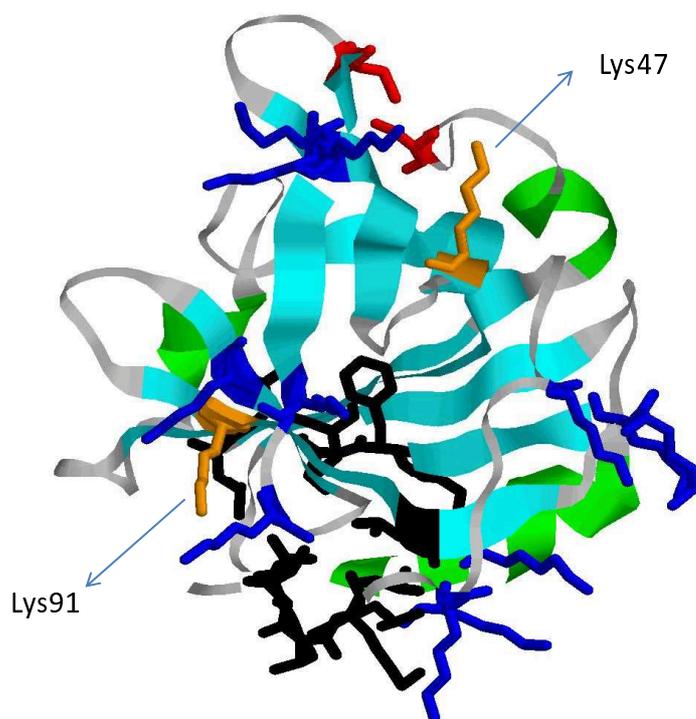
**Abb. 4-28:** Zusammenstellung der Geruchsschwellenwerte in Molkenproteinlösungen mit unterschiedlichen Glykosylierungsgrad

ein Geruchsschwellenwert von  $0,375 \mu\text{g/l}$  bei 55 % der Testpersonen in Molkenlösung mit 16,7 %  $\text{Lys}_{\text{mod}}$  erkannt, ist dieser nur bei 20 % der Prüfer in der niedrig glykosylierten Probe wahrnehmbar. Dieses Phänomen deutet darauf hin, dass die Aromakomponenten durch glykosyliertes Molkenprotein entweder nicht so stark gebunden oder besser freigesetzt werden. Für die Aromastoffe Diacetyl, 2-Hexanon,  $\delta$ -Decalacton und Furaneol konnte somit in Proteinlösungen hergestellt aus nichtenzymatisch glykosylierten Molkenproteinen (16,7 %  $\text{Lys}_{\text{mod}}$ ) signifikant niedrigere Geruchsschwellenwerte ermittelt werden als für nicht glykosylierte Molkenproteine. Diese Interaktionen zwischen Aromastoffen und den glykosylierten Proteinen könnte eine Bedeutung beim Zusatz dieser Proteine in Lebensmitteln haben, da auch in geringen Konzentrationen das Aromaprofil des Lebensmittels beeinflusst werden könnte. Diese Ergebnisse stimmen mit den Untersuchungen der klassischen Sensorik überein. Auch dort wurde ein intensiverer Käse-Geruch bei Modellschmelzkäsezubereitungen unter Einsatz höher glykosylierter Proteine festgestellt. Demzufolge können die Geruchsschwellenwerte in Molkenproteinlösungen auf die Sensorik in einem komplexen Lebensmittel übertragen werden.

Untersuchungen zu Wechselwirkungen von Aromakomponenten mit glykosylierten Proteinen sind in der Literatur bis heute nicht vorhanden. Bekannt ist dagegen, dass diverse Aromastoffe mit Proteinen in Wechselwirkung treten können. Dies kann einerseits mit einer chemischen Reaktion verbunden sein, andererseits können die Wechselwirkungen nicht-kovalenter Art sein, wie z. B. Van-der-Waals-, Dipol-Dipol-, ionische und hydrophobe Interaktionen. Die genannten Wechselwirkungen gehen mit einer Intensitätsabnahme des Aromaeindrucks der wechselwirkenden Komponente einher. Somit kann es zur Änderung des Aromapotenzials und damit zur Verschiebung des Aromaprofils kommen (Fritzler 2003, Kühn et al. 2006).

Sostmann und Guichard (1998) ermittelten, dass  $\beta$ -Lactoglobulin eine sehr gute Affinität zu Methylketonen, Alkoholen und Aldehyden hat. Flüchtige Bestandteile können allerdings an Proteine nur binden, wenn die entsprechenden Bindungsstellen verfügbar sind, d. h. wenn diese Bereiche nicht durch Protein-Protein-Wechselwirkungen oder weitere Interaktionen blockiert sind (Cheftel et al. 1992).

Die Studien von Lübke et al. (2002) zeigen, dass  $\beta$ -Lg zwei unterschiedliche Bindungsstellen für Aromakomponenten aufweist, und zwar die Proteinoberfläche sowie die zentral liegende hydrophobe Tasche (Abb. 4-29), schwarz dargestellter Bereich). An der Ausbildung der hydrophoben Tasche des  $\beta$ -Lg sind folgende Aminosäuren beteiligt: Val<sup>3</sup>, Thr<sup>4</sup>, Gln<sup>5</sup>,



**Abb. 4-29:** Das  $\beta$ -Lactoglobulin Molekül mit antiparallelen  $\beta$ -Faltblatt-Strukturen (cyan), der  $\alpha$ -Helix (grün) und den ungeordneten Bereichen (grau) sowie den Lysinresten (blau), den bei der Bildung der beiden Disulfidbrücken beteiligten Cysteinresten (rot) und der „hydrophoben Tasche“ (schwarz). Lys<sup>47</sup> und Lys<sup>91</sup> sind gesondert (gold) gekennzeichnet. (Dargestellt mit dem Programm RasMol 2.6)

Leu<sup>95</sup>, Phe<sup>105</sup>, Cys<sup>106</sup>, Leu<sup>117</sup>, Val<sup>118</sup>, Cys<sup>119</sup>, Phe<sup>136</sup>, Ala<sup>139</sup>, Leu<sup>140</sup>, Lys<sup>141</sup>, Ala<sup>142</sup> und Leu<sup>143</sup>. Diese Aminosäuren sind, ausgenommen Lys<sup>141</sup>, überwiegend hydrophober Natur. Allerdings ist noch nicht geklärt, welche Stelle für bestimmte Aromastoffe bevorzugt wird.  $\beta$ -Lg ist bekannt für die Interaktionen mit verschiedenen Aromakomponenten wie Alkanen, Ketonen (O'Neill und Kinsella 1987, Andriot et al. 2000, Guichard und Langourieux 2000, Jouenne und Crouzet 2000a), Aldehyden (van Ruth et al. 2002), Lactonen (Sostmann und Guichard 1998, Lübke et al. 2002, Guth und Fritzler 2004) und Estern (Pelletier et al. 1998, Guichard und Langourieux 2000, Jouenne und Crouzet 2000b, Reiners et al. 2000). Da die Bindungskonstante für das  $\beta$ -Lg in der homologen Reihe der Ester, Aldehyde, Ketone und Alkohole mit Erhöhung der Kettenlänge (Hydrophobizität) innerhalb derselben chemischen Klasse steigt, wurden von O'Neill und Kinsella (1987), Pelletier et al. (1998), Guichard und Langourieux (2000) hydrophobe Wechselwirkungen zwischen  $\beta$ -Lg und Aromakomponenten-

ten vermutet. Der Einfluss der An- bzw. Abwesenheit von unterschiedlichen funktionellen Gruppen und sterischen Faktoren auf den Grad der Aromastoffbindung durch Proteine ist ebenfalls bekannt. Die Wechselwirkungen der Alkylkette mit  $\beta$ -Lg können durch polare Gruppen reduziert werden. Der Grund ist die Einführung der Hydroxylfunktion (OH), welche für die Abschwächung der Interaktionen verantwortlich ist (Reiners et al. 2000). Die Einführung der Aldehydgruppe führt zu einer leichten Erhöhung der Bindung.

Einige Studien berichten über die Bindung von Aromakomponenten an Molkenproteinkonzentraten bzw. -isolaten. Jasinski und Kilara (1985) erforschten die Bindung von 2-Nonanon und Nonanal an Molkenproteinkonzentrate mittels Gleichgewichtsdialyse und fanden eine große Anzahl an Bindungsstellen mit starker Bindungsaffinität. Starke Wechselwirkungen zwischen Molkenproteinisolaten und Vanillin wurden von Li et al. (2000) beschrieben.

Es sind zahlreiche Bindungsstudien mit Geruchsstoffen an  $\beta$ -Lactoglobulin durchgeführt worden, allerdings werden keine, widersprüchliche oder unzureichende Informationen über die Bindungspositionen der Aromastoffe am Protein angegeben. Ferner liegen keine Studien zur Bindung von Aromastoffen an nichenzymatisch glykosylierte Proteine vor.

Die hohe Bindungsaffinität des  $\beta$ -Lactoglobulins für hydrophobe Substanzen würde die verstärkte Bindung der untersuchten Aromastoffe an niedrig glykosyliertes Protein erklären. Mit Fortschreiten der „frühen“ Maillard-Reaktion kommt es zur Anbindung der polaren Lactose und damit zur Erhöhung der Hydrophilie. Demzufolge binden die ausgewählten Geruchsstoffe weniger stark an die glykosylierten Proteine, was das beobachtete Ergebnis untermauert. Die unter den Aromastoffen auftretenden Differenzen in der Stärke der Bindung an das Molkenprotein können von diversen chemischen und physikalischen Faktoren abhängig sein. Zur Verdeutlichung kann die Hydrophobizität (Verteilungskoeffizient P) einer Verbindung, bzw. Lipophilie, als physikalische Größe herangezogen werden (siehe Tab. 4-10). Der Verteilungskoeffizient (P) wird definiert als das Konzentrationsverhältnis eines Stoffes zwischen zwei nicht mischbaren Phasen, die sich nach einer bestimmten Zeit im Gleichgewicht befinden (meist Octanol (O) als organisches Lösungsmittel und Wasser (W)) und wird logarithmisch angegeben. Der so genannte  $\log P_{O/W}$ -Wert einer Verbindung wird zur experimentellen Ermittlung der Lipophilie herangezogen. Ein niedriger  $\log P_{O/W}$ -Wert weist auf wenig lipophile Substanzen hin und umgekehrt.

Der Aromastoff Dimethyltrisulfid weist den höchsten  $\log P_{O/W}$ -Wert auf, was auf eine hohe Bindungsaffinität hinweist. Das es keinen Unterschied zwischen der Bindung zu niedrig bzw. hoch glykosylierten Protein zeigt, muss hier die Lipophilie der Verbindung

gegenüber der gesteigerten Hydrophibizität des Proteins überwiegen. Die Bindung des Diacetyls mit niedriger Lipophilie ( $\text{LogP}_{O/W} = -1,4$ ) zeigt die größte Abhängigkeit von den Glykosylierungsgraden des Proteins. Die Aromafreisetzung des Diacetyls erfolgt bei der glykosylierten Probe besser, da der wenig lipophile Aromastoff schlechter an das Protein gebunden wird.

Fritzler (2003) fand heraus, dass der Anstieg der Bindungsaffinität zu einem Protein abhängig ist von der Lipophilie bzw. Zunahme der Lipophilie der Aromastoffe einer Verbindungsklasse, wie von  $\gamma$ -Nonalacton ( $\text{LogP}_{O/W} = 1,9$ ) zu  $\gamma$ -Undecalacton ( $\text{LogP}_{O/W} = 3,3$ ). Da die untersuchten Aromastoffe nicht einer Verbindungsklasse angehören, können auch die strukturellen Einflüsse der Aromakomponenten eine Rolle bei der Bindungsaffinität zu den unterschiedlich glykosylierten Proteinen spielen. Eine weitere Ursache für die veränderte Aromastoffbindung könnte in einer Beeinflussung der Grenzflächeneigenschaften der Milchproteine bestehen.

Wie durch Cheftel et al. (1992) untersucht, können Aromastoffe nur dann an Proteine binden, wenn die entsprechenden Bindungsstellen verfügbar sind. Zudem wurde von Reiners et al. (2000) festgestellt, dass die Interaktionen durch polare Gruppen reduziert werden. Bei der Modifizierung der Molkenproteine wurden kovalent polare Gruppen (= Lactose) eingeführt. Zusätzlich bilden diese eine sterische Abschirmung. Lys<sup>91</sup> ist eine bevorzugte Glykosylierungsstelle. Da sich dieser Lysinrest jedoch in der Nähe der hydrophoben Tasche des  $\beta$ -Lactoglobulins befindet (siehe Abb. 4-29), wird diese sterisch abgeschirmt und behindert die Bindung der Aromastoffe in dieser hydrophoben Region. Die genannten Gründe könnten damit die schwächere Bindung der Aromastoffe an glykosyliertes Protein erklären. Hierbei kommt es zur Einschränkung der Aromabindung, da einerseits das Protein bereits blockierte Aminosäurereste und andererseits verstärkte Hydrophilie durch die Bindung von Lactose an Lysin aufweist.

### 4.5.3 Zusammenfassung der Aromastudien

Die Glykosylierung beeinflusst die Geruchsschwellenwerte der ausgewählten Aromastoffe in Molkenproteinlösungen und führt zu deren tendenzieller Abnahme mit steigender Lysinblockierung. Dadurch können die flüchtigen Verbindungen eher wahrgenommen werden, wenn sie im Kontakt mit stärker glykosylierten Proteinen stehen.

Die Aussagen der deskriptiven Sensorik untermauern die Ergebnisse der Schwellenwertmessungen und zeigen eine Bevorzugung der Schmelzkäsezubereitung nach Addition gly-

kosylierter Proteine. Auch hier wird von einer stärkeren Aromawahrnehmung gesprochen.

Somit ist der Transfer der Ergebnisse bezüglich der Aromastofffreisetzung von Molkenproteinlösung auf molkenproteinhaltiges Lebensmittel gelungen. Vergleichbarkeit der Ergebnisse erzielt mittels unterschiedlicher Methoden sowie Übergang zum komplexeren System zeigen gleiche Tendenz bezüglich der Veränderung der Aromawahrnehmung mit steigender Lysinmodifizierung.

Die nichtenzymatische Glykosylierung beeinflusst die Aromastoffwahrnehmung durch entsprechend modifizierte Proteine. Diese ist damit für die veränderten sensorischen Eigenschaften verantwortlich, die durch Zugabe von glykosylierten Proteinen zur Modell-Schmelzkäsezubereitung resultieren.

## 5 Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss der nichtenzymatischen Glykosylierung auf das Denaturierungsverhalten und die funktionellen Eigenschaften von Molkenproteinen, hier im speziellen die emulgierenden Eigenschaften, untersucht. Nach einer Bestimmung technologisch relevante Glykosylierungsgrade sollten in unterschiedlich glykosylierten Molkenproteinpräparaten das Denaturierungsverhalten sowie die Emulgieigenschaften in Abhängigkeit vom Glykosylierungsgrad mit unterschiedlichen Methoden bestimmt werden. Der aus praktischer Sicht relevante Einfluss der Glykosylierung auf die sensorischen Eigenschaften wurde einerseits in Molkenproteinlösungen und andererseits in einem komplexen System (Modell-Schmelzkäsezubereitung) erfasst. Schließlich galt es, den Einfluss der Glykosylierung auf die Mikrostruktur und die Festigkeit am Beispiel der Modell-Schmelzkäsezubereitung zu untersuchen und daraus unmittelbare Konsequenzen für die technologische Praxis abzuleiten.

Im Rahmen einer Bestandsaufnahme wurde zunächst das Ausmaß der „frühen“ Maillard-Reaktion in kommerziellen Molkenpulvern ermittelt. Durch trockene Erhitzung wurden anschließend in einem Molkenproteinisolat Lysinderivatisierungen ( $Lys_{mod}$ ) von 4,6 % bis 26,2 % eingestellt. Die Bestimmung der Lysinblockierung erfolgte mit Hilfe der Furosine-Methode. Die gewählten Bedingungen für die nichtenzymatische Glykosylierungsreaktion führten zu keinen Oligomerisierungs- und Quervernetzungsreaktionen, sondern ausschließlich zu einer Lysinmodifizierung im Laufe der „frühen“ Maillard-Reaktion.

Das Denaturierungsverhalten der Molkenproteine wird signifikant vom Ausmaß der nichtenzymatischen Glykosylierung der Lysinreste beeinflusst. Mittels RP-HPLC konnte gezeigt werden, dass sich die nach 10 minütiger Erhitzung bei 80 °C bestimmbare Menge an säurelöslichem  $\beta$ -Lactoglobulin mit steigendem Glykosylierungsgrad von 40 % (4,6 %  $Lys_{mod}$ ) auf 82 % (22,4 %  $Lys_{mod}$ ) erhöhte. Die durch Denaturierung verursachte Oligomerisierung wird mit steigender Glykosylierung verlangsamt, wie die SDS-PAGE bestätigte. Mittels DSC wurde eine Zunahme der Denaturierungstemperatur von 79,5 °C bis auf 84 °C mit Fortschreiten der „frühen“ Maillard-Reaktion bestimmt. Die Ergebnisse der Fluoreszenz-

analytik zeigen eine verzögerte Entfaltung der Molkenproteine abhängig von der Lysinmodifizierung.

Die nichtenzymatische Glykosylierung beeinflusst damit maßgeblich das Denaturierungsverhalten. Mit steigender Lysinmodifizierung wird die Denaturierung der Molkenproteine verlangsamt, wobei sich damit eine direkte Beeinflussung der Funktionalität ergibt. Es resultieren thermostabilere Produkte mit erhöhter Löslichkeit.

Die Grenzflächeneigenschaften der Molkenproteine sind wesentlich von der nichtenzymatischen Glykosylierung abhängig. Durch Messung der Oberflächenspannung und der daraus resultierenden kritischen Mizellbildungskonzentration (CMC) konnte eine Zunahme der Grenzflächenaktivität für glykosylierte Molkenproteine und dadurch eine verbesserte Emulgierwirkung festgestellt werden. Die kritische Mizellbildungskonzentration sinkt dabei von 16,5 mg/l für 4,6 %  $Lys_{mod}$  auf 12,1 mg/l für 16,7 %  $Lys_{mod}$ . Die CMC der Molkenproteine nähert sich mit der steigenden Glykosylierung dem Natriumcaseinat an (CMC: 10,5 mg/l), welches als ein wesentlich besserer Emulgator im Vergleich zu  $\beta$ -Lg bekannt ist. Als zweite Methode zur Bestimmung der Grenzflächeneigenschaften wurde die Trübungsmessung verwendet, wobei frisch hergestellte Emulsionen, bestehend aus Molkenproteinen mit unterschiedlichen Glykosylierungsgraden sowie Öl, untersucht wurden. Die Ergebnisse der bei 500 nm gemessenen Trübung zeigen eine Erhöhung der Emulgieraktivität sowohl vor als auch nach Hitzedenaturierung der glykosylierten Molkenproteine zwischen 10 % und 27 % in Abhängigkeit des pH-Wertes. Die Emulsionsstabilität (ES) wird ebenfalls von der nichtenzymatischen Glykosylierung beeinflusst und ist pH abhängig. So erhöht sich die ES bei einem pH von 5,5 von 12,4 min bei 4,6 %  $Lys_{mod}$  auf 30,4 min für 16,7 %  $Lys_{mod}$ . Bei einem pH-Wert von 7,4 wird die Emulsion instabiler mit steigender Lysinmodifizierung. Mittels lichtmikroskopischer Untersuchungen gelang der Beweis der Abnahme der Fetttropfchengröße mit Zunahme des Glykosylierungsgrades. Die Verringerung der Teilchendurchmesser geht mit einer Verbesserung der Emulgiereigenschaften einher.

Die Glykosylierung verbessert erheblich die Emulgiereigenschaften der Molkenproteine. Durch diese Veränderung werden die Molkenproteine „Casein-ähnlicher“ gemacht und dadurch ihre Funktion als Emulgator verstärkt.

Die Herstellung einer standardisierten Modell-Schmelzkäsezubereitung mit Zusatz unterschiedlich glykosylierter Molkenproteine sowie deren rheologische Untersuchungen lassen einen Einfluss der Glykosylierung auf die Festigkeit des Endproduktes erkennen. Wie mittels Texturanalyse in Rahmen einer statistischen Versuchsplanung gezeigt werden konnte,

ist die Festigkeit neben der Lysinmodifizierung der eingesetzten Proteine auch stark von der Schmelztemperatur und dem Alter der verwendeten Rohware (= Käse) abhängig. Ein „erweichender“ Effekt der Schmelzkäsezubereitung durch den Zusatz modifizierter Proteine zeigt sich vor allem beim Einsatz von „mittelaltem“ Käse, welcher durch den Anteil an Nichtproteinstickstoff (NPN-Wert) definiert wurde. Eine Schmelzkäsezubereitung, hergestellt bei 90 °C unter Zusatz von „mittelaltem“ Käse (NPN: 2,3 mg/l) und Molkenprotein mit 4,6 %  $Lys_{mod}$  zeigt eine Festigkeit von 0,44 N, wie mittels Texturanalyse ermittelt. Vergleichsweise dazu zeigte eine Schmelzkäsezubereitung, die unter gleichen Bedingungen hergestellt wurde und welche sich ausschliesslich in ihrem Glykosylierungsgrad unterscheidet (16,7 %  $Lys_{mod}$ ) eine signifikant weichere Textur.

Die Modell-Schmelzkäsezubereitungen wurden sowohl mittels Raster- als auch Transmissionselektronenmikroskopie untersucht, um die Einfluss der eingesetzten glykosylierten Molkenproteine auf die Mikrostruktur zu ermitteln. Augenfällig wurden signifikante Unterschiede in der Proteinmatrix zwischen niedrig und höher glykosylierten Proben. Mit steigender Lysinmodifizierung verbessert sich die Homogenität des Proteinnetzwerkes, was auf die geänderten Emulgiereigenschaften der eingesetzten Proteine zurückgeführt wird. Zudem konnte – wie schon mittels Lichtmikroskopie – eine Abnahme der Fettkugelgröße mit steigender Glykosylierung beobachtet werden.

Die sensorische Beurteilung der Schmelzkäsezubereitungen mit Zusatz unterschiedlich glykosylierter Molkenproteine lässt einen signifikanten Unterschied zwischen den Proben erkennen. Probanden bevorzugten die Modell-Schmelzkäsezubereitung, welche mit höher glykosylierten Proteinen hergestellt wurde. Auch die Ergebnisse der Geruchsschwellenwertmessung mit ausgewählten Aromastoffen (Diacetyl, 2-Hexanon,  $\delta$ -Decalacton, Dimethyltrisulfid, Furaneol) in Molkenproteinlösungen zeigen eine verbesserte Aromastoffwahrnehmung bei modifizierten Proteinen. Für die Aromastoffe Diacetyl, 2-Hexanon,  $\delta$ -Decalacton und Furaneol konnten in Proteinlösungen hergestellt aus nichtenzymatisch glykosylierten Molkenproteinen (16,7 %  $Lys_{mod}$ ) signifikant niedrigere Geruchsschwellenwerte ermittelt werden als für nicht glykosylierte Molkenproteine.

Die Ergebnisse oben genannter Forschungen hinsichtlich der Auswirkungen endogener Rohwareneigenschaften auf das Endprodukt sind von unmittelbarer Praxisrelevanz. Die gewonnenen Grundlagenkenntnisse schaffen die Möglichkeit zur gezielten Funktionalisierung bzw. Auswahl von Rezepturbestandteilen für „maßgeschneiderte“ Produkte mit definierten Eigenschaften sowie zur Steuerung bzw. Kontrolle der Rohstoffqualität.



## 6 Summary

The objective of this work was to study the influence of the nonenzymatic glycosylation (glycation) on the denaturation and the functional properties of whey proteins, in particular focusing on emulsifying characteristics.

The aim of the experiments was to prepare glycated whey proteins with varying degrees of lysine modifications due to reaction with lactose, corresponding to lysine modification found in technologically relevant whey powders. The denaturation behaviour and the emulsifying characteristics of the glycated proteins were investigated using different methods. Modified whey proteins were used to prepare emulsions and the stabilizing effect of the proteins were determined. Furthermore, the practically relevant consequences resulting from the use of glycated whey proteins in complex food systems with respect to microstructure, firmness and sensory quality were investigated using laboratory-prepared processed cheese.

As proteins should be modified by thermal treatment in order to obtain lysine derivatization comparable to technologically relevant samples, we first measured the extent of the early Maillard reaction in a number of commercially available samples of whey protein isolates. Based on these results, whey powder was heated in the dry state at 60 °C to result in lysine modifications ( $Lys_{mod}$ ) ranging from 4.6 % to 26.2 %. Lysine modification was measured using furosine method. Under the used conditions, no oligomerisation of the proteins was induced.

The denaturation of the whey proteins is affected significantly by the extent of the corresponding glycation. Applying RP-HPLC, it was shown that the amount of acid soluble  $\beta$ -lactoglobulin measured after heating for 10 minutes at 80 °C increased from 40 % (4.6 %  $Lys_{mod}$ ) to 82 % (22.4 %). An increase in  $Lys_{mod}$  leads to a slower denaturation-induced oligomerisation, as shown by SDS-PAGE. Concomitant with an increase in  $Lys_{mod}$  from 4.6 % to 26.2 % the denaturation temperature increased from 79.5 °C up to 84 °C, as measured by differential scanning calorimetry (DSC). Fluorescence spectroscopy proved a retarded unfolding of the whey proteins dependent on the lysine modification.

These results indicate that nonenzymatic glycosylation has a significant impact on the denaturation behavior of whey proteins. Generally speaking, glycation improves the heat stability of whey proteins.

An increased surface activity caused by nonenzymatic glycosylation was observed by surface tension measurements and the determination of critical micelle concentrations (CMC), indicating that emulsifying properties of whey proteins are improved due to reaction with carbohydrates. The critical micelle concentration declines from 16.5 mg/l for 4.6 %  $Lys_{mod}$  to 12.1 mg/l for 16.7 %  $Lys_{mod}$  with rising degree of lysine modification. CMC of the whey proteins approaches the values measured for sodium caseinate (CMC: 10.5 mg/l), which is known as a substantially better emulsifying agent compared with  $\beta$ -Lactoglobulin. Using a turbidimetric technique, freshly prepared emulsions, consisting of oil and whey proteins with varying modification of lysine, were examined. Turbidity measurements at 500 nm clearly showed an increase of the emulsion activity (EA), ranging between 10 % and 27 % both before and after heat denaturation of the glycosylated whey proteins depending on the pH. The emulsion stability (ES) is likewise affected by nonenzymatic glycosylation and is pH dependent. At a pH of 5.5, ES increased from 12.1 min (4.6 %  $Lys_{mod}$ ) to 30.4 min (16.7 %  $Lys_{mod}$ ). At a pH value of 7.4, the emulsions were more unstable with rising modification of the lysine residues. Light microscopy demonstrated that the glycated proteins produced smaller emulsion droplets (expressed as diameter of fat globules) when compared to unmodified  $\beta$ -lactoglobulin. This observation is associated with glycation-induced improvement of the emulsifying properties.

Following preparation of processed cheese were supplemented with whey proteins of varying degree of glycation. It was shown by rheological investigations that the extent of lysine modification of the whey proteins significantly influences the firmness of the final product. Based on a Box-Behnken plan and an analysis of variance (ANOVA), the „softening“ effect of nonenzymatically glycosylated whey proteins was pronounced when a middle-aged cheese was used, which was defined by the non protein nitrogen (NPN value). A processed cheese, manufactured at 90 °C using middle-aged cheese (NPN: 2.3 mg/g) and whey protein with 4.6 %  $Lys_{mod}$  showed a firmness of 0.44 N as measured via texture analysis, whereas a firmness of 0.25 N was measured when whey protein with 16.7 %  $Lys_{mod}$  was added. Processed cheese samples were analyzed using SEM (scanning electron microscopy), TEM (transmission electron microscopy) and light microscopy in order to determine the influence of glycated whey proteins on the microstructure. Significant differences in the protein matrix

resulting from the use of whey proteins with high or low degree of lactosylation were observed by SEM and TEM. With increasing lysine modification, the homogeneity of the protein network was improved, which could be attributed to the improved emulsifying characteristics of the whey proteins. In addition, a reduction of the fat globule size was observed, as seen before in light microscopy.

Sensory analyses indicate a higher preference for products containing glycosylated whey proteins. In model studies using selected flavour compounds (2,3-butanedione, 2-hexanone,  $\delta$ -decalactone, dimethyl trisulfide, furaneol) in whey protein solutions, it was shown that binding of flavour compounds to whey proteins is influenced by the extent of lactosylation. For 2,3-butanedione, 2-hexanone,  $\delta$ -decalactone and furaneol, significantly lower odor threshold values could be determined for solutions containing whey proteins with high degree of lysine modification (16.7 %  $Lys_{mod}$ ) compared to low modified proteins (4.6 %  $Lys_{mod}$ ).

In conclusion, the outcome of the performed study regarding the effects of raw materials on the final product is of direct practical relevance. The manipulation in the degree of nonenzymatic glycosylation during food processing offers a high potential for the food industry in order to control the functional properties of food. The insights gained in this work may offer possibilities to specifically functionalize whey proteins and/or select raw materials as a basis for „tailor-made“ products with defined quality.



# Literaturverzeichnis

- ALVAREZGOMEZ, J. M. ; RODRIGUEZPATINO, J. M.: Formulation engineering of food model foams containing diglycerol esters and beta-lactoglobulin. *Ind. Eng. Chem. Res.*45 (2006), 7510–7519 **19**
- ANDRIOT, I. ; HARRISON, M. ; FOURNIER, N. ; GUICHARD, E.: Interactions between methyl ketones and beta-lactoglobulin: sensory analysis, headspace analysis, and mathematical modeling. *J. Agric. Food Chem.*48 (2000), 4246–4251 **125**
- ANEMA, S. G. ; HILL, J. P. ; BOLAND, M. J. ; MCKENNA, A. B.: Kinetic and thermodynamic study of the denaturation of alpha-lactalbumin, beta-lactoglobulin A and beta-lactoglobulin B in heated reconstituted whole milk. *IDF special issue*9602 (1996), 367–372 **14, 79, 80**
- ANEMA, S. G. ; PINDER, D. N. ; HUNTER, R. J. ; HEMAR, Y.: Effects of storage temperature on the solubility of milk protein concentrate (MPC85). *Food Hydrocolloids*20 (2006), 386–393 **17, 47**
- AUTY, M. A. E. ; TWOMEY, M. ; GUINEE, T. P. ; MULVIHILL, D. M.: Development and application of confocal scanning laser microscopy methods for studying the distribution of fat and protein in selected dairy products. *J. Dairy Res.*63 (2001), 417–427 **32**
- AWAD, R. A. ; ABDEL-HAMID, L. B. ; EL-SHABRAWY, S. A. ; SINGH, R. K.: Texture and microstructure of block type processed cheese with formulated emulsifying salt mixtures. *Lebensm.-Wiss. Technol.*35 (2002), 54–61 **31**
- BELITZ, H. D. ; GROSCH, W. ; SCHIEBERLE, P.: *Lehrbuch der Lebensmittelchemie*. Berlin, Heidelberg, New York : Springer Verlag, Berlin, 2001. – 1059 S **4, 11, 94, 120**
- BERGER, W. ; KLOSTERMEYER, H. ; MERKENICH, K. ; UHLMANN, G.: *Die Schmelzkäseherstellung. JOHA Leitfaden*. Ladenburg : BK Giulini, 1989. – 238 S **3, 4, 23, 29, 30, 31, 32, 105, 112**
- BERTRAND-HARB, C. ; BADAY, A. ; DALGALARRONDO, M. ; CHOBERT, J. M. ;

- HAERTLÉ, T.: Thermal modifications of structure and co-denaturation of alpha-lactalbumin and beta-lactoglobulin induce changes of solubility and susceptibility to proteases. *Die Nahrung*46 (2002), 283–289 17, 47
- BIKKER, J. F. ; ANEMA, S. G. ; LI, Y. ; HILL, J. P.: Thermal denaturation of beta-lactoglobulin A, B and C in heated skim milk. *Milchwissenschaft*55 (2000), 609–613 14, 79
- BLOCK, J. D. ; MERCHERS, M. ; RENTERGHEM, R. V.: Capillary electrophoresis of the whey protein fraction of milk powders. A possible method for monitoring storage conditions. *Int. Dairy J.*8 (1998), 787–792 16, 45, 77
- BORCHERDING, K.: *Untersuchungen zur Charakterisierung der Makro- und Mikrostruktur von Milchsäumen*. 2004 64
- BOUHALLAB, S. ; MORGAN, F. ; HENRY, G. ; MOLLE, D. ; LEONIL, J.: Formation of stable covalent dimer explains the high solubility at pH 4.6 of lactose-beta-lactoglobulin conjugates heated near neutral pH. *J. Agric. Food Chem.*47 (1999), 1489–1494 15, 16, 45, 80
- BOYE, J. I. ; MA, C. Y. ; ISMAIL, A. ; HARWALKAR, V. R. ; KALÁB, M.: Molecular and microstructural studies of thermal denaturation and gelation of beta-lactoglobulins A and B. *J. Agric. Food Chem.*45 (1997), 1608–1618 14
- BROERSEN, K. ; VORAGEN, A. G. ; HAMER, R. J. ; JONGH, H. H. D.: Glycoforms of beta-lactoglobulin with improved thermostability and preserved structural packing. *Biotechnol. Bioeng.*86 (2004), 78–87 15, 17, 52, 84, 88
- CARIC, M. ; GANTAR, M. ; KALÁB, M.: Effects of emulsifying agents on the microstructure and other characteristics of process cheese - a review. *Food Microstructure*4 (1985), 297–312 30
- CARIC, M. ; KALÁB, M.: *Processed cheese products*. 467–505. Cork, Ireland : Chapman & Hall, 1993 (Cheese: chemistry, physics and microbiology. Vol. 2, Major cheese groups.) 30, 32, 112
- CAVALIER-SALOU, C. ; CHEFTEL, J. C.: Emulsifying salts influence on characteristics of cheese analogs from calcium caseinate. *J. Food Sci.*56 (1991), 1542–7–1551 30, 31
- CHANAMAI, R. ; MCCLEMENTS, D. J.: Comparison of gum arabic, modified starch, and whey protein isolate as emulsifiers: influence of pH, CaCl<sub>2</sub> and temperature. *J. Food Sci.*67 (2002), 120–125 99, 100

- CHEFTEL, J. C. ; CUQ, J. L. ; LORIENT, D.: *Lebensmittelproteine. Biochemie, funktionelle Eigenschaften, Ernährungsphysiologie, chemische Modifizierung*. Hamburg : Behr's, 1992. – 352 S [5](#), [15](#), [19](#), [22](#), [23](#), [94](#), [124](#), [127](#)
- CHEVALIER, F. ; CHOBERT, J. M. ; DALGALARRONDO, M. ; CHOISSET, Y. ; HAERTLÉ, T.: Maillard glycation of beta-lactoglobulin induces conformation changes. *Die Nahrung*46 (2002), 58–63 [17](#), [47](#)
- CHEVALIER, F. ; CHOBERT, J. M. ; POPINEAU, Y. ; NICOLAS, M. G. ; HAERTLÉ, T.: Improvement of functional properties of beta-lactoglobulin glycated through the Maillard reaction is related to the nature of the sugar. *Int. Dairy J.*11 (2001), 145–152 [24](#), [104](#)
- CLAWIN-RÄDECKER, I. ; KIESNER, C. ; MARTIN, D.: Furosine and ribonucleosides: indicators for the heat treatment of milk. *Milchwissenschaft*55 (2000), 679–682 [10](#)
- CLAWIN-RÄDECKER, I. ; KIESNER, C. ; SCHLIMME, E.: Analysis of the acid-soluble contents of alpha-lactalbumin, beta-lactoglobulin, serum albumin and of the immunoglobulin fraction in pasteurized milk. *Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte*52 (2000), 323–334 [16](#), [45](#), [78](#)
- DALGLEISH, D. G. ; LEAVER, J.: The possible conformations of milk proteins adsorbed on oil/water interfaces. *J. Colloid Interface Sci.*141 (1991), 288–294 [20](#)
- DAMODARAN, S.: Protein stabilization of emulsions and foams. *J. Food Sci.*70 (2005), R54–R66 [19](#), [21](#)
- DANNENBERG, F. ; KESSLER, H. G.: Untersuchungen zur Reaktionskinetik der Molkenprotein-Denaturierung und deren technologischer Bedeutung. *Chem. Ing. Tech.*59 (1987), 575–577 [13](#)
- DANNENBERG, F. ; KESSLER, H. G.: Reaction kinetics of the denaturation of whey proteins in milk. *J. Food Sci.*53 (1988), 258–263 [79](#), [80](#)
- DANNENBERG, F. ; KESSLER, H. G.: Thermodynamic approach to kinetics of b-lactoglobulin denaturation in heated skim milk and sweet whey. *Milchwissenschaft*43 (1988), 139–142 [12](#)
- DAREWICZ, M. ; DZIUBA, J.: The effect of glycosylation on emulsifying and structural properties of bovine beta-casein. *Die Nahrung*45 (2001), 15–20 [19](#), [23](#), [73](#)
- DAREWICZ, M. ; DZIUBA, J. ; MIODUSZEWSKA, H.: Some physico-chemical properties and structural changes of bovine beta-casein upon glycation. *Die Nahrung*42 (1998),

- 213–214 **99**
- DICKINSON, E.: Properties of emulsions stabilized with milk proteins: overview of some recent developments. *J. Dairy Sci.* 80 (1997), 2607–2619 **21**
- DICKINSON, E.: Adsorbed protein layers at fluid interfaces: interactions, structure and surface rheology. *Colloids Surf. B15* (1999), 161–176 **20**
- DICKINSON, E.: Caseins in emulsions: interfacial properties and interactions. *Int. Dairy J.* 9 (1999), 305–312 **21**
- DICKINSON, E.: Milk protein interfacial layers and the relationship to emulsion stability and rheology. *Colloids Surf. B20* (2001), 197–210 **20**
- DICKINSON, E.: *Interfacial, emulsifying and foaming properties of milk proteins*. 1229–1260. London : Elsevier, 2003 (Advanced Dairy Chemistry. 1(Part B)) **20, 22**
- DIMITRELI, G. ; THOMAREIS, A. S.: Effect of temperature and chemical composition on processed cheese apparent viscosity. *Journal of Food Engineering* 64 (2004), 265–271 **112**
- DÖRFLER, H. D.: *Grenzflächen und Kolloid-disperse Systeme: Physik und Chemie*. Berlin, Heidelberg : Springer, 2002. – 989 S **28**
- ENNIS, M. P. ; MULVIHILL, D. M.: Maillard reaction contributes to variability in hydration characteristics in rennet caseins in solution of a calcium-sequestering salt. *Int. J. Dairy Technol.* 52 (1999), 156–160 **25**
- ERBERSDOBLER, H.: Loss of lysine during manufacture and storage of milk powder. *Milchwissenschaft* 25 (1970), 280–284 **9, 10**
- EUGSTER-MEIER, E.: *Adsorptionsverhalten von Proteinen und niedermolekularen Lipiden der Milch an Phasengrenzflächen*. 2001 **93**
- FENAILLE, F. ; MORGAN, F. ; PARISOD, V. ; TABEL, J. C. ; GUY, P. A.: Solid-state glycation of beta-lactoglobulin by lactose and galactose: localization of the modified amino acids using mass spectrometric techniques. *Journal of Mass Spectrometry* 39 (2004), 16–28 **74**
- FIGURA, L. O.: *Lebensmittelphysik. Physikalische Kenngrößen - Messung und Anwendung*. Berlin, Heidelberg : Springer, 2004. – 444 S **26, 56**
- FINOT, P. A. ; BUJARD, E. ; MOTTU, F. ; MAURON, J.: Availability of the true Schiff's bases of lysine. Chemical evaluation of the Schiff's base between lysine and lactose in

- milk. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 86B (1977), 343–365 42
- FRIEDMAN, M.: Food browning and its prevention: an overview. *J. Agric. Food Chem.* 44 (1996), 631–653 8, 9
- FRITZLER, R.: *Bindungsverhalten von Geruchsstoffen an makromolekulare Lebensmittelinhaltsstoffe*. 2003 124, 127
- GAUTHIER, F. ; BOUHALLAB, S. ; RENAULT, A.: Modification of bovine beta-lactoglobulin by glycation in a powdered state or in aqueous solution: adsorption at the air-water interface. *Colloids Surf. B* 21 (2001), 37–45 24
- GROUBET, R. ; CHOBERT, J. M. ; HAERTLE, T. ; NICOLAS, M. G.: Functional properties of milk proteins glycated in mild conditions. *Sci. Aliments* 19 (1999), 423–438 24, 104
- GUICHARD, E. ; LANGOURIEUX, S.: Interactions between beta-lactoglobulin and flavour compounds. *Food Chem.* 71 (2000), 301–308 122, 125
- GUINEE, T. P.: *Cheese - cheese analogues*. 429–444. London : Academic Press, 2002 (Encyclopedia of Dairy Sciences) 31
- GUINEE, T. P. ; CARIC, M. ; KALAB, M.: *Pasteurized processed cheese and substitute/imitation cheese products*. 349–394, Academic Press Inc., U.S., 2004 (Cheese: Chemistry, Physics, and Microbiology) 30
- GUPTA, S. K. ; KARAHADIAN, C. ; LINDSAY, R. C.: Effect of emulsifier salts on textural and flavor properties of processed cheeses. *J. Dairy Sci.* 67 (1984), 764–778 31
- GUTH, H. ; FRITZLER, R.: Binding studies and computer-aided modelling of macromolecule/odorant interactions. *Chemistry & Biodiversity* 1 (2004), 2001–2023 125
- HALL, G. M.: *Methods of Testing Protein Functionality*. London : Blackie academic & professional, 1996. – 265 S 19, 20, 21, 27
- HAMBLING, S. G. ; MCALPINE, A. S. ; SAWYER, L.: *Beta-Lactoglobulin*. 141–190. London, New York : Elsevier, 1992 (Advanced Dairy Chemistry: Proteins, Vol. 1.) 5, 7, 20
- HEERTJE, I. ; BOSKAMP, R. J. ; KLEEF, F. van ; GORTEMAKER, F. H.: The microstructure of processed cheese. *Neth. Milk Dairy J.* 35 (1981), 177–179 29, 31, 32, 112
- HENLE, T. ; WALTER, H. ; KRAUSE, I. ; KLOSTERMEYER, H.: Efficient determination of individual maillard compounds in heat-treated milk products by amino acid analysis. *Int. Dairy J.* 1 (1991), 125–135 10, 41, 42
- HODGE, J. E.: Dehydrated foods. Chemistry of browning reactions in model systems. *J.*

- Agric. Food Chem.*15 (1953), 928–943 8
- HOFFMANN, M. A. M. ; MILTENBURG, J. C. van ; MIL, P. J. J. M. van: The suitability of scanning calorimetry to investigate slow irreversible protein denaturation. *Thermochim. Acta*306 (1997), 45–49 13
- HURRELL, R. F. ; FINOT, P. A. ; FORD, J. E.: Storage of milk powders under adverse conditions. I. Losses of lysine and of other essential amino acids as determined by chemical and microbiological methods. *Brit. J. Nutr.*49 (1983), 343–354 10
- IBRAHIM, H. R. ; KOBAYASHI, K. ; KATO, A.: Improvement of the surface functional properties of beta-lactoglobulin and alpha-lactalbumin by heating in a dry state. *Biosc. Biotech. Biochem.*57 (1993), 1549–1552 100
- IDF-STANDARD: IDF-Standard 178: Determination of acid soluble/ beta-lactoglobulin content (reversed-phase HPLC method). *International Dairy Federation*178 (1996), 1–6 16, 45, 77
- JASINSKI, E. ; KILARA, A.: Flavor binding by whey proteins. *Milchwissenschaft*40 (1985), 596–599 126
- JONGH, H. H. de ; GRONEVELD, T. ; GROOT, J. de: Mild isolation procedure discloses new protein structural properties of beta-lactoglobulin. *J. Dairy Sci.*84 (2001), 562–571 77
- JOU, K. D. ; HARPER, W. J.: Effect of di-saccharides on the thermal properties of whey proteins determined by differential scanning calorimetry (DSC). *Milchwissenschaft*51 (1996), 509–512 14, 17, 52, 85, 86, 88
- JOUENNE, E. ; CROUZET, J.: Determination of apparent binding constants for aroma compounds with beta-lactoglobulin by dynamic coupled column liquid chromatography. *J. Agric. Food Chem.*48 (2000), 5396–5400 125
- JOUENNE, E. ; CROUZET, J.: Effect of pH on retention of aroma compounds by beta-lactoglobulin. *J. Agric. Food Chem.*48 (2000), 1273–1277 125
- KALÁB, M.: *Chemistry of Structure-Function Relationships in Cheese*. Bd. 367: *Practical aspects of electron microscopy in cheese research*. 247–276. New York : Plenum Press, 1995 29, 31, 112
- KALÁB, M. ; YUN, J. ; YIU, S. H.: Textural properties and microstructure of process cheese food rework. *Food Microstructure*6 (1987), 181–192 29, 31, 32, 112
- KAMMERLEHNER, J.: *Schmelzkäse - Schmelzkäsezubereitungen*. 712–772. Freising :

- Freisinger Künstlerpresse W. Bode, 2003 (Käsetechnologie) 29, 32, 33
- KESSLER, H. G.: *Erhitzen und Auswirkungen*. Kap. 6, 132–195. Freising-Weihenstephan : A. Kessler, 1988 (Lebensmittel- und Bioverfahrenstechnik: Molkereitechnologie) 12
- KÜHN, J. ; CONSIDINE, T. ; SINGH, H.: Interactions of milk proteins and volatile flavor compounds: implications in the development of protein foods. *J. Food Sci.* 71 (2006), 72–82 124
- KIRCHMEIER, O.: *Phasenumwandlungen in der Technologie der Milch*. München : VV GmbH Volkswirtschaftlicher Verlag, 1987. – 211 S 3, 4, 5, 7, 11
- KLOSTERMEYER, H. ; BUCHHEIM, W.: Mikrostruktur von Schmelzkäseerzeugnissen. *Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte* 40 (1988), 219–231 29, 30, 31, 32, 112
- KRAUSE, R.: *Untersuchungen zur Bildung von Furosin und N-terminalen 2(1H)-Pyrazinonen*. 2005 10, 11, 42
- KRAUSE, R. ; KNOLL, K. ; HENLE, T.: Studies on the formation of furosine and pyridosine during acid hydrolysis of different Amadori products of lysine. *Eur. Food. Res. Technol* 216 (2003), 277–283 10, 42
- KRÄGEL, J. ; BREE, M. ; WÜSTNECK, R. ; MAKIEVSKI, A. V. ; GRIGORIEV, D. O. ; SENKEL, O. ; MILLER, R. ; FAINERMAN, V. B.: Dynamics and thermodynamics of spread and adsorbed food protein layers at the water/air interface. *Die Nahrung* 42 (1998), 229–231 94
- LAGALY, G. ; SCHULZ, O. ; ZIMEHL, R.: *Dispersionen und Emulsionen - Eine Einführung in die Kolloidik feinverteilter Stoffe einschliesslich der Tonmineralien*. Darmstadt : Steinkopff, 1997. – 562 S 20, 21, 27
- LÜBKE, M. ; GUICHARD, E. ; TROMELIN, A. ; QUERE, J. L. L.: Nuclear magnetic resonance spectroscopic study of beta-lactoglobulin interactions with two flavor compounds, gamma-decalactone and beta-ionone. *J. Agric. Food Chem.* 50 (2002), 7094–7099 124, 125
- LEDL, F. ; SCHLEICHER, E.: The Maillard reaction in food and in the human body - new results in chemistry, biochemistry and medicine. *Angew. Chem.* 102 (1990), 597–626 8, 9, 10
- LEE, B. O. ; KILBERTUS, G. ; ALAIS, C.: Ultrastructural study on process cheese. Effect of different parameters. *Milchwissenschaft* 36 (1981), 343–348 29, 31, 32, 112
- LEONIL, J. ; MOLLE, D. ; FAUQUANT, J. ; MAUBOIS, J. L. ; PEARCE, R. J. ;

- BOUHALLAB, S.: Characterization by ionization mass spectrometry of lactosyl beta-lactoglobulin conjugates formed during heat treatment of milk and whey and identification of one lactose-binding site. *J. Dairy Sci.*80 (1997), 2270–2281 **10**
- LI, Z. ; GRUN, I. U. ; FERNANDO, L. N.: Interaction of vanillin with soy and dairy proteins in aqueous model systems: a thermodynamic study. *J. Food Sci.*65 (2000), 997–1001 **126**
- LOTTE, K.: *3D fluorescence spectroscopy with tryptophan and tryptophan analogues : from solvent studies to protein conformations.* 2004 **18, 19, 53, 89**
- MAILLARD, L. C.: Action des amines sur les sucres: Formation des mélanoidines par voie méthodique. *C. R. Seances Acad. Sci.*(1912), 66–68 **8**
- MANDERSON, G. A. ; HARDMAN, M. J. ; CREAMER, L. K.: Effect of heat treatment on the conformation and aggregation of beta-lactoglobulin A, B, and C. *J. Agric. Food Chem.*46 (1998), 5052–5061 **12, 17, 47, 78, 82, 83**
- MANDERSON, G. A. ; HARDMAN, M. J. ; CREAMER, L. K.: Effect of heat treatment on bovine beta-lactoglobulin A, B, and C explored using thiol availability and fluorescence. *J. Agric. Food Chem.*47 (1999), 3617–3627 **18, 53, 89, 90**
- MARCHESSEAU, S. ; GASTALDI, E. ; LAGAUDE, A. ; CUQ, J. L.: Influence of pH on protein interactions and microstructure of process cheese. *J. Dairy Sci.*80 (1997), 1483–1489 **29, 30, 31, 112**
- MARSHALL, R. J.: Composition, structure, rheological properties, and sensory texture of processed cheese analogues. *J Sep Sciurnal of the Science of Food and Agriculture*50 (1990), 237–252 **29**
- MAURON, J.: The Maillard reaction in food: a critical review from the nutritional standpoint. *Progress in Food and Nutrition Science*(1981), 5–35 **8, 10**
- MEHRENS, H. A. ; REIMERDES, E. H.: *Milchproteine.* Bd. 4: *Funktionelle und technologische Eigenschaften von Milchproteinen.*Kap. 2, 31–47. Hamburg : Behr's Verlag, 1991 **4, 5, 19, 20, 21, 22**
- MENGER, F. M. ; KEIPER, J. S.: Gemini-Tenside. *Angew. Chem.*112 (2000), 1980–1996 **94, 96**
- MENGER, F. M. ; KEIPER, J. S. ; MBADUGHA, B. N. A. ; CARAN, K. L. ; ROMSTED, L. S.: Interfacial composition of gemini surfactant micelles determined by chemical trapping. *Langmuir*16 (2000), 9095–9098 **25**

- METWALLY, A. I.: Surface tension as a new index for the emulsifying properties of milk protein preparations. *Egypt. J. Dairy Sci.*32 (2004), 49–57 **99, 100**
- MORALES, F. J. ; ROMERO, C. ; JIMÉNEZ-PÉREZ, S.: Characterization of industrial processed milk by analysis of heat-induced changes. *International J. Food Sci. & Technology*35 (2000), 193–200 **16, 45, 78**
- MORGAN, F. ; LEONIL, J. ; MOLLE, D. ; BOUHALLAB, S.: Nonenzymatic lactosylation of bovine beta-lactoglobulin under mild heat treatment leads to structural heterogeneity of the glycoforms. *Biochemical and Biophysical Research Communications*236 (1997), 413–417 **7**
- MORGAN, F. ; LEONIL, J. ; MOLLE, D. ; BOUHALLAB, S.: Modification of bovine beta-lactoglobulin by glycation in a powdered state or in an aqueous solution: effect on association behavior and protein conformation. *J. Agric. Food Chem.*47 (1999), 83–91 **17, 47, 73**
- MORGAN, F. ; MOLLE, D. ; HENRY, G. ; VENIEN, A. ; LEONIL, J. ; PELTRE, G. ; LEVIEUX, D. ; MAUBOIS, J. I ; BOUHALLAB, S.: Glycation of bovine beta-lactoglobulin: effect on the protein structure. *Int. J. Food Sci. Technol.*34 (1999), 429–435 **7, 9, 10, 72, 73, 75**
- MULSOW, B. B. ; JAROS, D. ; ROHM, H.: *Processed cheese and cheese analogues*. Kap. 8, 210–235. UK : Blackwell Publishing, 2007 (Structure of dairy products) **112**
- MULVIHILL, D. M. ; DONOVAN, M.: Whey proteins and their thermal denaturation - a review. *Irish J. Food Sci. and Technology*11 (1987), 43–75 **7, 12**
- NACKA, F. ; CHOBERT, J. M. ; BUROVA, T. ; LEONIL, J. ; HAERTLÉ, T.: Induction of new physicochemical and functional properties by the glycosylation of whey proteins *Journal of Protein Chemistry*17 (1998), 495–503 **24, 72, 82, 104**
- NAGASAWA, K. ; OHGATA, K. ; TAKAHASHI, K. ; HATTORI, M.: Role of the polysaccharide content and net charge on the emulsifying properties of beta-lactoglobulin-carboxymethyl dextran conjugates. *J. Agric. Food Chem.*44 (1996), 2538–2543 **24**
- NIELSEN, B. T. ; SINGH, H. ; LATHAM, J. M.: Aggregation of bovine beta-lactoglobulins A and B on heating at 75[deg]C. *Int. Dairy J.*6 (1996), 519–527 **14**
- NYLANDER, T. ; HAMRAOUI, A. ; PAULSSON, M.: Interfacial properties of whey proteins at air/water and oil/water interfaces studied by dynamic drop tensiometry, ellipsometry

- and spreading kinetics. *Int. J. Food Sci. Technol.*34 (1999), 573–585 93
- NYLANDER, T. ; WAHLGREN, N. M.: Competitive and sequential adsorption of beta-casein and beta-lactoglobulin on hydrophobic surfaces and the interfacial structure of beta-casein. *J. Colloid Interface Sci.*162 (1994), 151–162 20
- O'NEILL, T. E. ; KINSELLA, J. E.: Binding of alkanone flavors to beta-lactoglobulin: effects of conformational and chemical modification. *J. Agric. Food Chem.*35 (1987), 770–774 125
- ONSAARD, E. ; VITTAYANONT, M. ; SRIGAM, S. ; MCCLEMENTS, D. J.: Comparison of properties of oil-in-water emulsions stabilized by coconut cream proteins with those stabilized by whey protein isolate. *Food Res. Int.*39 (2006), 78–86 99, 100
- PALAZOLO, G. ; RODRIGUEZ, F. ; FARRUGGIA, B. ; PICO, G. ; DELORENZI, N.: Heat treatment of beta-lactoglobulin: structural changes studied by partitioning and fluorescence. *J. Agric. Food Chem.*48 (2000), 3817–3822 18, 53, 89
- PEARCE, K. N. ; KINSELLA, J. E.: Emulsifying properties of proteins: evaluation of a turbidimetric technique. *J. Agric. Food Chem.*26 (1978), 716–723 19, 21, 27, 28, 57, 97, 99
- PELLETIER, E. ; SOSTMANN, K. ; GUICHARD, E.: Measurement of interactions between beta-lactoglobulin and flavor compounds (esters, acids, and pyrazines) by affinity and exclusion size chromatography. *J. Agric. Food Chem.*46 (1998), 1506–1509 125
- PIISPANEN, P. S.: Synthesis and characterization of surfactants based on natural products. 2002 (71). – Forschungsbericht. – 5–17 S 25, 26, 56, 94, 96
- PISKA, I. ; STETINA, J.: Influence of cheese ripening and rate of cooling mixture on rheological properties of processed cheese. *Journal of Food Engineering*61 (2004), 551–555 112
- REINERS, J. ; NICKLAUS, S. ; GUICHARD, E.: Interactions between beta-lactoglobulin and flavor compounds of different chemical classes. Impact of the protein on the odor perception of vanillin and eugenol. *Lait*80 (2000), 347–360 125, 126, 127
- RELKIN, P.: Differential scanning calorimetry: A useful tool for studying protein denaturation. *Thermochim. Acta*246 (1994), 371–386 14, 17, 52, 88
- RENTERGHEN, R. V. ; BLOCK, J. D.: Furosine in consumption milk and milk powders. *Int. Dairy J.*6 (1996), 371–382 10, 77
- RESMINI, P. ; PELLEGRINO, L. ; CATTANEO, S.: Furosine and other heat-treatment

- indicators for detecting fraud in milk and milk products. *Italian J. Food Sci.*15 (2003), 473–484 **10**
- RESMINI, P. ; PELLEGRINO, L. ; HAGENBOOM, J. A. ; ANDREINI, R.: Thermal denaturation of whey protein in pasteurized milk. Fast evaluation by HPLC. *Italian J. Food Sci.*3 (1989), 51–62 **16, 45**
- RUTH, S. M. van ; KING, C. ; GIANNOULI, P.: Influence of lipid fraction, emulsifier fraction, and mean particle diameter of oil-in-water emulsions on the release of 20 aroma compounds. *J. Agric. Food Chem.*50 (2002), 2365–2371 **125**
- SAVELLO, P. A. ; ERNSTROM, C. A. ; KALÁB, M.: Microstructure and meltability of model process cheese made with rennet and acid casein. *J. Dairy Sci.*72 (1989), 1–11 **29, 31, 32, 112**
- SAWYER, W. H. ; NORTON, R. S. ; NICHOL, L. W. ; MCKENZIE, G. H.: Thermodenaturation of bovine beta-lactoglobulin : Kinetics and the introduction of beta-structure. *Biochim. Biophys. Acta - Protein Struct.*243 (1971), 19–30 **12**
- SCHAR, W. ; BOSSET, J. O.: Chemical and physico-chemical changes in processed cheese and ready-made fondue during storage. A review. *Lebensm.-Wiss. Technol.*35 (2002), 15–20 **30**
- SCHLIMME, E. ; BUCHHEIM, W.: *Milch und ihre Inhaltsstoffe - Chemische und physikalische Grundlagen*. Verlag Th. Mann, 1995. – 112 S **4, 5**
- SCHLIMME, E. ; BUCHHEIM, W. ; MEISEL, H.: Milk proteins as emulsifiers in foods. *Gordian*86 (1986), 131–137 **5**
- SHEPHERD, R. ; ROBERTSON, A. ; OFMAN, D.: Dairy glycoconjugate emulsifiers: casein-maltodextrins. *Food Hydrocolloids*14 (2000), 281–286 **25**
- SMITH, R. ; TANFORD, C.: The critical micelle concentration of dipalmitoylphosphatidylcholine in water and water/methanol solutions. *J. Mol. Biol.*67 (1972), 75–83 **93**
- SOSTMANN, K. ; GUICHARD, E.: Immobilized beta-lactoglobulin on a HPLC-column: a rapid way to determine protein–flavour interactions. *Food Chem.*62 (1998), 509–513 **124, 125**
- SPIEGEL, T.: Whey protein aggregation under shear conditions: effects of lactose and heating temperature on aggregate size and structure. *Int. J. Food Sci. Technol.*34 (1999), 523–531 **88**

- SPREER, E.: *Schmelzkäse*. 385–396. Hamburg : Behr's, 1995 (Technologie der Milchverarbeitung) 30, 32
- TAUSK, R. J. M. ; KARMIGGELT, J. ; OUDSHOORN, C. ; OVERBEEK, J. T. G.: Physical chemical studies of short-chain lecithin homologues. I. : Influence of the chain length of the fatty acid ester and of electrolytes on the critical micelle concentration. *Biophys. Chem.*1 (1974), 175–183 93
- TEEFFELEN, A. M. van ; BROERSEN, K. ; JONGH, H. H. de: Glucosylation of beta-lactoglobulin lowers the heat capacity change of unfolding; a unique way to affect protein thermodynamics. *Protein Sci.*14 (2005), 2187–2194 15, 17, 52, 76, 84, 88, 90
- VERHEUL, M. ; ROEFS, S. P. F. M. ; KRUIF, K. G. de: Kinetics of heat-induced aggregation of beta-lactoglobulin. *J. Agric. Food Chem.*46 (1998), 896–903 13, 14, 17, 52, 77, 88
- WONG, D. W. S. ; CAMIRAND, W. M. ; PAVLATH, A. E.: Structures and functionalities of milk proteins. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*36 (1996), 807–844 4, 5, 7, 12, 15, 19, 20, 21, 22, 23
- ZAYAS, J. F.: *Functionality of proteins in food*. Berlin, Heidelberg, New York : Springer, 1997. – 373 S 19, 21, 22

# Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. T. Henle (Professur für Lebensmittelchemie, TU Dresden), der diese Arbeit initiiert und gefördert hat und mich von seinem reichen Kenntnis- und Erfahrungsschatz profitieren ließ.

Herrn Prof. Dr. H. Rohm (Institut für Lebensmittel- und Bioverfahrenstechnik, TU Dresden) und Frau Dr. A. Bockhardt (Hochland AG) danke ich für die freundliche Übernahme der Korreferate und das meiner Arbeit entgegengebrachte Interesse.

Den Mitarbeitern /-innen der Professur für Lebensmittelchemie der TU Dresden sei an dieser Stelle für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die freundliche Unterstützung bei der Durchführung der praktischen Arbeiten gedankt. Besonders erwähnen und bedanken möchte ich in diesem Zusammenhang bei der Frau Dipl.Ing (FH) K. Schlosser für die Durchführung der Aminosäureanalysen, Herrn Dr. U. Schwarzenbolz und Frau DLC M. Martin für die Hilfe bei der Durchführung der RP-HPLC, Herrn Prof. Dr. T. J. Simat für die Hilfe bei der Sensorik und Statistik sowie Frau DLC C. Partschefeld für die Hilfe bei der GPC und SDS-PAGE.

Bei M. Jacob, M. Schlenker, K. Stauche und D. Glabinska möchte ich mich für die engagierte Mitarbeit in Rahmen ihrer Diplomarbeiten bedanken.

Bei Frau Dr. K. Schrader (BfEL, Kiel) sowie Frau Dipl.Ing. E. Kern (Professur für Physikalische Chemie und Elektrochemie, TU Dresden) möchte ich mich für die Unterstützung bei der Elektronenmikroskopie bedanken.

Frau A. Göpfert (Professur für Physikalische Chemie und Elektrochemie, TU Dresden) danke ich für die Durchführung der DSC-Messungen.

Herrn A. Schneider (Professur für Allgemeine Biochemie, TU Dresden) danke ich für die Einweisung in die Fluoreszenzanalytik.

Im weiteren gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. H. Rohm und Frau Dr. D. Jaros (Institut für Lebensmittel- und Bioverfahrenstechnik, TU Dresden) für die Zusammenarbeit sowie Hilfe bei den rheologischen Untersuchungen.

Herrn DLC N. Schäfer (LUA, Dresden) danke ich für die Zusammenarbeit sowie die Durchführung der Headspace-GC.

Desweiteren danke ich der Chemischen Fabrik Budenheim KG, der Hochland AG und der Milei GmbH für die Bereitstellung der Versuchssubstanzen.

Frau Dr. H. Raddatz gebührt ein Dank für die Hilfe bei der Aufnahme in das Frauenförderungsprogramm.

Herrn DLC M. Hellwig danke ich für die Übernahme des Lektorates und Herrn C. Rost für die technische Unterstützung.

# Erklärung

Hiermit versichere ich, dass die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht. Die Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Die Dissertation wurde am Institut für Lebensmittelchemie der Technischen Universität Dresden unter der wissenschaftlichen Betreuung von Herrn Prof. Dr. rer. nat. Dr. Ing. habil. Thomas Henle angefertigt.

Erfolgreiche Promotionsverfahren haben durch mich bis jetzt nicht stattgefunden.

Die Promotionsordnung der Fakultät Mathematik und Naturwissenschaften der Technischen Universität Dresden in der aktuell gültigen Fassung erkenne ich in allen Teilen an.

Bozena B. Mulsow